

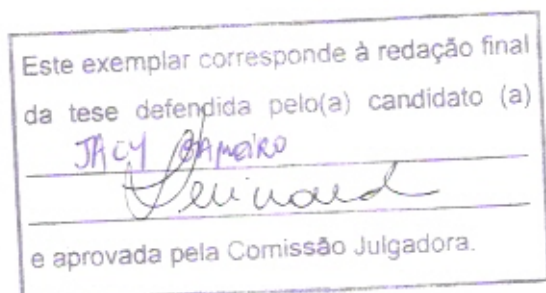


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

JACY GAMEIRO

**“ALTERAÇÕES NO MICROAMBIENTE TÍMICO FRENTE
A DIFERENTES AGENTES INDUTORES DE ATROFIA”**



Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título
de Doutor em Genética e Biologia
Molecular, na área de
Imunologia.

Orientador(a): Profa. Dra. Liana Verinaud

Co-Orientador(a): Prof. Dr. Wilson Savino

Campinas, 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

G145a

Gameiro, Jacy

Alterações no microambiente tímico frente a diferentes agentes indutores de atrofia / Jacy Gameiro. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: Liana Maria Cardoso Verinaud, Wilson Savino.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Timo. 2. Atrofia tímica. 3. Matriz extracelular. 4. Malária. 5. Paracoccidioidomicose. I. Verinaud, Liana Maria Cardoso, 1959-. II. Savino, Wilson. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Título em inglês: Thymic microenvironmental alterations in different kind of thymus atrophy.

Palavras-chave em inglês: Thymus; Thymic atrophy; Extracellular matrix; Malaria; Paracoccidioidomycosis.

Área de concentração: Imunologia.

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Liana Maria Cardoso Verinaud, Dagmar Ruth Stach-Machado, Ronei Luciano Mamoni, Eva Burger, Daniella Áreas Mendes da Cruz.

Data da defesa: 27/02/2009.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 27 de fevereiro de 2009.

BANCA EXAMINADORA


Prof(a). Dr(a) . Liana Maria Cardoso Verinaud
(Orientador(a))


Assinatura

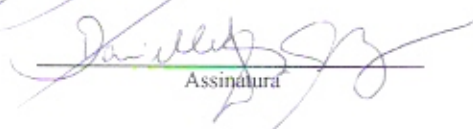
Profa. Dra. Eva Burger


Assinatura

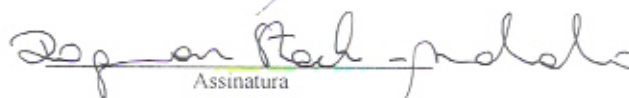
Prof(a). Dr(a). Ronci L. Mamoni


Assinatura

Prof(a). Dr(a) Daniella Areas Mendes da Cruz


Assinatura

Prof(a). Dr(a) Dagmar Ruth Stach Machado


Assinatura


Prof(a). Dr(a) . Maria Regina Lima D'Império


Assinatura

Prof(a). Dr(a) Leonilda MB Santos


Assinatura

Prof(a). Dr(a) Marcelo Brocchi


Assinatura

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, São Paulo, com apoio financeiro da FAPESP (Processo # 04/03599-1) e do CNPq.

*“Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu”
Fernando Pessoa (Mar Português)*

*“A coisa mais bela que podemos experimentar é o mistério. Essa é a fonte de toda
a arte e ciências verdadeiras”*

Albert Einstein

*Dedico esta tese ao Èrico,
Pelo companheirismo, apoio e amor incondicionais,
fundamentais em todos os passos da minha vida.*

Agradecimentos

À Deus, por nunca ter me tirado o chão sob os pés.

À minha família, Pai, Mãe, Moa, Thereza, Gabriel, Rafael, Aurora e Miguel, por toda a paciência e fé de que eu poderia chegar mais longe.

Ao Érico, por tudo e um pouco mais.

À Liana Verinaud, minha orientadora, pela confiança, por permitir a realização deste trabalho, pelas portas e pelos ouvidos sempre abertos, pelas críticas, que foram faladas de uma forma que nunca me magoaram, mas permitiram meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Savino co-orientador deste trabalho, que sempre me ajudou e preocupou-se comigo, apesar das minhas ausências e me fez saber e gostar mais do objeto do meu trabalho.

À Patty, amiga e companheira de trabalho, indispensável nessa jornada. Sem ela presente nada teria sido tão proveitoso, divertido e enriquecedor, não só cientificamente, mas na vida pessoal também.

À Vânia, amiga da vida inteira, graças a ela sou melhor do que antes.

Aos meus queridos amigos que fizeram e fazem da minha vida melhor, preenchem lacunas e são indispensáveis, cada um do seu jeito, cada um especial para mim: Livia, Carol Bonetto, Carol Francelin, Mary, Clau, Rafael, Fafá, Wagner, Fabiana, Cris, Camila, Paula, Márcia, Matheus, Itatiba, Taty Mariucha, Juan e Marcos César.

Aos meus amigos do departamento, por fazerem do ambiente de trabalho um lugar especial: Rafael Ikemori, Peroni, Márcio, Juliete, Yara, Júlia, Thiago, Rosária, Luís, Maristela, Garça e Danilo.

Aos amigos de São Paulo, que acompanham minha trajetória e que trago junto comigo: Jailson, Chiara, Márcio, Fabiana, Pri e Cris.

À Margot, minha gatinha, linda e companheira, foi uma tese mais feliz tendo ela em casa.

Aos funcionários do departamento, pelo auxílio em tudo que precisei em especial o Marcos César, pelo seu cuidado e dedicação com meus bichinhos. Ao José Raimundo e a Dirce, por todos os socorros prestados e pela sempre simpática conversa. À Lúcia, pelo auxílio em todas as questões burocráticas.

Aos professores do departamento de Microbiologia e Imunologia, pelo auxílio em diversas questões, pelo uso de equipamentos e reagentes.

À equipe do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo: Dra. Suse Dayse Barbosa, Dra. Déa Maria Serra Villa Verde e todos alunos que sempre me receberam de forma calorosa.

À Profa. Dra. Luciana Paulino, por toda a ajuda com o PCR em tempo real.

À toda equipe do CIPOI, em especial a Ana Leda, pelo uso do citômetro de fluxo.

Ao Prof. Dr. Hernandez e a Bióloga Fabiana, pela utilização do aparelho de PCR em tempo real.

À Profa. Dra. Leonilda M.B. Santos e Dr. Ronei Luciano Mamoni, pela participação na pré banca desta tese.

À Profa. Dra. Eva Burger, à Dra. Daniella Área Mendes da Cruz, a Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach Machado e ao Dr. Ronei Mamoni, pela participação como membros da banca examinadora.

À FAPESP por todo o auxílio financeiro que permitiu a conclusão deste trabalho.

RESUMO

O timo é o órgão linfóide primário responsável pelo amadurecimento dos linfócitos T. O processo de maturação é dependente da integridade do microambiente e da migração coordenada por elementos de matriz e quimiocinas dos precursores hematopoiéticos nos distintos nichos tímicos.

Entretanto, a literatura mostra que profundas alterações no microambiente tímico, e conseqüentemente no desenvolvimento e amadurecimento dos linfócitos T, podem ocorrer como resultado de algumas patologias.

No presente trabalho, analisamos a indução de atrofia e as alterações no microambiente tímico frente a três diferentes agentes indutores de atrofia, sendo dois agentes patogênicos, *P.brasiliensis* e *P.berghei* e uma doença metabólica, a diabetes induzida por aloxana.

Nos três modelos estudados foi observada a atrofia do órgão com diferente intensidade nas alterações de componentes do microambiente tímico. Importantes moléculas associadas com a migração intratímica mostraram-se alteradas com modificações significativas nos elementos de matriz e nas quimiocinas bem como na expressão dos seus respectivos receptores.

Ainda, a migração *ex vivo* também se mostrou alterada na atrofia induzida pelos agentes patogênicos, mas não no modelo de atrofia induzido por aloxana, sugerindo que as alterações desencadeadas são específicas de cada condição patológica analisada.

As modificações nos elementos estudados sugerem alterações no padrão de migração intratímica e na exportação de timócitos, com comprometimento da função tímica, levando a maturação desequilibrada dos timócitos, com conseqüências para a resposta imune periférica.

ABSTRACT

Thymus is the primary lymphoid organ responsible for differentiation of T lymphocytes. This process is dependent of thymic microenvironment integrity and coordinated migration of hematopoietic precursors by chemokines and extracellular matrix elements.

However, the literature shows that deep alterations in thymus microenvironment with modifications in thymocyte development may occur such as result of some pathological disorders.

In this study we analyzed the atrophy induction and alterations in thymic microenvironment in three different models of thymus atrophy. We studied two models of infectious diseases, *P.brasiliensis* and *P.berghei*, and a metabolic disorder, alloxan induced diabetes.

We have observed thymus atrophy in all models with different alterations levels in thymus microenvironment elements. Important molecules associated with intrathymic migration were been altered with significant modifications in extracellular matrix elements, chemokines and their specific receptors.

Besides, *ex vivo* migration was altered in thymus atrophy induced by pathogenic agents, but no alterations were observed in diabetic mice suggesting that different pathological conditions studied, leads to singular alterations in thymus compartment.

The modifications in thymic molecules observed in our models, suggest impaired thymus functionality and alterations in thymocyte migration patterns. These alterations can lead T cell maturation imbalance with consequences in T lymphocyte immune response.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O timo	2
1.2. Atrofia tímica.....	11
2. OBJETIVOS.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1. Animais.....	23
3.2. Estabelecimento dos modelos de atrofia tímica.....	23
3.3. Delineamento experimental.....	25
3.4. Detecção do <i>P. berghei</i> no timo de animais infectados.....	26
3.5. Índice tímico.....	27
3.6. Detecção por Imunofluorescência para laminina e fibronectina.....	27
3.7. Análise por citometria de fluxo das subpopulações de timócitos e expressão de receptores.....	28
3.8. Extração de RNA e síntese de cDNA.....	28
3.9. Expressão de quimiocinas através de PCR em tempo real.....	29
3.10. Ensaios de transmigração através de placas de “transwell”	30
3.11. Análise Estatística.....	31
4. RESULTADOS.....	32
4.1. Alterações no modelo de atrofia tímica induzida por <i>Paracoccidioides</i> <i>brasiliensis</i>	33
4.1.1. Índice tímico e análise das subpopulações.....	33
4.1.2. Avaliação da densidade de elementos de matriz extracelular através de imunofluorescência.....	33
4.1.3. Análise da expressão de VLA-4 (CD49d/CD29) e VLA-5 (CD49e/CD29), receptores para fibronectina, e VLA-6 (CD49f/CD29), receptor para laminina.....	35
4.1.4. Análise da expressão de CXCL12 e CCL25.....	40
4.1.5. Alterações nos receptores de quimiocinas CXCR4 e CCR9.....	40

4.1.6. Avaliação <i>ex vivo</i> do potencial migratório de timócitos através de ensaios de migração.....	44
4.2. Alterações no timo de animais infectados com <i>Plasmodium berghei</i> cepa NK65.....	48
4.2.1. Índice tímico.....	48
4.2.2. Detecção do <i>P.berghei</i> no timo de animais infectados.....	48
4.2.3. Avaliação da densidade de elementos de matriz extracelular.....	49
4.2.4. Análise da expressão de VLA-4 (CD49d/CD29) e VLA-5 (CD49e/CD29), receptores para fibronectina e VLA-6 (CD49f/CD29), receptor para laminina.....	51
4.2.5. Análise da expressão de CXCL12 e CCL25.....	57
4.2.6. Alterações nos receptores de quimiocinas CXCR4 e CCR9.....	58
4.2.7. Avaliação do potencial migratório <i>ex vivo</i> de timócitos através de ensaios de migração.....	62
4.3. Diabetes.....	66
4.3.1. Índice Tímico.....	66
4.3.2. Avaliação da densidade de elementos de matriz extracelular.....	66
4.3.3. Análise da expressão de VLA-4 (CD49d/CD29) e VLA-5 (CD49e/CD29), receptores para fibronectina e VLA-6 (CD49f/CD29), receptor para laminina.....	68
4.3.4. Análise da expressão de CXCL12 e CCL25 por PCR em Tempo Real.	74
4.3.5. Alterações nos receptores de quimiocinas CXCR4 e CCR9.....	75
4.3.6. Avaliação do potencial migratório <i>ex vivo</i> de timócitos através de ensaios de migração.....	79
4.4. Comparação das alterações no microambiente tímico frente aos diferentes agentes de atrofia.....	82
5. DISCUSSÃO.....	83
5.1. Alterações tímicas induzidas pelo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	84
5.2. Alterações no microambiente tímico de animais inoculados com <i>Plasmodium berghei</i> cepa NK65.....	92

5.3. Alterações no microambiente tímico de animais diabéticos induzidos por aloxana.....	99
5.4. Considerações finais e perspectivas.....	103
6. CONCLUSÕES.....	107
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
ANEXOS.....	129
Artigo 1.....	130
Artigo 2.....	135
Artigo 3.....	163
Artigo 4.....	191
Artigo 5.....	198

1. Introdução

1.1. Timo

Desde sua primeira descrição por Claudius Galen (130-200 DC), o timo foi considerado um órgão cercado de mistérios, e até 1960 cientistas e médicos acreditavam que o timo possuía uma atividade endócrina ou que seria um remanescente evolucionário sem função alguma (NISHINO *et al.*, 2006; GUIDOS *et al.*, 2006). Em 1961, Miller publicou a descoberta da função imunológica primordial do timo, descrevendo-o como um órgão que possuía o microambiente propício para que os linfócitos proliferassem muito mais ativamente do que em qualquer outro órgão linfóide (revisto por REZZANI *et al.*, 2008)

O timo situa-se no mediastino inferior e anatomicamente é dividido em dois lobos e vários lóbulos. Histologicamente, apresenta-se dividido em duas regiões bem definidas: o córtex, densamente povoado, e a medula, região com menor densidade de células (SUSTER & ROSAI, 1997). É o órgão linfóide primário responsável pela maturação dos linfócitos T (JAMIESON *et al.*, 1999).

A arquitetura tímica, com diferentes microambientes, é essencial para maturação e diferenciação de timócitos, uma vez que as subpopulações localizam-se em nichos distintos no órgão, recebendo, portanto, sinais diferenciados em cada região (LIND *et al.*, 2001, revisto por PETRIE & ZÚÑIGA-PFLÜCKER *et al.*, 2007). Ainda que o timo tenha a capacidade de gerar linfócitos T durante toda a vida, o órgão não apresenta células tronco remanescentes e assim, o estabelecimento intratímico das subpopulações de timócitos é dependente do recrutamento periódico de precursores na medula óssea (WALLIS *et al.*, 1975, GOLDSCHNEIDER, *et al.*, 1986, FOSS *et al.*, 2001).

Embora não sejam conhecidos os sinais liberados pelo timo, responsáveis pela atração dos progenitores hematopoiéticos e nem os marcadores específicos das células que colonizam o órgão, a entrada dos precursores ocorre através dos vasos localizados na junção córtico-medular, o que sugere a ocorrência de estruturas ou sinais específicos para a entrada dos timócitos no interior do órgão (revisto por SHORTMAN *et al.*, 1990, PETRIE & ZÚÑIGA-PFLÜCKER *et al.*, 2007).

O microambiente tímico é composto por timócitos em desenvolvimento e outros componentes, não linfocíticos, que constituem o estroma tímico, entre eles: células epiteliais, células endoteliais, fibroblastos reticulares, macrófagos e células dendríticas, localizadas em lugares distintos no interior do órgão (ANDERSON & JENKINSON, 2001). Além disso, no córtex tímico, encontram-se complexos epiteliais denominados TNC (do inglês, thymic nurse cell), que contém em seu interior timócitos em diferentes estágios de diferenciação (PEZZANO *et al.*, 2001).

As células epiteliais tímicas (TECs), que podem ser corticais ou medulares são os principais componentes não linfocíticos (não-linfóides) do timo e interagem com os timócitos afetando seu desenvolvimento. Interessantemente, esta interação também modula funcionalmente as TECs, influenciando na manutenção da funcionalidade do órgão (CIOFANI & ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2007, JENKINSON *et al.*, 2008).

O completo desenvolvimento dos linfócitos T depende da constante migração dos precursores hematopoiéticos através dos compartimentos tímicos que favorecem diferentes interações entre as células e outros componentes do

microambiente tímico, resultando na expressão ou repressão de genes estágio específicos. Esta migração é necessária para que os timócitos encontrem os sinais necessários para sobrevivência, proliferação, diferenciação e seleção da diversidade de repertório (JAMIESON *et al.*, 1999).

A partir da entrada no órgão, os timócitos migram, de forma coordenada nos distintos microambientes tímicos, recebendo sinais através de receptores específicos (revisto por PETRIE & ZÚÑIGA-PFLÜCKER *et al.*, 2007).

Inicialmente, os timócitos imaturos são encontrados na região subcapsular do órgão e não expressam o complexo TCR nem os co-receptores CD4 ou CD8. Estes timócitos são denominados duplo-negativos (DN) e migram pela região cortical onde ocorrem os principais eventos de maturação. Na região cortical, encontram-se os timócitos duplo negativos subdivididos em DN1 a DN4. Estes estágios são marcados pela expressão diferencial das moléculas CD25 e CD44.

Ainda na região cortical, os timócitos começam a expressar as moléculas de CD4, CD8 que caracterizam o fenótipo duplo positivo (DP). Neste estágio ocorre o rearranjo do TCR (do inglês T cell receptor). Primeiramente temos o rearranjo da cadeia β que forma o pré-TCR, composto da porção β e uma cadeia pré T α . A exposição deste complexo na superfície dos timócitos estimula o rearranjo da cadeia α do receptor e o TCR $\alpha\beta$ é então definitivamente formado e exposto na superfície dos timócitos em desenvolvimento. Os timócitos também podem apresentar o TCR $\gamma\delta$, mas os processos de seleção destas células são distintos. (PETRIE *et al.*, 1992, DUDLEY *et al.*, 1995, VON BOEHMER & FEHLING, 1997, CIOFANI *et al.*, 2006, ZÚÑIGA-PFLÜCKER & CIOFANI, 2006)

Os timócitos duplo - positivos ($CD4^+CD8^+$) migram em direção a região medular do órgão, onde o processo de seleção positiva determina sua passagem para timócitos simples positivos ($CD4^+$ ou $CD8^+$). Na região medular, os timócitos agora simples positivos interagem com células dendríticas e células epiteliais tímicas medulares, e sofrem processos de seleção negativa, onde aqueles que reconhecem com alta afinidade peptídeos próprios são eliminados por apoptose e aqueles que não se ligam, ou reconhecem antígenos próprios com baixa afinidade escapam do processo de morte celular e estão aptos a emigrar do timo e povoar os órgãos linfóides periféricos.

Durante todo o processo de migração os timócitos interagem com os componentes do microambiente tímico, a rede tridimensional composta por células TEC, macrófagos, células dendríticas, fibroblastos e componentes da matriz extracelular. Além da interação envolvendo o TCR e o MHC (do inglês, major histocompatibility complex), e as moléculas co-receptoras de CD4 e CD8, o microambiente tímico influencia na maturação dos timócitos através das moléculas de adesão e matriz extracelular (ECM), interação importante para a migração dos timócitos (revisto por SAVINO *et al.*, 2004).

Ainda, as células dendríticas e do epitélio tímico, por exemplo, produzem interleucina 1 (IL-1) que estimula a proliferação de timócitos (LE PT *et al.*, 1987). Além desta citocina, as células do epitélio tímico produzem interleucina 3 (IL-3), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), interleucina 7 (IL-7), fator estimulador de colônia de macrófagos (GM-CSF), fator de crescimento e transformação alfa

(TGF- α) e fator de crescimento e transformação beta (TGF- β) (MOORE *et al.*, 1993, LE PT *et al.*, 1990, WOLF *et al.*, 1992, LE PT, *et al.*, 1987)

Além de citocinas, as quimiocinas são essenciais para a funcionalidade do microambiente tímico. As quimiocinas pertencem a uma família de pequenos polipeptídios que tiveram primeiramente seu papel reconhecido na migração de leucócitos da corrente sanguínea para os locais de inflamação (revisto por BACHMANN *et al.*, 2006).

A literatura, entretanto, mostra que certos membros da família das quimiocinas podem também governar diretamente a migração de células hematopoiéticas em condições fisiológicas (MURPHY *et al.*, 1994, REZZANI *et al.*, 2008). O fator derivado de células do estroma (SDF-1 α /CXCL12), por exemplo, é altamente expresso no timo de adultos, particularmente na região subcapsular (HERNANDEZ-LOPEZ *et al.*, 2002, PLOTKIN, *et al.*, 2003). Outras importantes quimiocinas produzidas neste órgão são a quimiocina secundária de tecido linfóide (SLC/CCL21) e a quimiocina expressa pelo timo (TECK/CCL25) (BLEUL *et al.*, 2000, ANNUNZIATO *et al.*, 2001).

Além do papel primordial de atração e condução dos timócitos, outras funções têm sido atribuídas às quimiocinas no timo, como proliferação de timócitos, ativação e produção de citocinas, participação nos processos de seleção negativa e positiva e também como indutoras de sobrevivência ou apoptose em timócitos (ANDERSON *et al.*, 2000, YOUN, *et al.*, 2002, ANDERSON & JENKINSON *et al.*, 2007, JENKINSON *et al.*, 2007).

A quimiocina CXCL12 é essencial para a correta localização dos precursores na região cortical e a deleção de CXCR4, o receptor de CXCL12 no timo, resulta em falha na localização dos timócitos no microambiente tímico com retardo no processo de desenvolvimento dos linfócitos (PLOTKIN *et al.*, 2003). Além disso, é importante também na condução dos timócitos duplo-positivos para a junção córtico-medular, local onde ocorre a seleção positiva (SUZUKI *et al.*, 1999, ARA *et al.*, 2003).

A quimiocina CCL25 tem como receptor a molécula CCR9, expressa em todas as subpopulações de timócitos, mas com máxima expressão em duplo positivo, e parece não estar relacionada com a migração de timócitos imaturos, uma vez que os estágios de duplo negativos não apresentam migração significativa frente a CCL25 (CARRAMOLINO, *et al.*, 2001, POZNANSKY *et al.*, 2002, UEHARA, *et al.*, 2002, SVENSSOM *et al.*, 2008). Nos timócitos simples positivos, CD4 e CD8, ocorre a inibição de expressão de CCR9 e uma baixa resposta ao CCL25 é relacionada aos eventos de emigração dos linfócitos do timo (revisto por TAKAHAMA, 2006).

Além destas quimiocinas, o microambiente tímico produz e responde às quimiocinas CCL4, CCL11, CCL19, CCL21, CCL22, entre outras, que estão principalmente envolvidas com a migração e localização de timócitos TCR $\alpha\beta$ e TCR $\gamma\delta$, através dos seus receptores específicos (ANNUNZIATO *et al.*, 2001).

A expressão diferencial dos receptores de quimiocinas nas subpopulações de timócitos é responsável pelo controle exercido por estas moléculas na migração intratímica. Assim, embora as quimiocinas encontrem receptores em

todos os timócitos, o nível de resposta é diferente em cada estágio o que permite a modulação da migração, conforme mostra a figura 1. (FU & CHEN, 2004)

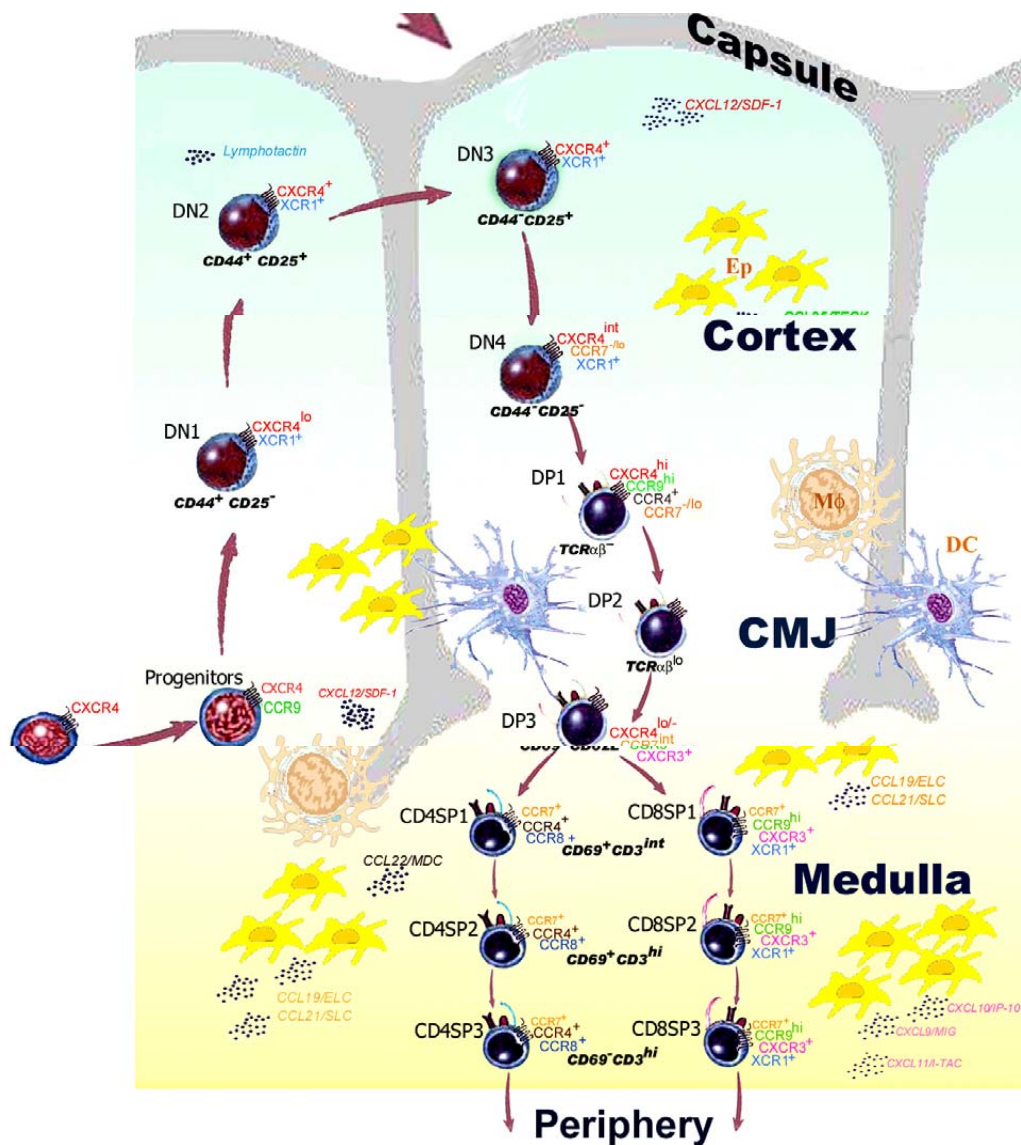


Figura 1: Expressão diferencial de quimiocinas durante a migração intratímica. Retirado de **Roles of chemokines in thymopoiesis: Redundancy and regulation**. Fu & Chen, 2004).

Além das quimiocinas, outro importante componente do microambiente são os elementos da matriz extracelular que atuam como arcabouço estrutural e como substrato para os eventos migratórios dos timócitos. A interação entre os timócitos e os elementos de matriz promove a adesão capaz de desencadear cascatas de sinalização essenciais para a diferenciação dos linfócitos T (SAVINO *et al.*, 2004).

A matriz extracelular interage com os timócitos dirigindo seu trânsito dentro do órgão. Células epiteliais tímicas produzem fibronectina, laminina e colágeno tipo IV que encontram moléculas ligantes em timócitos, indicando, portanto, um papel crucial no fluxo dos timócitos através do timo (SAVINO *et al.*, 2002). Além disso, elementos de matriz podem aprisionar moléculas de quimiocinas, modulando sua disponibilidade para os timócitos, atuando diretamente nos eventos de migração (PELLETIER *et al.*, 2000, SAVINO *et al.*, 2002). No timo, estes elementos não estão apenas distribuídos nos locais típicos como membranas basais ou septos, mas formam uma rede na região medular e fibras finas no córtex, sugerindo importante papel nas funções tímicas, principalmente modulando as interações entre células epiteliais tímicas e timócitos (BERRIH, *et al.*, 1985)

A fibronectina é um elemento de matriz associado a diversos processos celulares como reparação tecidual, embriogênese, migração e adesão. No timo, a fibronectina é expressa em duas isoformas reconhecidas por diferentes receptores, o VLA-5 (do inglês very late antigen) (CD49e/CD29), liga-se a isoforma que está distribuída por todo o parênquima tímico. O receptor VLA-4 (CD49d/CD29) reconhece a isoforma derivada de um “splicing” alternativo do

mRNA de fibronectina através de um motivo de ácido aspártico-arginina-glutamina-valina e sua distribuição parece estar restrita à medula do órgão (CRISA *et al.*, 1996).

A fibronectina possui um papel essencial em ancorar células ao colágeno permitindo a formação de pontes moleculares entre timócitos e células do microambiente, fenômeno que possibilita a adesão e sinalização necessária para a diferenciação de timócitos e este processo é condicionado pela expressão diferencial dos receptores na membrana dos mesmos (DALMAU, *et al.*, 1999, SAVINO, *et al.*, 2000). Além disso, a fibronectina pode modular a disponibilidade de quimiocinas no microambiente tímico, promovendo a migração de timócitos nos compartimentos tímicos (revisto por CIOFANI & ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2007)

Outro importante componente de ECM é a laminina, uma grande família de proteínas composta de 16 variantes que exibem expressão diferencial nos tecidos (COLOGNATO *et al.*, 2000, SASAKI, *et al.*, 2004,). No timo, a laminina está distribuída por todo o parênquima, formando uma rede co-localizada com as células epiteliais tímicas (BERRIH, *et al.*, 1985, OCAMPO *et al.*, 2008). Timócitos em diferentes estágios de maturação apresentam o receptor VLA-6 (CD49f/CD29), específico para laminina (LANNES –VIEIRA *et al.*, 1993).

A literatura mostra que camundongos mutantes, deficientes para laminina-2, apresentam atrofia do timo, além de decréscimo no número de timócitos DP e aumento de apoptose no estágio de timócitos DN. Estes achados sugerem papel fundamental deste elemento na sinalização dos estágios mais imaturos e na progressão de duplo negativos para duplo positivos. Corroborando estes dados, a

adição de anticorpos anti-laminina, *in vitro*, demonstrou um significativo bloqueio na expansão de timócitos e na diferenciação de DN para DP (IWAO *et al.*, 2000).

1.2. A atrofia tímica

Embora o timo seja o órgão responsável pela maturação de linfócitos T, ele sofre atrofia fisiológica idade-dependente. Em humanos, a partir da puberdade, o órgão sofre acelerado processo de involução. Como consequência da atrofia, alterações morfológicas e funcionais como diminuição no volume do órgão, substituição do tecido epitelial por adiposo, queda na entrada de precursores no órgão, diminuição na proliferação de timócitos e menor emigração de linfócitos T maduros para a periferia são descritas (STEINMANN *et al.*, 1985a e 1985b, HIROKAWA *et al.*, 1994, MACKALL *et al.*, 1995, GRUVER *et al.*, 2007).

É importante salientar que a atrofia fisiológica não causa distúrbios em indivíduos saudáveis, mas, em paciente imunocomprometidos a reduzida capacidade do timo atrófico em exportar células para a periferia é associada com o aumento de morbidade (HAYNES *et al.*, 2000).

Ainda que as alterações ocorridas no timo durante a atrofia fisiológica sejam bem caracterizadas, existem controvérsias sobre a funcionalidade tímica. Douek e colaboradores (1998) demonstram que o timo de adultos humanos é capaz de produzir linfócitos T (revisto por DOUEK, *et al.*, 2000). Além disso, a literatura mostra que o microambiente básico do córtex e medula é preservado em idosos, possuindo suporte morfológico, portanto, capaz de sustentar a produção de

linfócitos mesmo que em menores níveis. Interessantemente, embora em número absoluto haja queda no número de timócitos, a proporção entre as diferentes subpopulações não é alterada (SHIRAIISHI *et al.*, 2003). Além disso, estudos com pacientes submetidos a transplantes de medula óssea, ou após tratamentos imunossupressivos como irradiação, mostram claramente a reconstituição do repertório celular periférico do sistema imune (LEGRAND *et al.*, 2007, LUM *et al.*, 1987). A análise histológica do timo destes pacientes (jovens e adultos) revela uma rede linfoepitelial tímica capaz de dar suporte aos eventos de proliferação e exportação de células T para a periferia. Além disso, a diminuição celular quantitativa não reflete uma mudança qualitativa, pois as porcentagens de células T permanecem inalteradas (BERTHO *et al.*, 1997).

Diversas moléculas têm sido relacionadas com a involução fisiológica do timo, entre elas, hormônio de crescimento (GH), fator de crescimento tipo insulina -1 (IGF-1), fator de crescimento de nervos (NGF), citocinas como IL-7, TGF- β e IL-6, além de hormônios sexuais esteróides (SEMPOWSKI *et al.*, 2000, ANDREW & ASPINALL *et al.*, 2002, GARCIA-SUAREZ *et al.*, 2003, revisto por ASPINALL & MITCHELL, 2008).

Além da involução fisiológica o timo sofre atrofia induzida por outras condições como má nutrição, com profunda depleção de timócitos corticais, principalmente CD4⁺CD8⁺. Esta condição é reversível e a partir de uma dieta de reabilitação o órgão retorna ao seu estado fisiológico (revisto por SAVINO *et al.*, 2007).

A literatura mostra que doenças metabólicas como o diabetes também promovem a atrofia do órgão, caracterizada por alterações ultra-estruturais com desorganização córtico-medular e alta incidência de apoptose no córtex subcapsular (ELMAS, *et al.*, 2008).

O Diabetes Mellitus é uma síndrome metabólica caracterizada pela deficiência absoluta ou relativa na secreção de insulina pelo pâncreas e/ou deficiência na ação da insulina em tecidos alvo, com conseqüente alteração no metabolismo de lipídios, proteínas, carboidratos, água, vitaminas e minerais (PRATLEY & WEVER, 2002).

A doença causa um decréscimo na qualidade de vida dos pacientes que muitas vezes tomam injeções diárias de insulina além de realizarem uma dieta restritiva. Além disso, a diabetes pode levar a problemas cardíacos, renais, neurológicos e problemas na cicatrização (ALBA-LOUREIRO *et al.*, 2007). É bem documentado que os pacientes diabéticos possuem resposta inflamatória alterada e apresentam maior susceptibilidade a infecções, principalmente fúngicas e bacterianas (MULLER *et al.*, 2005, BENFIELD *et al.*, 2007, HIRSCH *et al.*, 2008). Pacientes diabéticos também apresentam outras desordens imunológicas como defeitos na maturação de macrófagos e células dendríticas (DELAMAIRE *et al.*, 1997), o que pode resultar em ineficiente apresentação de antígenos aos linfócitos T na periferia do sistema imune e alterações na seleção negativa no timo (TABATA *et al.*, 1984)

A indução de diabetes através de agentes químicos como estreptozotocina e aloxana também é bem documentada. A aloxana é um análogo tóxico da glicose

e é utilizada como modelo de diabetes mellitus insulina-dependente. A droga age sobre as células β das ilhotas pancreáticas, ligando-se aos receptores de glicose, inativando a enzima glucoquinase e liberando reativos intermediários do oxigênio que destroem as células produtoras de insulina, provavelmente causando necrose. Os sinais e complicações inerentes ao diabetes como comprometimento visual, renal, cardíaco e de órgão linfóides podem ser observados (revisto por SZUDELSKI, 1999).

Alterações no timo têm sido observadas frente a diabetes. Mendes-da-Cruz e colaboradores (2008) utilizando animais NOD, mostraram que o microambiente tímico destes animais apresenta menor expressão de VLA-5, receptor de fibronectina, e alta expressão de CXCR4, receptor de CXCL12. Estas modificações, conjuntamente, podem colaborar para o estabelecimento da patologia da diabetes tipo 1, uma vez que a migração de timócitos é alterada.

Doenças infecciosas também são importantes agentes indutores de atrofia tímica caracterizada pela intensa perda de timócitos corticais. Diferentes agentes patogênicos, como vírus (HIV, raiva), bactérias (tuberculose, listeriose), parasitas (*Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium chabaudi*, *Schistosoma mansoni*) e fungos (*Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*) já foram descritos como indutores de atrofia (SAVINO *et al.*, 1986, CHEN *et al.*, 2005, SAVINO *et al.*, 1989, SEIXAS *et al.*, 2005, WELLHAUSEN *et al.*, 1982, BRITO, *et al.*, 2003, WATSON *et al.*, 1984).

Os mecanismos pelos quais estes agentes induzem atrofia não é totalmente elucidado, mas os níveis de glucocorticoides presentes no sangue em

resposta ao stress gerado pela infecção parecem ser importantes para desencadear a atrofia em algumas doenças como raiva ou na infecção por *Francisella tularensis*. Entretanto, na infecção por *T.cruzi*, apesar dos altos níveis de corticosterona, a adrenalectomia não preveniu a depleção de timócitos corticais. Além do glucocorticóide, citocinas como o TNF- α , podem induzir atrofia, como descrito na tularemia (revisto por SAVINO, 2006).

Além dos fatores da resposta imune sistêmica desencadeada nas doenças infecciosas, como liberação de glucocorticoides e citocinas pró inflamatórias que podem agir sobre o timo, moléculas produzidas no interior do órgão podem influenciar no processo de atrofia, uma vez que são documentadas alterações em diversos elementos constituintes do microambiente tímico como elementos de matriz extracelular e quimiocinas (revisto por SAVINO, 2004 e 2006).

A perda de timócitos corticais, principalmente duplo positivos ($CD4^+CD8^+$), pode ser resultado não somente de intensa apoptose, mas, em infecções com *T.cruzi*, a migração de timócitos imaturos para a periferia do sistema imune também contribui para a intensa atrofia descrita nesta infecção (HENRIQUES-PONS *et al.*, 2004, COTTA-DE-ALMEIDA *et al.*, 2003, MENDES-DA-CRUZ *et al.*, 2006). Mendes-da-Cruz e colaboradores (2003) mostraram alterações nos elementos de matriz e quimiocinas e seus respectivos receptores, essenciais para o correto desenvolvimento de linfócitos T. Além disso, mostraram a presença de timócitos imaturos com TCRs que deveriam ser eliminados nos processos de seleção negativa e positiva, nos linfonodos, indicando que a atrofia do órgão

desencadeada pela infecção, altera seu funcionamento ocasionando alterações no “pool” de linfócitos T do sistema imune periférico.

Com o objetivo de obter modelos para o melhor entendimento do processo de maturação de linfócitos T, nosso grupo de pesquisa tem estudado diferentes agentes indutores de atrofia tímica. A infecção pelo vírus da hepatite murina (MHV) causa atrofia tímica, com aumento de apoptose e diminuição no peso e celularidade do órgão (VERINAUD *et al.*, 1998). Em trabalhos do nosso grupo, observamos que a infecção por *P.brasiliensis* também é capaz de atrofiar o timo, invadindo o órgão, causando alterações histológicas e ultra-estruturais relevantes como perda da delimitação córtico-medular e alta taxa de apoptose cortical (BRITO *et al.*, 2003, SOUTO *et al.*, 2003).

O *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo termodimórfico, causador de uma doença granulomatosa crônica denominada Paracoccidioidomicose (PCM) (revisto por BRUMMER *et al.*, 1993). A PCM apresenta alta incidência nos países da América Latina, constituindo a principal micose sistêmica desta região. O Brasil abriga a maioria dos casos (80%), sendo seguido por Colômbia e Venezuela. A maior parte dos casos brasileiros ocorre no estado de São Paulo. A doença atinge, principalmente, trabalhadores rurais no período mais produtivo de suas vidas geralmente entre 29 e 40 anos (BRUMMER *et al.*, 1993, GOLDANI *et al.*, 1995, FRANCO *et al.*, 1987).

Quadros mais graves da doença estão associados com deficiências na resposta imune celular. Vários fatores são apontados como possíveis responsáveis pela supressão da resposta imune celular durante a infecção

paracoccidioidomicótica, entre eles destacam-se: deficiência na apresentação de antígenos e diminuição da função de linfócitos T (TEIXEIRA *et al.*, 1987) presença de células supressoras antígeno-específicas (JIMENEZ-FINKEL *et al.*, 1988a, 1988b) e desvio da resposta para o tipo Th2 (BENARD, *et al.*, 1997).

Os linfócitos T regulatórios parecem estar diretamente relacionados com a patologia da infecção, uma vez que pacientes com as formas mais graves da doença e que ainda não iniciaram o tratamento específico apresentam maior frequência de células com o perfil $CD4^+CD25^+FoxP3^+$, característico de células T regulatórias. Estas células são capazes de inibir a proliferação T $CD4^+$ *in vitro* e diminuir a atividade efetora destas células, com diminuição na produção de IFN- γ (Comunicação pessoal – Ferreira, MC).

Embora os fenômenos desencadeantes da imunossupressão não estejam totalmente elucidados, este fenômeno pode ser produto de uma ação direta do fungo sobre os órgãos linfopoiéticos, como tem sido observado em outras micoses sistêmicas (SOTOMAYOR *et al.*, 1989, ALVAREZ *et al.*, 1995).

Nosso grupo também estabeleceu recentemente o modelo de atrofia tímica induzida por *Plasmodium berghei* NK65 (ANDRADE *et al.*, 2008).

A malária é a principal doença infecciosa em humanos responsável por 300 a 500 milhões de novos casos clínicos por ano segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). Os agentes etiológicos desta moléstia são os protozoários do gênero *Plasmodium spp* (MILLER *et al.*, 1994). Existem quatro espécies principais do gênero *Plasmodium* que infectam o homem: *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P.*

falciparum. As infecções mais freqüentes e graves ocorrem após a infecção por protozoários da espécie *Plasmodium falciparum* (GREENWOOD *et al.*, 2005).

Os vetores da doença são as fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles*, onde se encontra a forma esporozoíta do parasita transmitida para a corrente sanguínea do hospedeiro durante o repasto sanguíneo. Esta forma é capaz de invadir os hepatócitos e se desenvolver em merozoíto que por sua vez invade os eritrócitos. No interior dos eritrócitos ocorre a maior taxa de proliferação do protozoário (merozoíto) e a passagem para a fase de gametócito que parasita os mosquitos, completando o ciclo da doença (URBAN *et al.*, 2005).

Embora existam muitos estudos sobre resposta imune à malária, a complexidade do ciclo do parasita é um dos fatores que dificulta a obtenção de conhecimento sobre os mecanismos responsáveis pela imunidade protetora aos indivíduos. A resposta imune contra a malária envolve elementos da imunidade inata e adquirida. A literatura é vasta em apontar o papel de linfócitos T CD4⁺ e da citotoxicidade dos linfócitos T CD8⁺ na imunidade a malária (TSUJI *et al.*, 2003, OVERSTREET *et al.*, 2008, CHAKRAVARTY *et al.*, 2008). As células T CD4⁺ apresentam tripla função na imunidade protetora contra a fase hepática do parasita. Estas células agem sobre os linfócitos B estimulando a resposta imune humoral, auxiliam na indução de resposta citotóxica de linfócitos T CD8⁺ e inibem indiretamente, através da produção de citocinas, o desenvolvimento do estágio hepático dos parasitas (revisto por SCHOFIELD & GRAU, 2005). As células T CD8⁺ são capazes de inibir o desenvolvimento do estágio hepático do *Plasmodium spp*, prevenindo a entrada destes nos eritrócitos (CHAKRAVARTY *et al.*, 2007).

O timo configura-se como órgão central da resposta imune, uma vez que é o órgão responsável pelo desenvolvimento de linfócitos T. A integridade da arquitetura tímica e do microambiente do órgão é essencial para a correta maturação e diferenciação de timócitos, gerando o repertório e diversidade que fazem parte da resposta imune celular periférica. Além da manutenção da estrutura do órgão, a interação apropriada entre as moléculas e as células linfóides e não linfóides é imprescindível para a funcionalidade do timo.

A atrofia fisiológica ou induzida por agentes promove alterações no órgão, que afetam a sua função. Neste sentido, a ciência tem buscado moléculas com possível papel terapêutico que possam reverter o quadro de atrofia tímica (ASPINALL & MITCHELL *et al.*, 2008), permitindo o re-estabelecimento das funções do órgão. Assim, é de suma importância, o entendimento da atrofia tímica e as alterações no microambiente tímico desencadeadas por agentes patogênicos ou metabólicos que podem auxiliar no entendimento da função tímica e seu papel no estabelecimento da resposta imune periférica, contribuindo para o conhecimento mais profundo dos mecanismos envolvidos na maturação de linfócitos T.

2. Objetivos

Este estudo teve como objetivo geral:

- Investigar as alterações morfológicas e funcionais desencadeadas por diferentes agentes promotores de atrofia tímica, visando agregar subsídios para o melhor entendimento da função do timo durante importantes doenças infecciosas ou metabólicas.

Para tal, foram analisados (as):

- Os elementos de matriz e seus receptores, essenciais para a adesão e migração;
- A expressão de quimiocinas e seus receptores importantes na migração intratímica e na exportação de linfócitos T para a periferia;
- As subpopulações de timócitos, para avaliar possíveis alterações na frequência;
- A capacidade migratória de timócitos através de ensaios de transmigração *ex vivo* e,
- As subpopulações de linfócitos T no baço de animais infectados ou com diabetes, para estabelecer uma possível relação com migração *ex vivo*.

Este estudo teve como objetivo geral:

- Investigar as alterações morfológicas e funcionais desencadeadas por diferentes agentes promotores de atrofia tímica, visando agregar subsídios para o melhor entendimento da função do timo durante importantes doenças infecciosas ou metabólicas.

Para tal, foram analisados (as):

- Os elementos de matriz e seus receptores, essenciais para a adesão e migração;
- A expressão de quimiocinas e seus receptores importantes na migração intratímica e na exportação de linfócitos T para a periferia;
- As subpopulações de timócitos, para avaliar possíveis alterações em sua frequência;
- A capacidade migratória de timócitos através de ensaios de transmigração *ex vivo* e,
- As subpopulações de linfócitos T no baço de animais infectados ou com diabetes, para estabelecer uma possível relação com a migração *ex vivo*.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Camundongos machos, obtidos do CEMIB-UNICAMP a partir de colônias livres de patógenos específicos (SPF), da linhagem BALB/c e com 8 semanas de idade foram utilizados neste estudo. Os animais foram mantidos, durante todo o período experimental, em microisoladores acondicionados em “racks” (ALESCO, Monte-Mor, Campinas, Brasil) ventiladas com água e ração estéreis, fornecidas em livre demanda, e com um ciclo de fotoperíodo de 12h/12h. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas propostas pelo Conselho Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Unicamp (CEEAA/Unicamp).

3.2. Estabelecimento dos modelos de atrofia tímica.

Para o estabelecimento do modelo de atrofia tímica induzida pelo *P.brasiliensis*, utilizamos o isolado virulento denominado Pb18, gentilmente cedido pela Prof^a Dr^a Vera L. G. Calich do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP). O isolado tem sido mantido, em nosso laboratório, na fase leveduriforme em meio de cultivo de Fava Netto a 37°C, sendo repicado a cada 15 dias. Para o preparo da suspensão fúngica, a cepa de *P. brasiliensis* foi cultivada em meio de Fava Netto e coletada em sua fase de crescimento exponencial (após 7 dias de cultivo). As células fúngicas foram ressuspensas em Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS) estéril pH 7,2, agitadas em agitador tipo Vortex, em dois ciclos de 15 segundos cada,

centrifugadas por 10 minutos a 300 x g e lavadas por 2 vezes em PBS. O número total de células fúngicas presentes na suspensão foi determinado por contagem em câmara de Neubauer e a suspensão final ajustada para 2×10^7 fungos/mL, sendo a viabilidade determinada pela coloração vital Azul de Algodão.

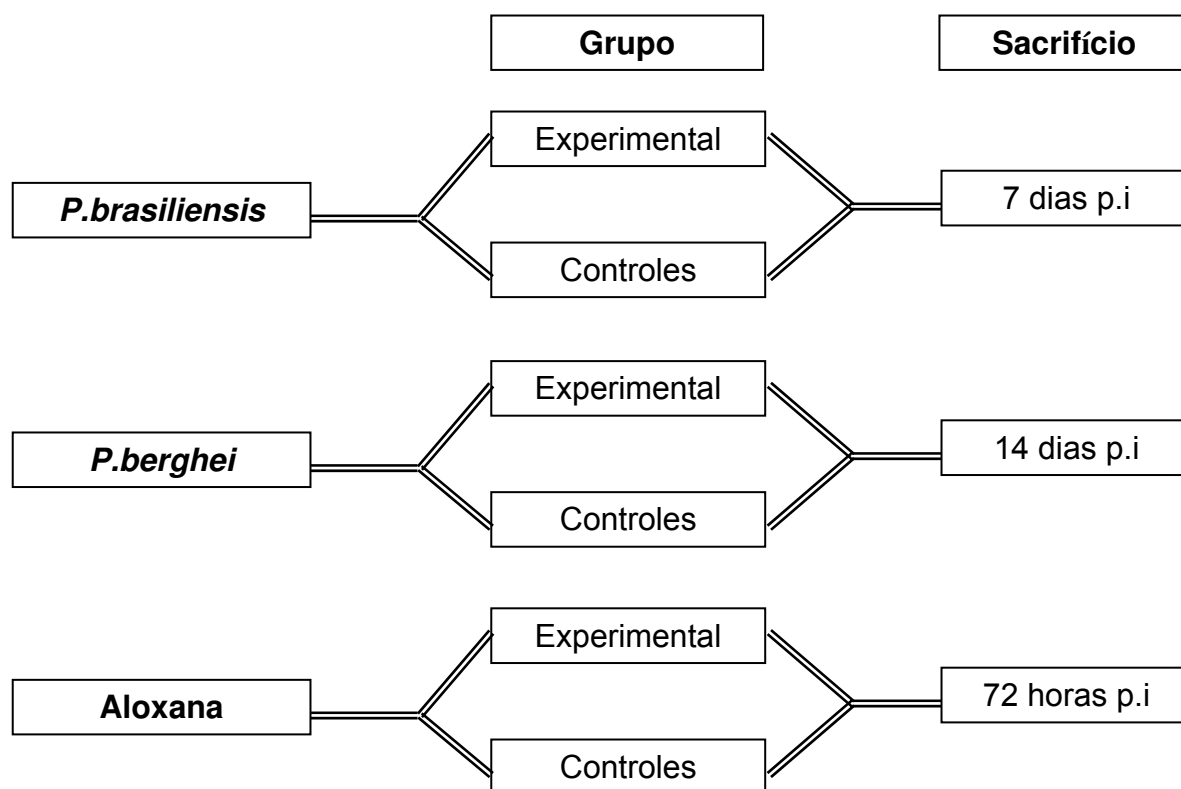
O modelo de atrofia tímica induzida pelo parasita foi obtido utilizando-se o isolado virulento *Plasmodium berghei* cepa NK65A, cedido pelo Profº Drº Fábio T. M. Costa do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Campinas (UNICAMP). Antes de cada infecção, amostras congeladas do parasita foram inoculadas em animal repique. Após 14 dias aproximadamente, estes animais foram sacrificados e uma pequena alíquota do sangue foi colocada em lâmina de vidro, corada com Giemsa e as hemácias parasitadas foram contadas para a determinação da porcentagem de infecção. O sangue coletado em tubos com heparina contendo 300µl de PBS foi centrifugado por três vezes de 5 minutos a 1500rpm, após, o sobrenadante foi retirado e o pellet ressuspenso em 1 ml de PBS. O número total de células presente na suspensão foi determinado por contagem em câmara de Neubauer e a suspensão final ajustada para 5×10^6 hemácias parasitadas/ml e 200µl de solução foi inoculada em cada animal via intraperitoneal.

Para a obtenção de um modelo de atrofia tímica não infecciosa, nós procedemos a indução de diabetes. Camundongos BALB/c machos com 8 semanas de idade receberam uma única dose de aloxana (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) na concentração de 60mg/kg diluída em solução salina estéril, através da veia caudal. Os animais controles receberam PBS. Após 48 horas da indução, os níveis de glicose foram medidos e os

animais que apresentaram taxa acima de 200mg/dl foram considerados diabéticos e após 24 horas os animais foram mortos e seus timos retirados para os experimentos subseqüentes.

3.3. Delineamento experimental

Para cada modelo de atrofia, foram utilizados 5 animais controle e 7 animais infectados. Os animais foram anestesiados com quetamina (60mg/Kg) e xilazina (20mg/kg) e o timo e o baço retirados para utilização nos experimentos propostos.



3.4. Detecção do *P.berghei* no timo de animais infectados

A detecção do parasita no interior do órgão foi realizada através de PCR. Após 14 dias de infecção, os animais foram sacrificados e perfundidos com ACK através do coração para a prevenção de contaminação por eritrócitos. Os timos coletados foram enzimaticamente digeridos em solução contendo proteinase K para a extração de DNA. Após, o DNA foi purificado com fenol clorofórmio (invitrogen, Carisbad, CA, EUA) e precipitado com etanol 100% e acetato de sódio 3M, após, foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em água ultra-pura. O controle da amplificação foi realizado com β - actina murina (sense: BA1 5'-ATGGATGACGATATCGCT-3' e anti-sense: BA2 5'-ATGAGGTAGTCTGTCAGGT - 3'). Para detecção do parasita foram utilizados oligonucleotídeos baseados no gene do RNA ribossomal do protozoário (sense rPLU3 5'-TTTTTATAAGGATACGGAAAAGCTGT-3' e anti-sense rPLU4 5'-TACCCGTCATAGCCATGTTAGGCCAATACC-3' [15]. A amplificação de DNA seguiu o seguinte programa: um ciclo de desnaturação de 5 minutos a 94 °C, seguido por 45 ciclos de 1 minuto 94 °C , 1 minuto e 30 segundos a 63 °C e 1 minuto a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 2%.

A presença de *P.brasiliensis* no timo de animais já foi documentada por nosso grupo (BRITO *et al.*, 2003).

3.5. Índice tímico

Animais de todos os grupos experimentais foram anestesiados, utilizando a dosagem de 100 mg/Kg de hidroclorido de quetamina e 5 mg/Kg de cloridrato de xilazina e pesados. Os timos foram coletados, individualmente pesados e o índice tímico calculado de acordo com a seguinte equação: peso do órgão (g) / peso do animal (g) x 100.

3.6. Detecção por Imunofluorescência para laminina e fibronectina

Os timos e baços de todos os grupos experimentais foram embebidos em Tissue-Tek (LEICA Instruments - Germany) e subsequentemente congelados a -70°C. Cortes de 5 µm de espessura foram assentados em lâminas silanizadas Easypath (Erviagas, São Paulo, SP, Brasil) fixados com acetona, bloqueados com PBS- molico 10% / BSA 2% e StartBlock (Pierce, Rockford, Illinois, EUA). As lâminas foram incubadas com os anticorpos anti-fibronectina ou anti-laminina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA,) overnight, em seguida foram lavadas cinco vezes com PBS e depois incubadas por 30 minutos com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com FITC (fluoresceína) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA, EUA). As amostras foram analisadas em microscópio de fluorescência Olympus e as imagens obtidas foram quantificadas através do software Image J (COLLINS, 2007).

3.7. Análise por citometria de fluxo das subpopulações de timócitos e expressão de receptores.

Após o sacrifício dos animais, os timos de todos os grupos experimentais foram retirados e processados para análise por citometria de fluxo. O órgão foi macerado em 1ml de PBS/Soro Fetal Bovino 5%, o número de células presentes na solução estimado por contagem em câmara de Neubauer e a suspensão ajustada para 10^6 células por poço. As células foram então depositadas em placas de 96 wells com fundo em U e incubadas com os seguintes anticorpos FITC/anti-CD4 (clone GK1.5), Alexa Fluor 647/anti-CD8 (clone 53-6.7), PeCy-7/anti-CD3 (clone 145-2C11), PE/anti-CD49d (clone 9C10), PE/anti-CD49e (clone 5H10-27), PE/anti-CD49f (clone GOH3), PE/anti-CXCR4 (clone B11/CXCR4) e PE/anti-CCR9 (clone 242503). (Pharmlngen, San Diego, Califórnia, EUA), por 20 minutos a 4° C. Após este tempo, procedeu-se a lavagem com adição de PBS aos poços e a placa foi submetida a centrifugação por 10 minutos a 1500rpm, em seguida as células foram fixadas com formaldeído 1% e submetidas a leitura no citômetro de fluxo FACsCanto (BD Pharmlngen, San Diego, Califórnia, EUA). A análise dos dados adquiridos foi realizada no software FCS Express V3. A expressão dos receptores nas diferentes subpopulações foi analisada a partir da média da intensidade de fluorescência (MIF).

3.8. Extração de RNA e síntese de cDNA

Após o sacrifício dos animais, os timos de todos os grupos experimentais foram retirados e submetidos a extração de RNA total através do Kit

Illustra RNAspin Mini (GE Healthcare, Amersham, UK). Os timos foram macerados em tampão de lise contendo β -mercaptoetanol, após a obtenção do macerado, foi adicionado etanol 70%. A solução foi, subseqüentemente, submetida à centrifugação em diferentes colunas para adsorção do RNA. Após a extração o RNA foi eluído da coluna com 50ul de água ultra-pura e as amostras congelados a -70° C. O RNA foi ainda quantificado em gel de agarose para verificação de integridade (presença das bandas de RNA 18S e 28S).

Para a síntese de cDNA foi utilizado o Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados aproximadamente 2ug de cada amostra de RNA para a síntese de cDNA, o qual foi quantificado no espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) para posterior utilização em experimentos de quantificação por PCR em tempo real.

3.9. Expressão de quimiocinas através de PCR em tempo real

A expressão gênica das quimiocinas foi avaliada através PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). As reações foram realizadas no aparelho ABI Prism 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As reações foram feitas em placa de 96 wells, com volume 20ul utilizando TaqMan PCR Master Mix™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Diferentes oligonucleotídeos e probes para a amplificação do controle endógeno RNA 18S (ensaio Hs99999901_s1) e dos alvos CXCL12 (ensaio Mm00446190_m1) e CCL25 (Mm00439616_m1l.) foram utilizados no ensaio. A expressão gênica das

quimiocinas nos grupos controle, Pb, malária e diabetes foram representadas como o número relativo de cópias usando o método do ciclo delta threshold ($2^{-\Delta Ct}$) (OVERBERGH, *et al.*, 2003).

3.10. Ensaios de transmigração através de placas de “transwell”.

Para avaliar alterações nos padrões de migração de timócitos frente a diferentes estímulos, timócitos de todos os grupos experimentais foram submetidos a ensaios de migração realizados em placas de transwell (Corning Costar, Cambridge, EUA) com poros de 5µm.

As membranas foram previamente incubadas com 10µg/ml de BSA, fibronectina, laminina ou PBS por 1 hora a 37°C e então bloqueadas com PBS/BSA 0,5% por 45 minutos a 37°C. Após o bloqueio, foi adicionado aos poços inferiores das câmaras somente meio de cultura (RPMI/BSA1%) ou meio contendo as quimiocinas CXCL12 ou CCL25 (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), na concentração de 400ng/ml. Os timócitos (2.5×10^6 in 100µl RPMI/BSA 1%) foram colocados na parte superior da câmara e após 3 horas 37°C em incubadora de CO₂, a migração foi definida pela contagem das células na parte inferior da câmara. O meio de cultura utilizado no experimento é livre de soro fetal bovino, para prevenir a migração por fibronectina e outros fatores solúveis presentes neste material. As células que migraram foram contadas em câmara de Neubauer e marcadas com os anticorpos anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 para análise das subpopulações através de citometria de fluxo.

3.11. Análise estatística

A análise estatística e os gráficos foram confeccionados no software GraphPad Prism 5,0. Os dados obtidos foram submetidos ao teste não paramétrico de Mann-Whitney e os resultados considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

4. Resultados

4.1. Alterações no modelo de atrofia tímica induzida por *Paracoccidioides brasiliensis*

4.1.1. índice Tímico

O timo de animais inoculados com *P.brasiliensis*, apresenta aos sete dias pós inoculo, perda do peso relativo do órgão, quando comparado aos controles (Figura 2).

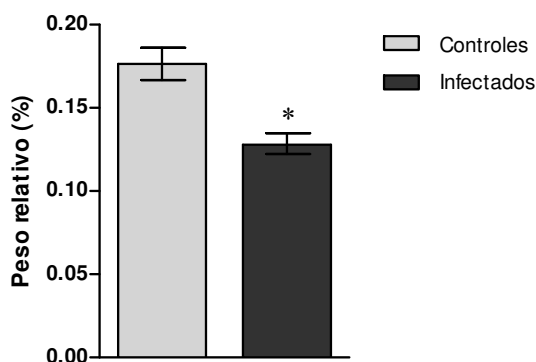


Figura 2: Atrofia tímica em animais infectados por *P.brasiliensis* Perda de peso relativo do órgão aos 7 dias de inoculação.

4.1.2. Avaliação da densidade de elementos de matriz extracelular através de imunofluorescência

No timo, os elementos de matriz extracelular são componentes essenciais na migração dos timócitos, entre eles destacam-se fibronectina e a laminina, localizadas em todo o parênquima tímico.

A análise de fibronectina do timo de animais infectados com *P. brasiliensis* não revelou alterações significativas em relação aos animais controle (Figura 3A e

3B, respectivamente). A quantificação da marcação através do programa ImageJ confirmou os resultados obtidos por imunofluorescência (Figura 3C). A densidade de laminina também não se alterou no timo de animais infectados em relação aos controles (Figura 3D e 3E, respectivamente). A quantificação da marcação através do software ImageJ confirmou os resultados obtidos através da marcação específica (Figura 3F).

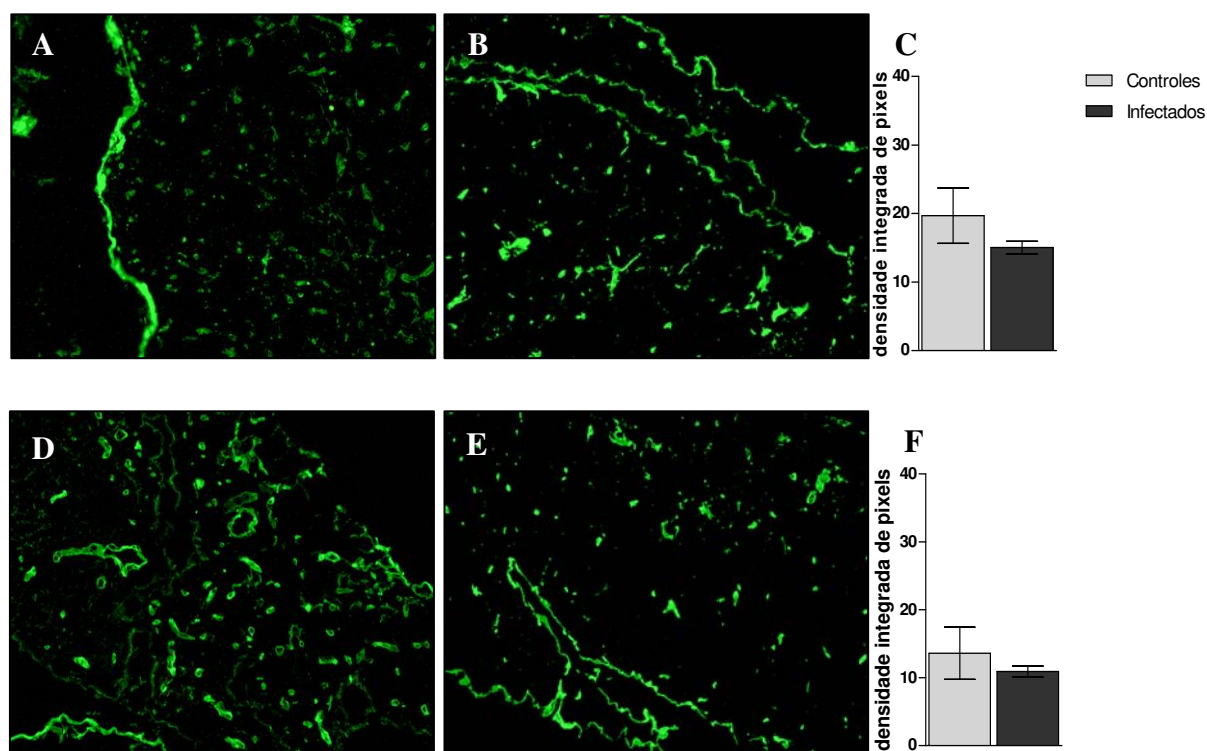


Figura 3: Imunofluorescência para elementos de matriz extracelular. (A) Marcação para fibronectina em animais infectados com *P.brasiliensis* e (B) em animais controle. Magnitude 100x. (C) Análise quantitativa da expressão de fibronectina, sem alterações entre controles e infectados. (D) Marcação para laminina em animais infectados com *P.brasiliensis* e (E) em animais controle. Magnitude 100x. (F) Análise quantitativa da expressão de laminina, sem alterações entre controles e infectados.

4.1.3. Análise da expressão de VLA-4 (CD49d/CD29) e VLA-5 (CD49e/CD29), receptores para fibronectina, e VLA-6 (CD49f/CD29), receptor para laminina

Os elementos de matriz encontram receptores específicos expressos na membrana das diferentes subpopulações de timócitos. A fibronectina possui dois receptores distintos, VLA- 4 e VLA-5 e a laminina, o VLA-6. A análise dos receptores de fibronectina no timo de animais infectados com *P. brasiliensis* apresentou alterações significativas em relação ao timo de animais controle.

A expressão do receptor VLA-4 apresentou, nos animais infectados, queda na intensidade de fluorescência na subpopulação de duplo negativos, conforme demonstrado no histograma (Figura 4A) e no gráfico (figura 4B). Nota-se também, queda no número relativo de timócitos totais, duplo positivos e duplo-negativos que expressam VLA-4 no timo de animais infectados quando comparados aos controles. (Figura 4C).

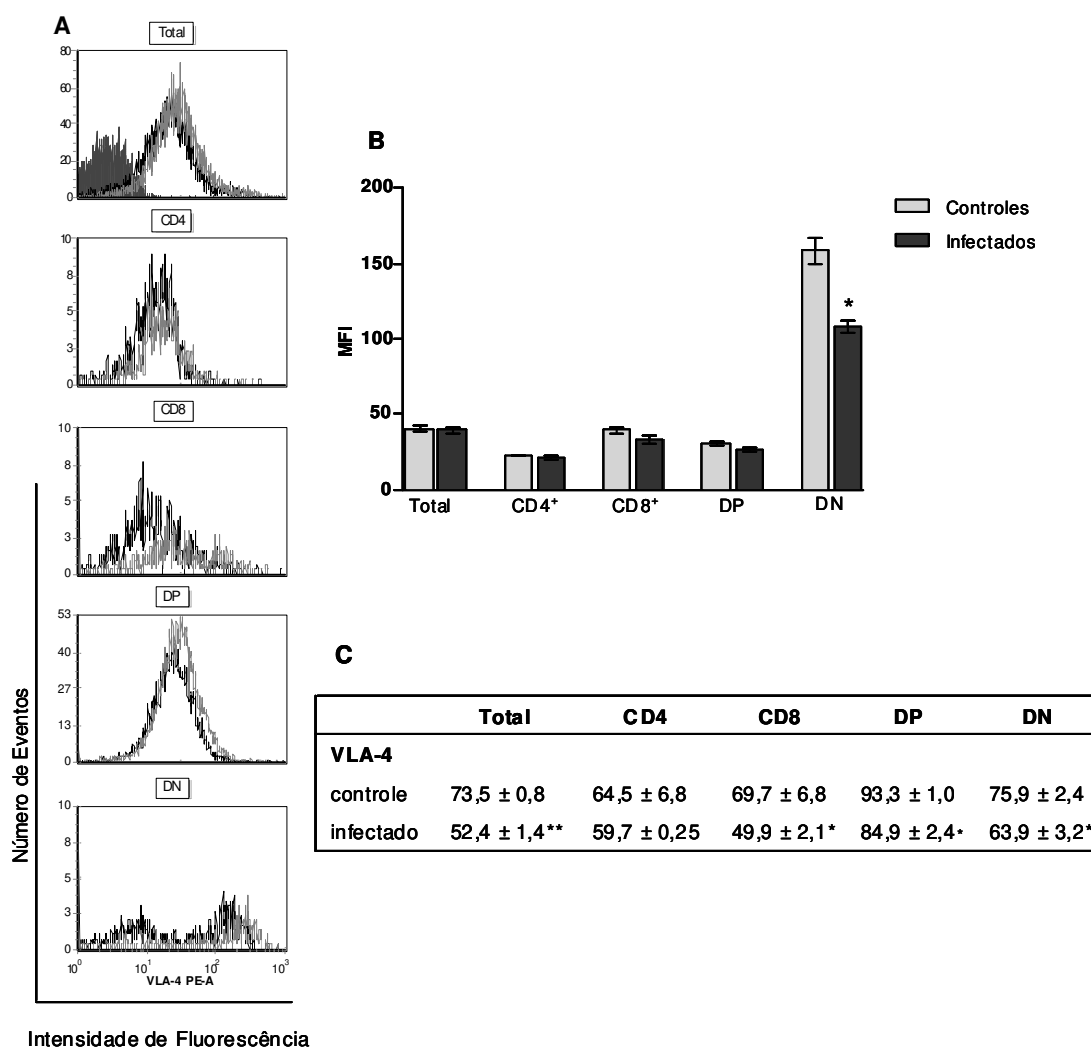


Figura 4: Citometria de Fluxo para expressão do receptor VLA-4 no total de timócitos e nas subpopulações definidas por CD4 e CD8. O histograma cheio representa o controle de isotipo, o histograma aberto cinza e o preto representam, respectivamente, a expressão do receptor nos animais controle e infectados. **(A)** Histograma representativo da expressão de VLA-4 nos timócitos de animais controle e infectado. **(B)** Expressão de VLA-4 representada pela média de intensidade de fluorescência (MFI) **(C)** Número relativo de timócitos que expressam VLA-4. Resultados expressos em média ± SE de cinco animais. * $p \leq 0.05$ e ** $p \leq 0.01$.

O receptor VLA-5 também apresentou alteração nos animais infectados quando comparados aos controles. Observa-se a diminuição na expressão de VLA-5 em timócitos totais, duplo positivos e duplo negativos de animais infectados em relação aos controles, conforme demonstrado no histograma (Figura 5A) e no gráfico (figura 5B). Houve ainda, aumento na porcentagem de timócitos CD8⁺ de animais infectados que expressam o receptor VLA-5 em sua superfície (Figura 5C).

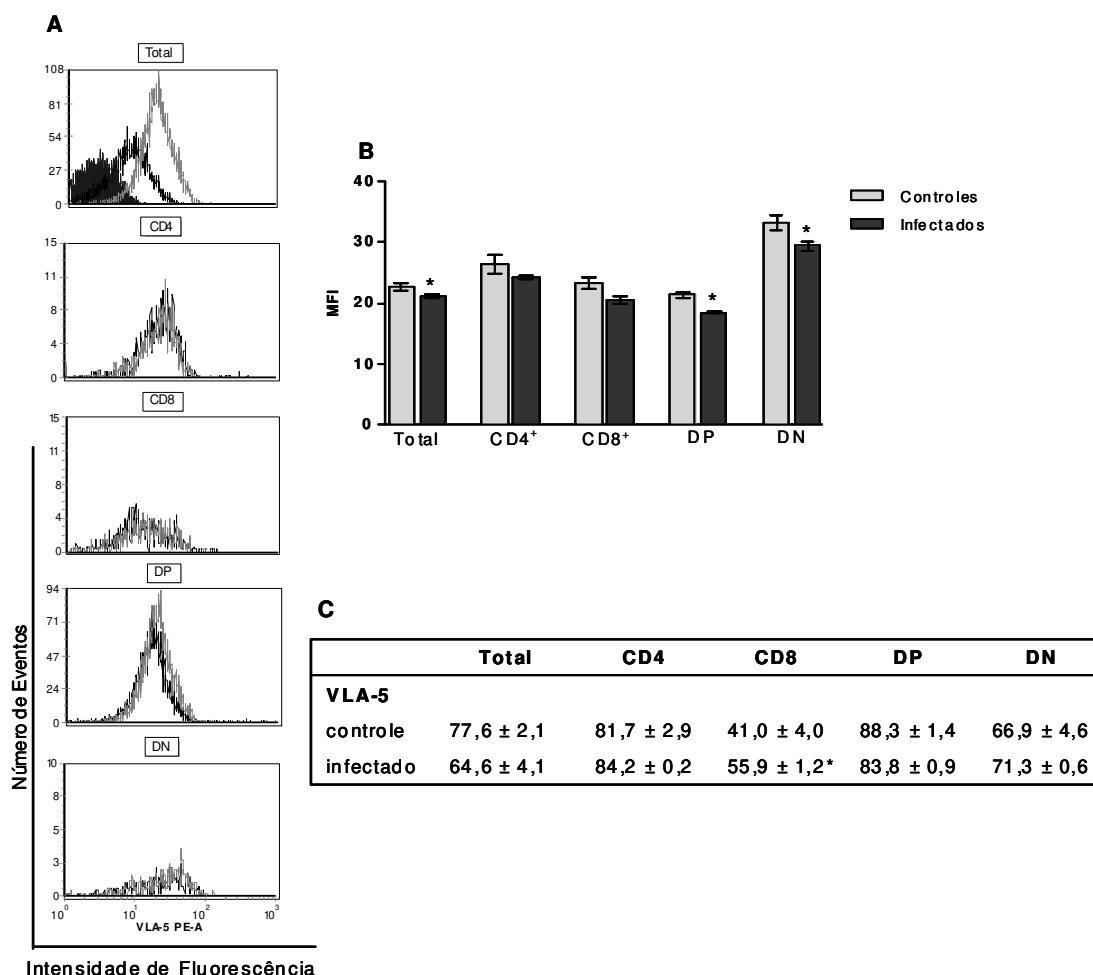


Figura 5: Citometria de Fluxo para expressão do receptor VLA-5 no total de timócitos e nas subpopulações definidas por CD4 e CD8. O histograma cheio representa o controle de isótipo, o histograma aberto cinza e o preto representam, respectivamente, a expressão do receptor nos animais controle e infectados. **(A)** Histograma representativo da expressão de VLA-5 nos timócitos de animais controle e infectado. **(B)** Expressão de VLA-5 representada pela média de intensidade de fluorescência (MFI) **(C)** Número relativo de timócitos que expressam VLA-5. Resultados expressos em média ± SE de cinco animais. * $p \leq 0.05$.

Timócitos de animais infectados apresentaram acentuadas alterações com diminuição na expressão de VLA-6 em todas as subpopulações analisadas como demonstrado na (Figura 6A) e no gráfico (figura 6B). Observa-se também queda

no número relativo de timócitos totais, CD4 e duplo negativos que expressam VLA-6 (Figura 6C).

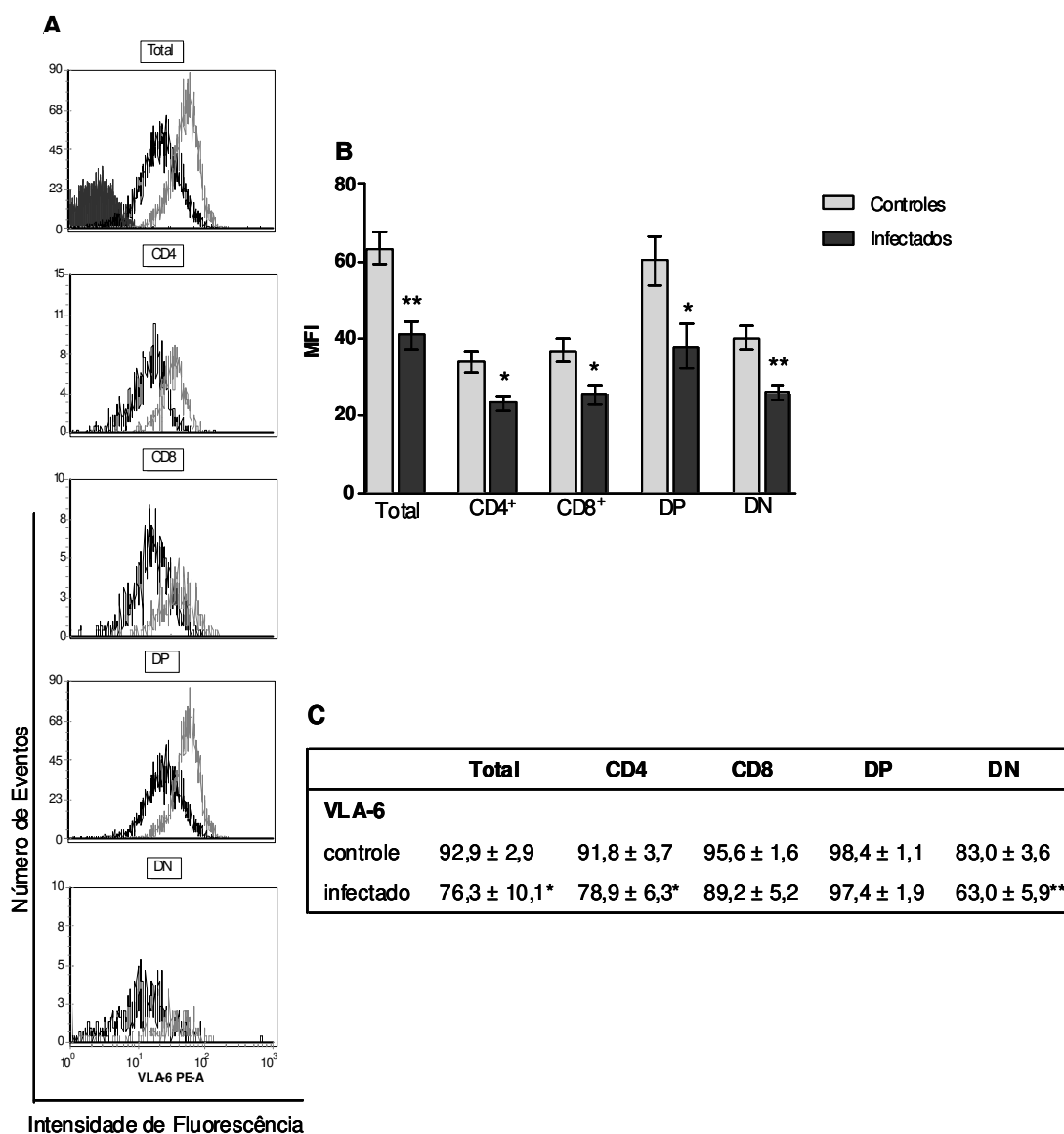


Figura 6: Citometria de Fluxo para expressão do receptor VLA-6 no total de timócitos e nas subpopulações definidas por CD4 e CD8. O histograma cheio representa o controle de isotipo, o histograma aberto cinza e o preto representam, respectivamente, a expressão do receptor nos animais controle e infectados. **(A)** Histograma representativo da expressão de VLA-6 nos timócitos de animais controle e infectado. **(B)** Expressão de VLA-6 representada pela média de intensidade de fluorescência (MFI) **(C)** Número relativo de timócitos que expressam VLA-6. Resultados expressos em média ± SE de cinco animais. * $p \leq 0.05$ e ** $p \leq 0.01$.

4.1.4. Análise da expressão de CXCL12 e CCL25

Para avaliar possíveis alterações na expressão de quimiocinas, desencadeadas pela infecção por *P.brasiliensis*, foi realizada a quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real. O timo de animais infectados revelou queda na expressão de CXCL12 quando comparado ao grupo controle (Figura 7A). Já, a expressão da quimiocina CCL25 não revelou alterações significativas em relação ao timo de animais controle, embora tenha apresentado uma tendência à queda (Figura 7B).

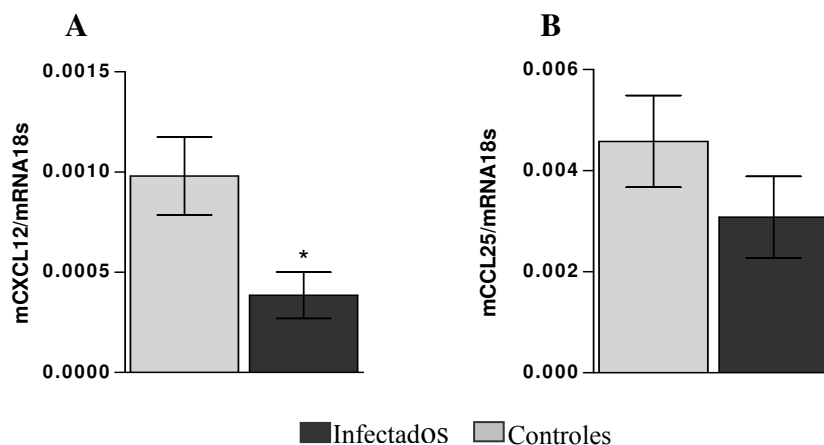


Figura 7: PCR em tempo real para a expressão gênica de quimiocinas (A) Expressão gênica de CXCL12 (B) Expressão gênica de CCL25. Resultados expressos em média \pm SE de quatro animais. * $p \leq 0.05$.

4.1.5. Alterações nos receptores de quimiocinas CXCR4 e CCR9

A expressão do receptor não apresentou modificações nas subpopulações de timócitos de animais infectados em relação aos controles, conforme histograma

(Figura 8A) e gráfico (figura 8B). Contudo, houve aumento no número relativo de timócitos totais CD8⁺ que expressam CXCR4 (figura 8C).

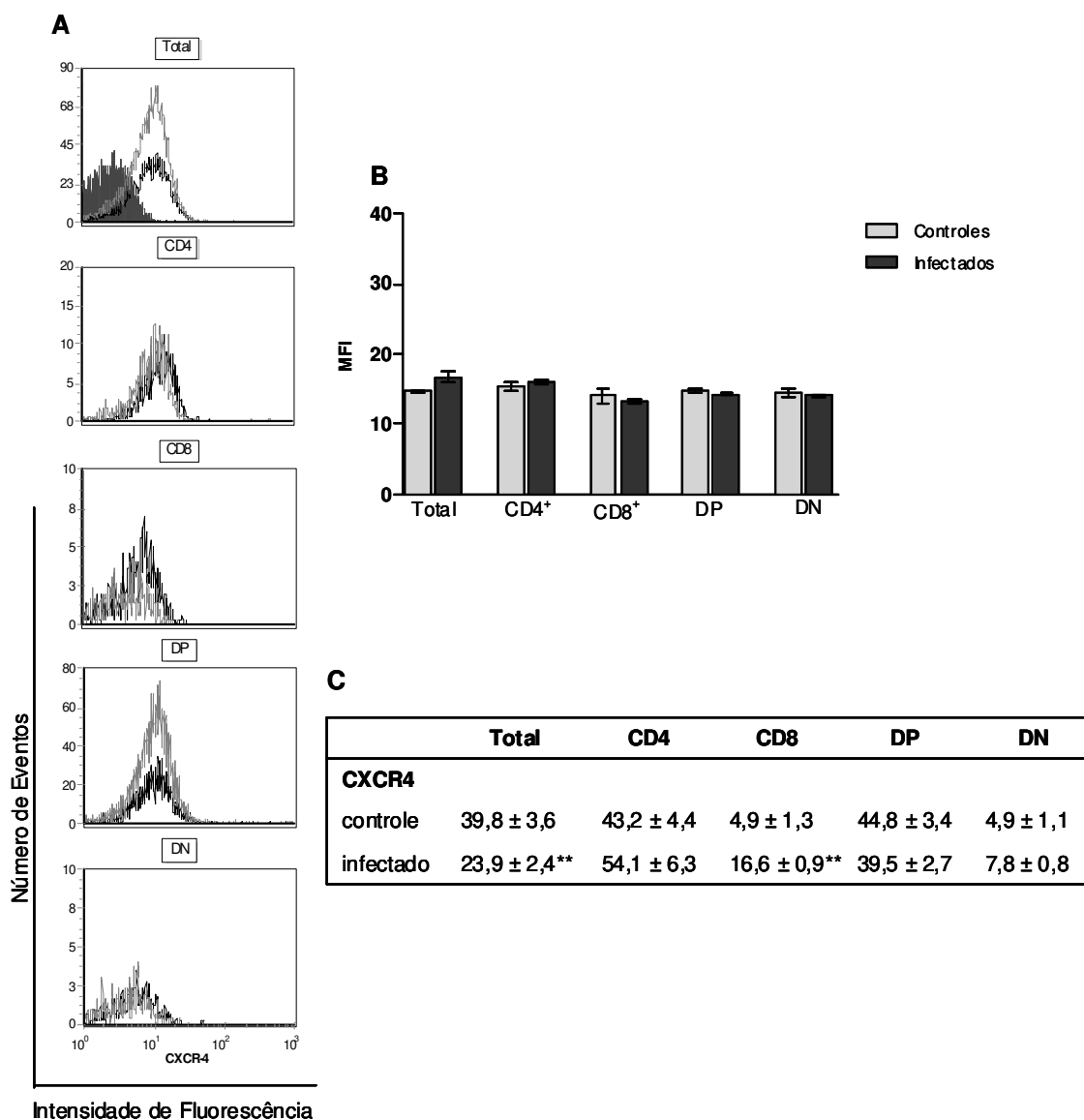


Figura 8: Citometria de Fluxo para expressão do receptor CXCR4 no total de timócitos e nas subpopulações definidas por CD4 e CD8. O histograma cheio representa o controle de isotipo, o histograma aberto cinza e o preto representam, respectivamente, a expressão do receptor nos animais controle e infectados. **(A)** Histograma representativo da expressão de CXCR4 nos timócitos de animais controle e infectado. **(B)** Expressão de CXCR4 representada pela média de intensidade de fluorescência (MFI) **(C)** Número relativo de timócitos que expressam CXCR4. Resultados expressos em média ± SE de cinco animais. ** $p \leq 0.01$.

Em relação ao CCR9, observa-se aumento da densidade do receptor na superfície dos timócitos duplo negativos e CD8⁺ de animais infectados quando comparados aos controles, conforme histograma (Figura 9A) e gráfico (figura 9B). Quanto ao número relativo foi possível observar redução somente de timócitos totais, CD4⁺, CD8⁺ e DN que expressam o receptor (figura 9C).

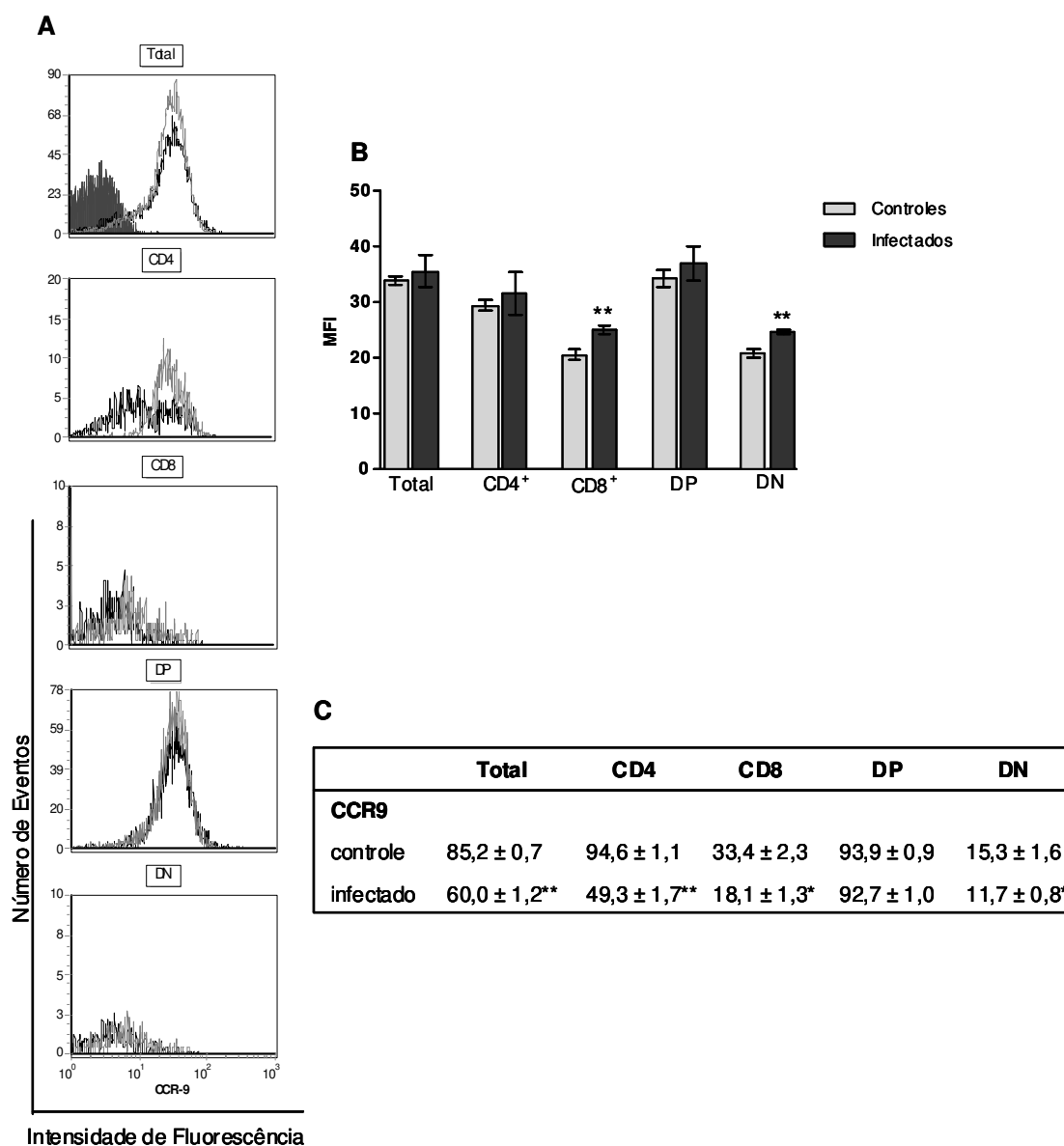


Figura 9: Citometria de Fluxo para expressão do receptor CCR9 no total de timócitos e nas subpopulações definidas por CD4 e CD8. O histograma cheio representa o controle de isótipo, o histograma aberto cinza e o preto representam, respectivamente, a expressão do receptor nos animais controle e infectados. **(A)** Histograma representativo da expressão de CCR9 nos timócitos de animais controle e infectado. **(B)** Expressão de CCR9 representada pela média de intensidade de fluorescência (MFI) **(C)** Número relativo de timócitos que expressam CCR9. Resultados expressos em média ± SE de cinco animais. ** $p \leq 0.01$.

4.1.6. Avaliação *ex vivo* do potencial migratório de timócitos através de ensaios de migração

Para avaliarmos um possível impacto das alterações descritas no timo sobre a migração funcional dos timócitos, realizamos ensaios de migração utilizando câmaras de “transwell”.

Os ensaios de migração, utilizando diferentes estímulos sozinhos ou combinados, revelaram alterações significativas entre timócitos provenientes de animais infectados com *P.brasiliensis* e timócitos de animais controle, conforme demonstrado na figura 10A.

Timócitos de animais infectados apresentam queda na atividade migratória, comparados aos controles, quando utilizam-se isoladamente os elementos de matriz extracelular fibronectina ou laminina como estímulos. O mesmo fenômeno é observado quando utilizamos como estímulo somente a quimiocina CXCL12 ou CCL25.

A ação conjunta de fibronectina ou laminina e CXCL12 ou CCL25 também causou inibição da migração em timócitos de animais infectados quando comparados aos controles.

Para avaliar uma possível relação entre os distúrbios na migração *ex vivo* e com a migração *in vivo*, foram analisadas as subpopulações de linfócitos T no baço de animais controle e infectados.

A análise de tais subpopulações demonstrou que o baço de animais infectados possui discreto decréscimo, em números absolutos, da população de linfócitos T CD4⁺ quando comparado aos controles (Figura 10B).

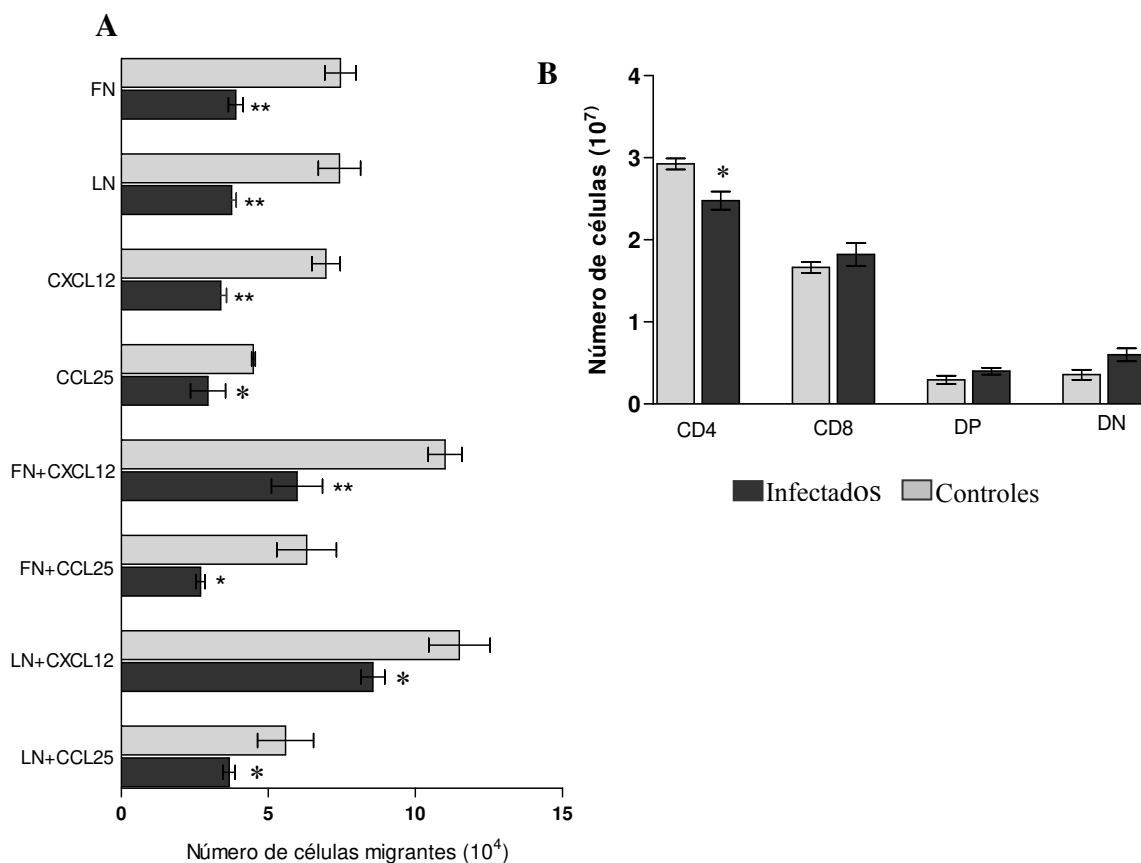


Figura 10: Análise de migração *ex vivo* através de câmaras de “transwell”. **(A)** Migração de timócitos frente a diferentes estímulos. **(B)**. Análise das subpopulações de linfócitos T no baço de animais infectados e controles. Resultados expressos em média \pm SE derivados de 5 experimentos cada um com pool de 4 animais. * $p \leq 0.05$ e ** $p \leq 0.01$.

A análise das subpopulações de timócitos que migraram frente aos estímulos, sozinhos ou combinados, demonstrou que a migração de timócitos CD4⁺ dos animais infectados varia de acordo com o estímulo utilizado, com fibronectina sozinha migram menos e com fibronectina ou laminina combinada

com CXCL12 migra mais que os controles. Os timócitos CD8⁺ de animais infectados migram mais do que os controles quando o estímulo utilizado é a laminina combinada com a quimiocina CCL25. subpopulação de duplo positivos migra em menor porcentagem quando comparada aos controles frente a aos estímulos sozinhos ou em combinação (Figura 11A e 11B). Interessantemente este perfil é o mesmo encontrado na análise das subpopulações de linfócitos do baço de animais infectados.

	CD4 ⁺	CD8 ⁺	DP	DN
Fibronectina				
<i>Controles</i>	2,01±0,25	0,65±0,15	4,1±0,12	0,72±0,05
<i>infectados</i>	0,99±0,07*	0,60±0,13	2,07±0,35*	0,40±0,13
Laminina				
<i>Controles</i>	1,71±0,20	0,70±0,11	3,79±0,66	0,58±0,16
<i>infectados</i>	1,34±0,02	1,45±0,54	1,43±0,05*	0,40±0,06
CXCL12				
<i>Controles</i>	0,90±0,31	0,44±0,06	4,35±0,80	0,21±0,01
<i>infectados</i>	0,87±0,10	0,61±0,13	1,81±0,02*	0,29±0,01
CCL25				
<i>Controles</i>	0,55±0,18	0,26±0,06	2,72±0,42	0,11±0,02
<i>infectados</i>	0,77±0,35	0,35±0,18	1,49±0,33*	0,31±0,13
	CD4 ⁺	CD8 ⁺	DP	DN
Fibronectina +CXCL12				
<i>Controles</i>	1,06±0,32	0,49±0,17	5,50±1,33	0,32±0,09
<i>infectados</i>	1,35±0,23*	0,57±0,14	3,12±0,60*	0,41±0,05
Fibronectina +CCL25				
<i>Controles</i>	0,73±0,14	0,24±0,07	3,43±0,73	0,22±0,06
<i>infectados</i>	0,79±0,02	0,24±0,04	1,38±0,15*	0,18±0,01
Laminina+CXCL12				
<i>Controles</i>	1,64±0,35	0,84±0,18	4,89±0,46	0,32±0,31
<i>infectados</i>	2,52±0,03*	1,23±0,02	4,61±0,08	0,57±0,12
Laminina +CCL25				
<i>Controles</i>	0,57±0,15	0,22±0,07	2,90±0,39	0,26±0,02
<i>infectados</i>	0,89±0,07	1,79±0,12**	1,79±0,14*	0,57±0,22

Tabela1: Número relativo das subpopulações de timócitos que migraram frente aos estímulos. **(A)** Análise de timócitos que migraram frente ao estímulo utilizado sozinho. **(B)** Análise de timócitos que migraram frente ao estímulo utilizados em combinação. Resultados expressos em média ± SE derivados de 5 experimentos cada um com pool de 4 animais. * p≤0.05 e ** p≤0.01.

4.2. Alterações no timo de animais infectados com *Plasmodium berghei* cepa NK65.

4.2.1. Índice tímico

Para avaliar o ponto de maior atrofia tímica, animais inoculados com *Plasmodium berghei* NK65, foram sacrificados aos 3, 7 e 14 dias após a infecção. Conforme mostra a figura 11, não houve atrofia após três dias de infecção. Aos sete dias, o timo já apresenta perda relativa do seu peso e esta atrofia tornou-se acentuada no 14^o dia após a infecção.

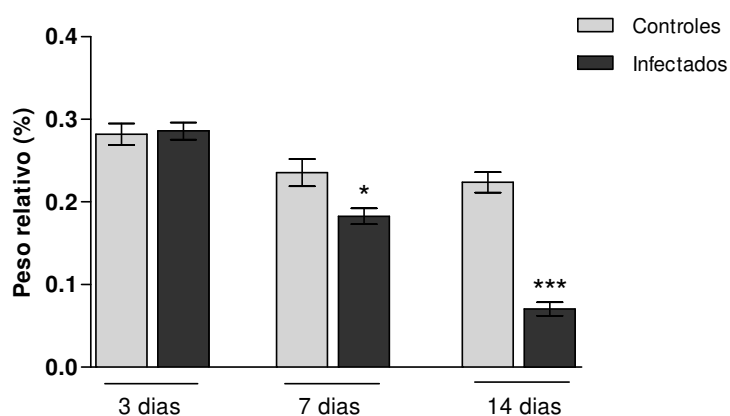


Figura 11: Atrofia tímica em animais infectados por *P.berghei*. Perda de peso relativo do órgão aos 7 dias de infecção e atrofia acentuada aos 14 dias de infecção. Resultados expressos em média \pm SE. * $p \leq 0.05$ e *** $p \leq 0.001$.

4.2.2. Detecção do *P.berghei* no timo de animais infectados

A detecção *Plasmodium berghei* no timo de animais infectados foi realizada através de PCR específico, onde seqüências específicas de RNA ribossomal do protozoário foram amplificadas. O PCR foi positivo no timo de animais infectados com *P. berghei* aos 7 e 14 dias após a infecção, mas, interessante mente mostrou-se negativo aos três dias de infecção, período no qual não detectamos atrofia do órgão (Figura 12).

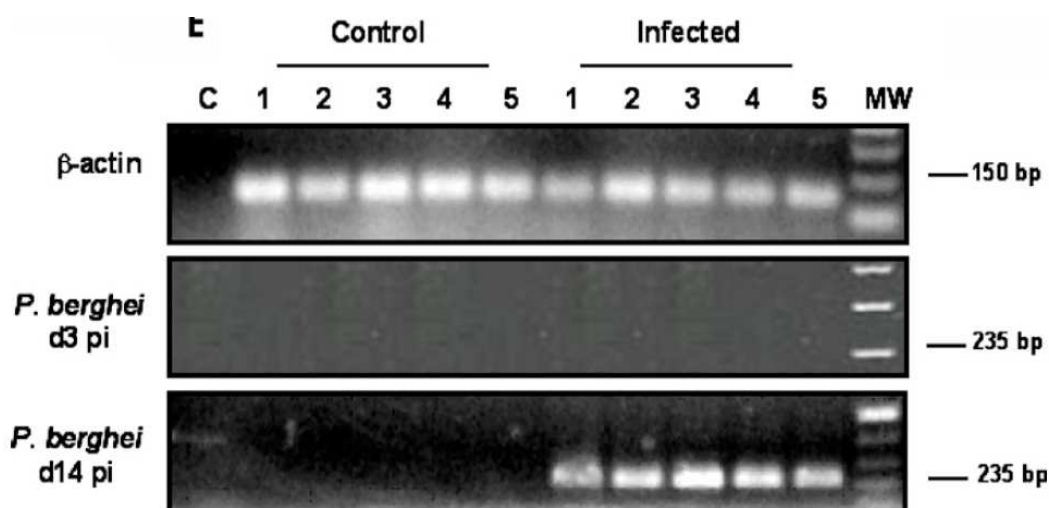


Figura 12: Detecção do *P.berghei* no interior do órgão por PCR. Aos 3 dias de infecção não se observa amplificação de produto específico de PCR. No 14º dia após a inoculação, detecta-se produto específico do parasita, que demonstra sua presença no parênquima tímico.

4.2.3. Avaliação da densidade de elementos de matriz extracelular

A análise qualitativa de fibronectina, através de imunofluorescência, revelou maior densidade deste elemento de matriz no timo de animais infectados com *P. berghei*, após 13 dias de inoculação, quando comparados aos controles (Figura 13A e 13B, respectivamente). A quantificação deste elemento através de análise

das imagens obtidas confirmou os resultados observados por imunofluorescência (Figura 13C).

A imunomarcacão para laminina também revelou aumento de densidade no timo de animais infectados quando comparado aos controles (Figura 13D e 13E, respectivamente). A quantificacão das imagens obtidas ratificou a análise qualitativa deste elemento (Figura 13F). Qualitativamente, foi possível observar maior densidade de laminina do que de fibronectina no timo de animais infectados com *P. berghei* NK65

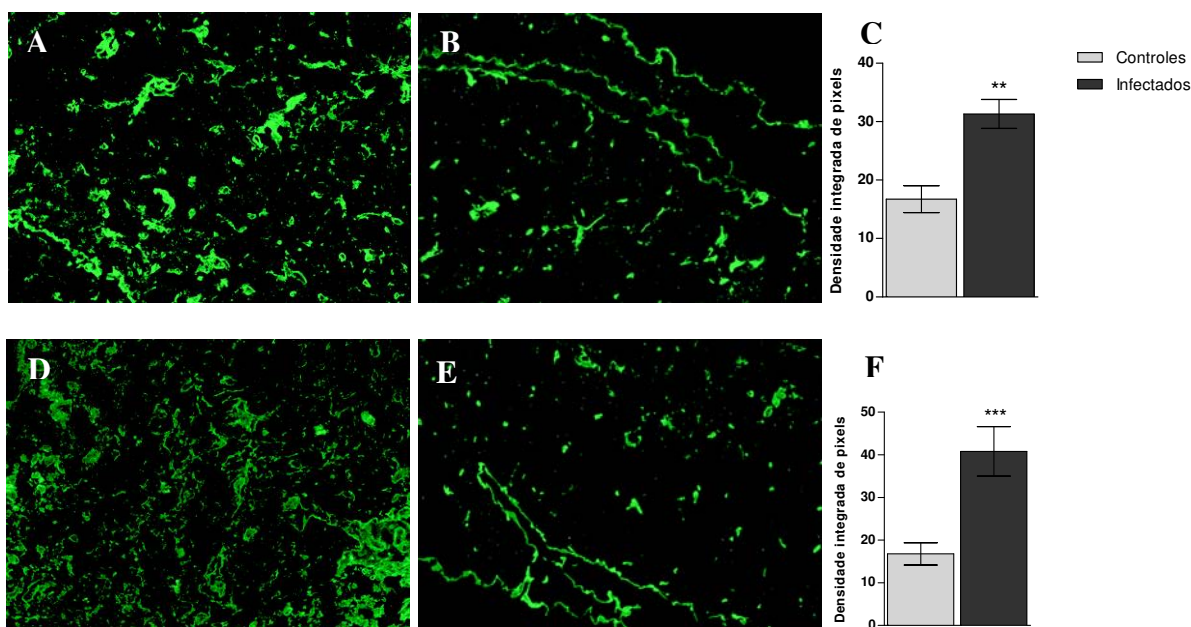


Figura 13: Imunofluorescência para elementos de matriz extracelular. (A) Marcação para fibronectina em animais infectados com *P.berghei* e (B) em animais controle. Magnitude 100x. (C) Análise quantitativa da expressão de fibronectina, aumento da densidade em animais infectados em relação aos controles. (D) Marcação para laminina em animais infectados com *P.berghei* e (E) em animais controle. Magnitude 100x. (F) Análise quantitativa da expressão de laminina mostrando aumento de densidade em animais infectados em relação aos controles. * $p \leq 0.05$ e ** $p \leq 0.01$

4.2.4. Análise da expressão de VLA-4 (CD49d/CD29) e VLA-5 (CD49e/CD29), receptores para fibronectina e VLA-6 (CD49f/CD29), receptor para laminina

O órgão de animais infectados mostrou alterações tanto no número relativo de timócitos que expressam os receptores de matriz extracelular bem como nos níveis de expressão destes receptores quando comparados aos controles.

O timo de animais infectados com *P. berghei* apresentou alterações no número relativo de timócitos que expressam VLA-4 e na intensidade da expressão do receptor na superfície das células quando comparados ao grupo controle. Timócitos duplo negativos e CD8 de animais infectados apresentaram queda na expressão, conforme demonstrado no histograma (Figura 14A) e gráfico (figura 14B). As subpopulação de timócitos duplo negativos e CD4 apresentaram queda tanto no número relativo de células que expressam o receptor (Figura 14C)

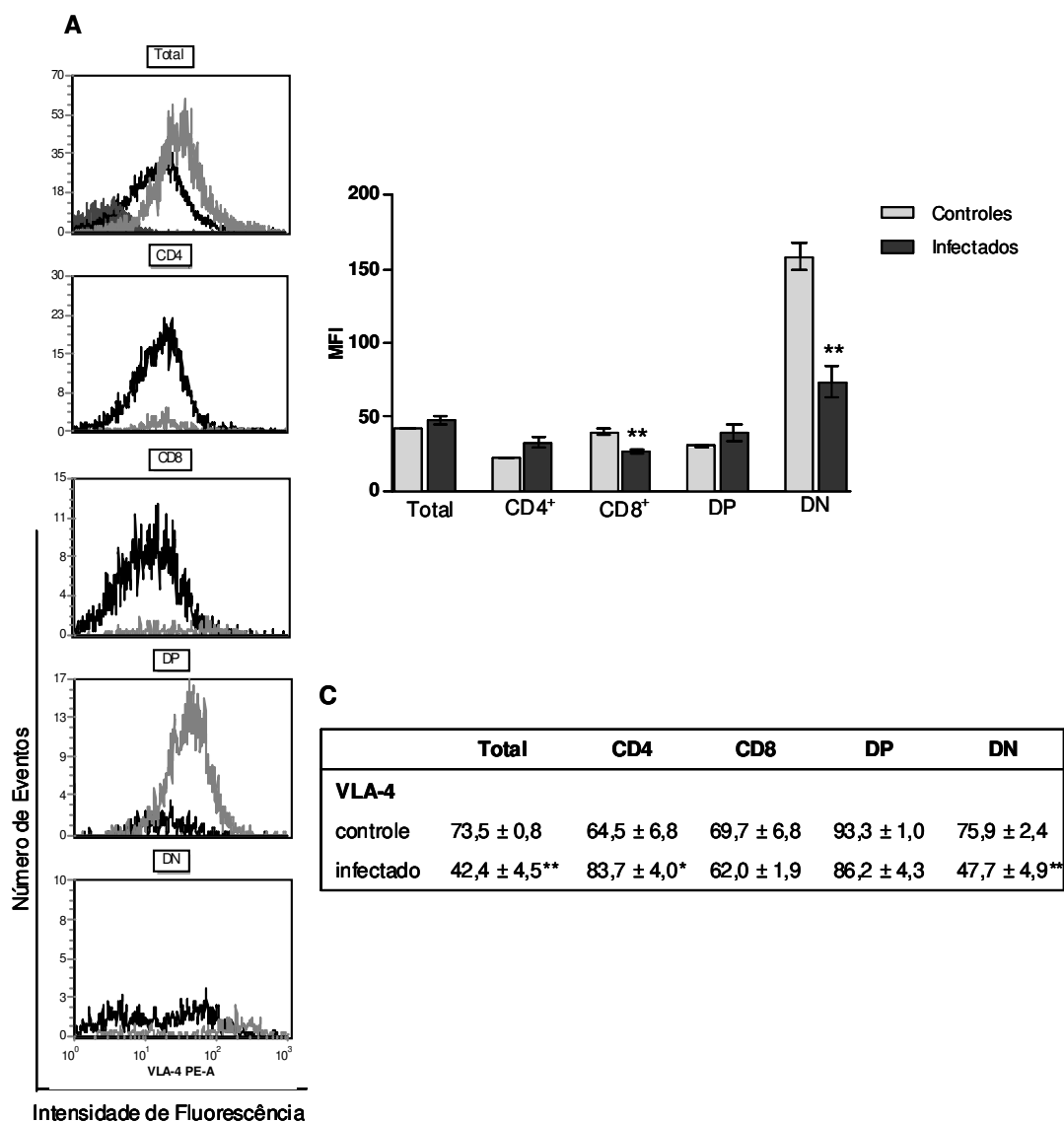


Figura 14: Citometria de Fluxo para expressão do receptor VLA-4 no total de timócitos e nas subpopulações definidas por CD4 e CD8. O histograma cheio representa o controle de isotipo, o histograma aberto cinza e o preto representam, respectivamente, a expressão do receptor nos animais controle e infectados. **(A)** Histograma representativo da expressão de VLA-4 nos timócitos de animais controle e infectado. **(B)** Expressão de VLA-4 representada pela média de intensidade de fluorescência (MFI) **(C)** Número relativo de timócitos que expressam VLA-4. Resultados expressos em média ± SE de cinco animais. * $p \leq 0.05$ e ** $p \leq 0.01$.

Em relação ao receptor VLA-5, os timócitos de animais infectados também apresentaram alterações quando comparados ao grupo controle. Houve diminuição na intensidade de fluorescência nas subpopulações de timócitos duplo negativos, CD4⁺ e CD8⁺ de animais infectados quando comparados aos controles, segundo o histograma (Figura 15A) e gráfico (figura 15B). O número relativo de timócitos duplo negativos que expressam VLA-5 também diminuiu no timo de animais infectados (Figura 15C).

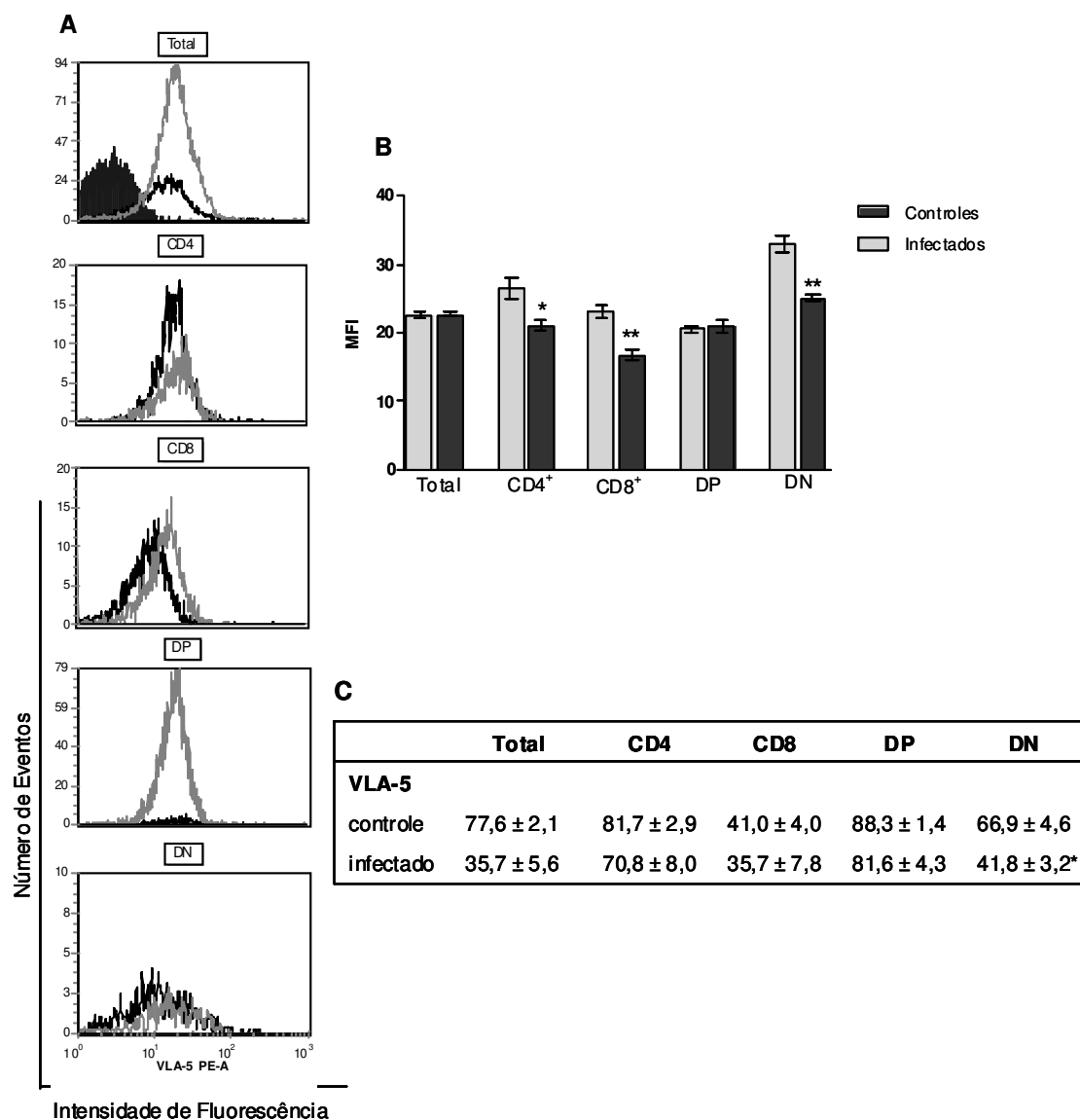


Figura 15: Citometria de Fluxo para expressão do receptor VLA-5 no total de timócitos e nas subpopulações definidas por CD4 e CD8. O histograma cheio representa o controle de isotipo, o histograma aberto cinza e o preto representam, respectivamente, a expressão do receptor nos animais controle e infectados. **(A)** Histograma representativo da expressão de VLA-5 nos timócitos de animais controle e infectado. **(B)** Expressão de VLA-5 representada pela média de intensidade de fluorescência (MFI) **(C)** Número relativo de timócitos que expressam VLA-5. Resultados expressos em média ± SE de cinco animais. * $p \leq 0.05$ e ** $p \leq 0.01$.

A análise do receptor VLA-6 revelou alterações significativas em timócitos de animais infectados com *P. berghei* quando comparados com animais controle.

A densidade de expressão do receptor na superfície de timócitos de animais infectados diminuiu em todas as subpopulações de timócitos, exceto em CD4⁺, conforme demonstrado no histograma (Figura 16A) e gráfico (figura 16B). Observa-se ainda, redução na porcentagem de timócitos totais, duplo negativos e duplo positivos que expressam VLA-6 (Figura 16C).

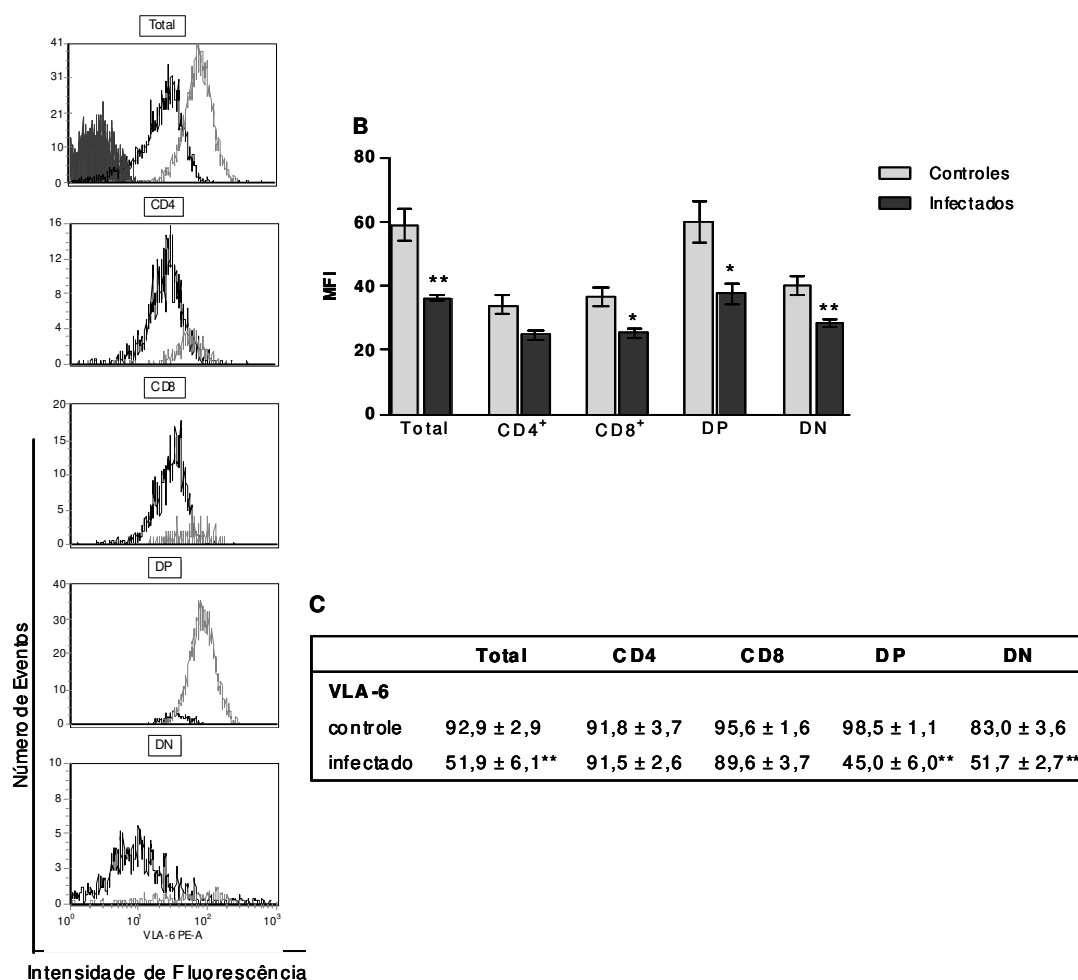


Figura 16: Citometria de Fluxo para expressão do receptor VLA-6 no total de timócitos e nas subpopulações definidas por CD4 e CD8. O histograma cheio representa o controle de isótipo, o histograma aberto cinza e o preto representam, respectivamente, a expressão do receptor nos animais controle e infectados. **(A)** Histograma representativo da expressão de VLA-6 nos timócitos de animais controle e infectado. **(B)** Expressão de VLA-6 representada pela média de intensidade de fluorescência (MFI) **(C)** Número relativo de timócitos que expressam VLA-6. Resultados expressos em média ± SE de cinco animais. * $p \leq 0.05$ e ** $p \leq 0.01$.

4.2.5. Análise da expressão de CXCL12 e CCL25

O grupo experimental de animais infectados com *P.berghei* demonstrou alterações significativas na expressão de quimiocinas importantes na migração intratímica quando comparados ao grupo controle.

Foi possível detectar aumento na expressão gênica da quimiocina CXCL12 no timo de animais infectados com *P. berghei* quando comparados a expressão do grupo controle, este aumento foi de aproximadamente duas vezes (Figura 18A). Já, a análise da expressão da quimiocina CCL25 apresentou queda acentuada no timo de animais infectados (diminuição de aproximadamente 4 vezes) quando comparado aos animais do grupo controle (Figura 18B).

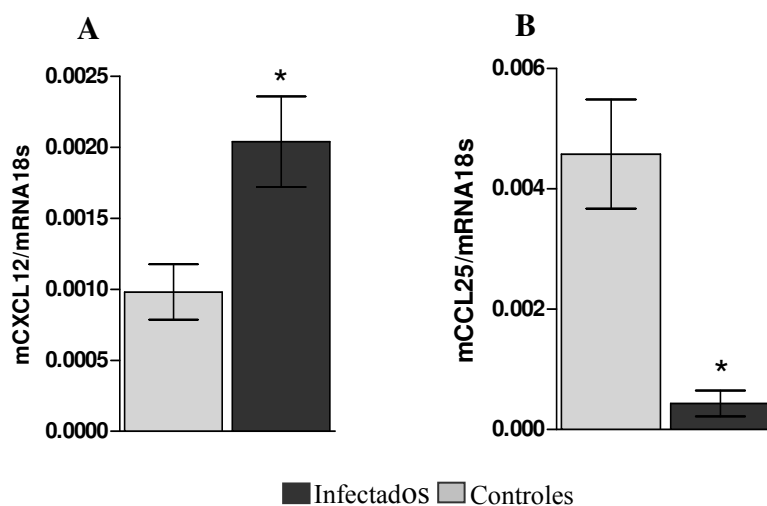


Figura 17: PCR em tempo real para a expressão gênica de quimiocinas (A) Expressão gênica de CXCL12 (B) Expressão gênica de CCL25. Resultados expressos em média \pm SE de quatro animais. * $p \leq 0.05$.

4.2.6. Alterações nos receptores de quimiocinas CXCR4 e CCR9

Os animais infectados com *P. berghei*, apresentaram, aos 14 dias após a inoculação, aumento na expressão de CXCR4 em todas as subpopulações de timócitos quando comparados aos controles, segundo histograma (Figura 18A) e gráfico (figura 18B). Houve também aumento no número relativo de todas as subpopulações de timócitos que expressam CXCR4 no timo de animais infectados quando comparados ao grupo controle (Figura 18C).

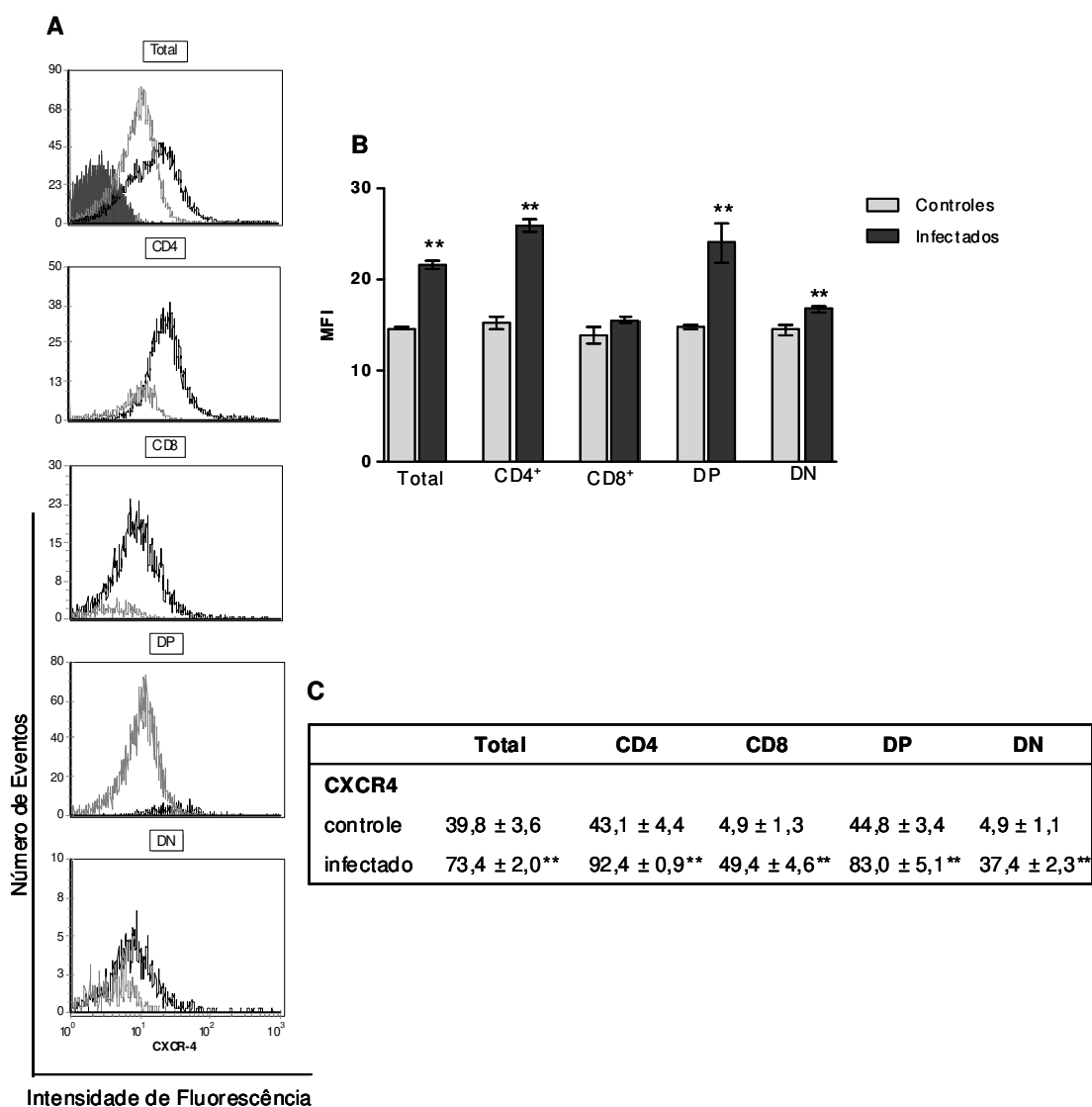


Figura 18: Citometria de Fluxo para expressão do receptor CXCR4 no total de timócitos e nas subpopulações definidas por CD4 e CD8. O histograma cheio representa o controle de isótipo, o histograma aberto cinza e o preto representam, respectivamente, a expressão do receptor nos animais controle e infectados. **(A)** Histograma representativo da expressão de CXCR4 nos timócitos de animais controle e infectado. **(B)** Expressão de CXCR4 representada pela média de intensidade de fluorescência (MFI) **(C)** Número relativo de timócitos que expressam CXCR4. Resultados expressos em média ± SE de cinco animais. * $p \leq 0.05$ e ** $p \leq 0.01$.

Em relação ao receptor CCR9, timócitos de animais infectados apresentaram aumento na expressão do receptor quando comparados aos controles, conforme histograma (Figura 19A) e gráfico (figura 19B). Observa-se ainda aumento no número relativo de todas as subpopulações de timócitos que expressam CCR9, exceto CD4⁺ de animais infectados quando comparados ao grupo controle (Figura 19C).

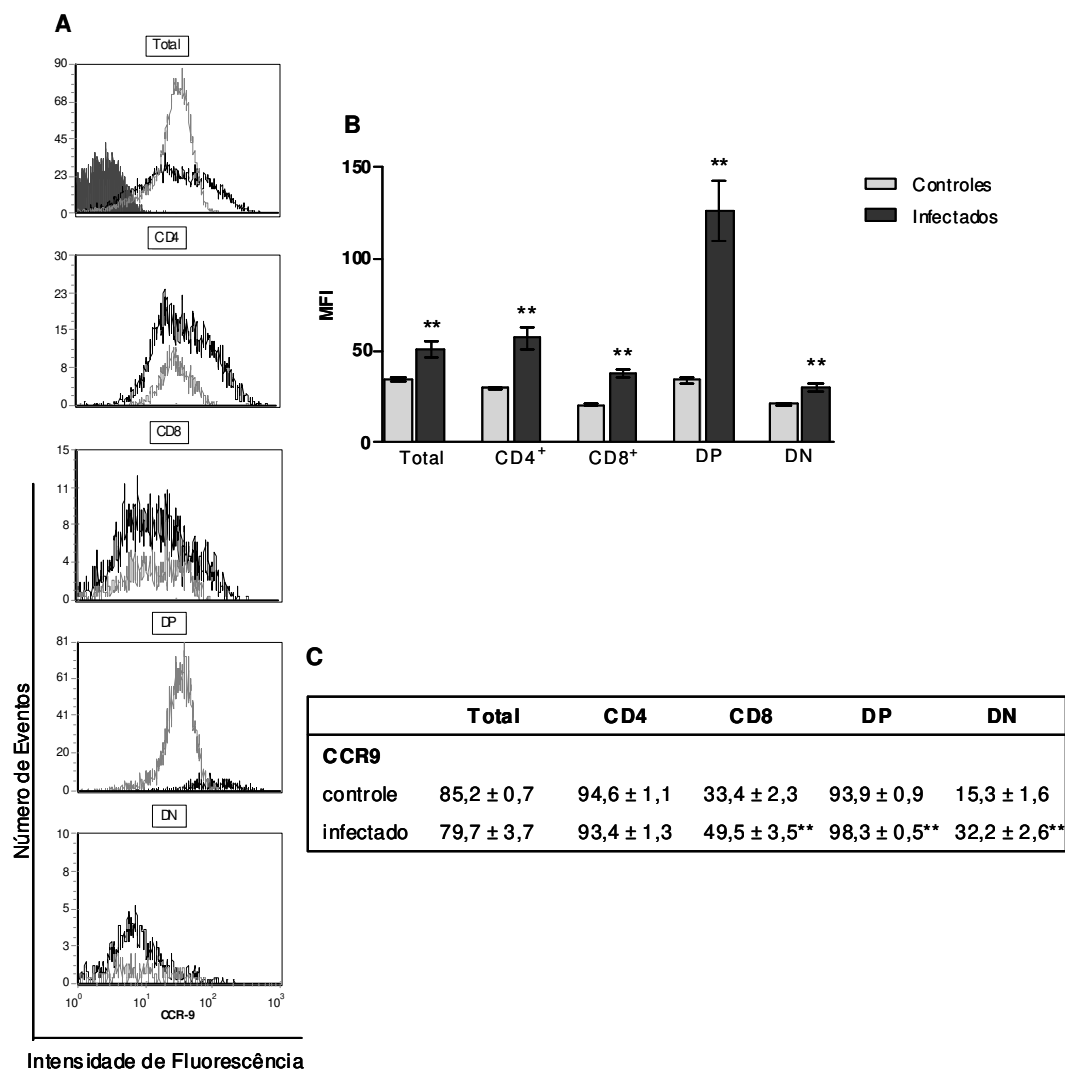


Figura 19: Citometria de Fluxo para expressão do receptor CCR9 no total de timócitos e nas subpopulações definidas por CD4 e CD8. O histograma cheio representa o controle de isotipo, o histograma aberto cinza e o preto representam, respectivamente, a expressão do receptor nos animais controle e infectados. **(A)** Histograma representativo da expressão de CCR9 nos timócitos de animais controle e infectado. **(B)** Expressão de CCR9 representada pela média de intensidade de fluorescência (MFI) **(C)** Número relativo de timócitos que expressam CCR9. Resultados expressos em média ± SE de cinco animais. * $p \leq 0.05$ e ** $p \leq 0.01$.

4.2.7.Avaliação do potencial migratório *ex vivo* de timócitos através de ensaios de migração

As alterações observadas no timo de animais infectados foram capazes de alterar a atividade migratória dos timócitos frente a diferentes estímulos.

Podemos observar, de acordo com a figura 20A, aumento na atividade migratória de timócitos de animais infectados, expressa em números absolutos, quando comparados ao controle.

Não foi possível observar alterações na migração entre controles e infectados quando se utilizou fibronectina sozinha como estímulo. Por outro lado, quando colocamos somente laminina, a atividade migratória de timócitos de animais infectados foi maior em relação aos controles. As quimiocinas CXCL12 e CCL25, como estímulo único, também foram capazes de promover aumento de migração de timócitos de animais infectados em relação aos controles.

Apesar dos dados que demonstram que a fibronectina sozinha não alterou a migração entre infectados e controles, houve efeito sinérgico quando este elemento foi combinado com CXCL12 ou CCL25, estimulando a migração de timócitos de animais infectados. A atividade migratória foi mais acentuada na combinação entre fibronectina e CXCL12 do que quando combinada com CCL25.

A combinação entre laminina e as quimiocinas CXCL12 e CCL25 também apresentou intensa atividade migratória dos timócitos de animais infectados em relação aos controles. Como observado em relação à fibronectina, a combinação

entre laminina e CXCL12 foi mais potente em estimular a migração do que a combinação entre laminina e CCL25 nos timócitos de animais infectados.

Para avaliar uma possível relação da migração de timócitos *ex vivo* com alterações *in vivo*, foram analisadas as subpopulações de linfócitos T no baço.

O baço de animais infectados apresentou aumento, em número absoluto, de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e duplo negativos quando comparados aos controles (Figura 20B).

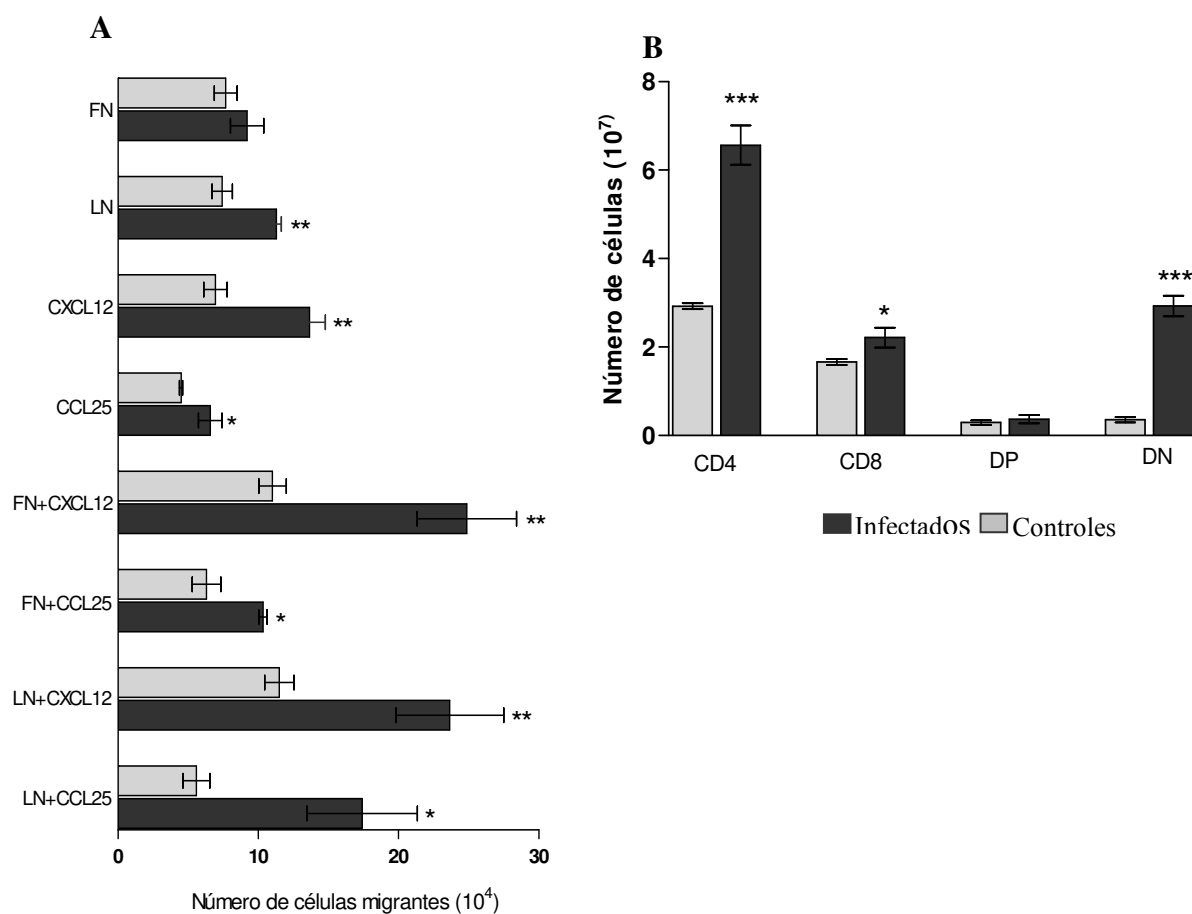


Figura 20: Análise de migração *ex vivo* através de câmaras de “transwell”. **(A)** Migração de timócitos frente a diferentes estímulos. **(B).** Análise das subpopulações de linfócitos T no baço de animais infectados e controles. Resultados expressos em média \pm SE derivados de 5 experimentos cada um com pool de 4 animais. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ e *** $p \leq 0.001$.

A análise das subpopulações de timócitos que migraram frente aos estímulos, sozinhos ou combinados, demonstrou que os timócitos CD4⁺, CD8⁺ e duplo negativos de animais infectados migram, em número relativo, mais do que os timócitos de animais controle. A subpopulação de duplo positivo migra em menor porcentagem quando comparada aos controles (Figura 20A e 20B).

Interessantemente este perfil é o mesmo encontrado na análise das subpopulações de linfócitos do baço de animais infectados.

	CD4 ⁺	CD8 ⁺	DP	DN
Fibronectina				
<i>Controles</i>	2,01±0,25	0,65±0,15	4,1±0,12	0,72±0,05
<i>Infectados</i>	5,04±0,76*	2,83±0,44*	1,0±0,04**	1,32±0,24
Laminina				
<i>Controles</i>	1,71±0,20	0,70±0,11	3,79±0,66	0,58±0,16
<i>Infectados</i>	5,86±0,32*	1,71±0,20**	1,13±0,06*	1,56±0,34
CXCL12				
<i>Controles</i>	0,90±0,31	0,44±0,06	4,35±0,80	0,21±0,01
<i>Infectados</i>	6,96±0,88**	4,03±0,43**	1,04±0,16*	1,50±0,20**
CCL25				
<i>Controles</i>	0,55±0,18	0,26±0,06	2,72±0,42	0,11±0,02
<i>Infectados</i>	3,68±0,36**	2,06±0,26**	0,73±0,09*	0,90±0,17**
	CD4 ⁺	CD8 ⁺	DP	DN
Fibronectina +CXCL12				
<i>Controles</i>	1,06±0,32	0,49±0,17	5,50±1,33	0,32±0,09
<i>Infectados</i>	13,68±2,13**	6,79±0,85**	2,04±0,37*	2,35±0,44**
Fibronectina +CCL25				
<i>Controles</i>	0,73±0,14	0,24±0,07	3,43±0,73	0,22±0,06
<i>Infectados</i>	5,45±0,32**	2,73±0,16**	0,93±0,03**	1,21±0,17*
Laminina+CXCL12				
<i>Controles</i>	1,64±0,35	0,84±0,18	4,89±0,46	0,32±0,31
<i>Infectados</i>	14,06±0,99**	8,61±0,85**	2,06±0,16*	2,48±0,47**
Laminina +CCL25				
<i>Controles</i>	0,57±0,15	0,22±0,07	2,90±0,39	0,11±0,02
<i>Infectados</i>	8,91±1,75**	5,11±1,52**	1,57±0,27*	1,88±0,44**

Tabela 2: Número relativo das subpopulações de timócitos que migraram frente aos estímulos. **(A)** Análise de timócitos que migraram frente ao estímulo utilizado sozinho. **(B)** Análise de timócitos que migraram frente ao estímulo utilizados em combinação. Resultados expressos em média ± SE derivados de 5 experimentos cada um com pool de 4 animais. * $p \leq 0.05$ e ** $p \leq 0.01$.

4.3. Diabetes

4.3.1. Índice Tímico

Os timos de animais diabéticos induzidos por aloxana foram pesados em dois tempos distintos após a indução de diabetes. Foi possível observar atrofia do timo após 66 horas da injeção de aloxana, sendo o pico de atrofia observado após 72 horas de indução do diabetes (figura 21).

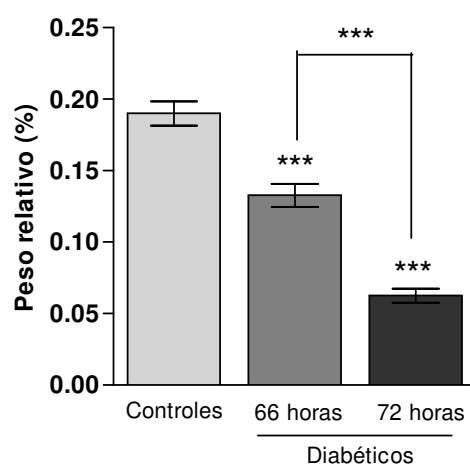


Figura 21: Atrofia tímica em animais com diabetes induzidos por aloxana. Perda de peso relativo do órgão após 66 e 72 horas de indução. Resultados expressos em média \pm SE. *** $p \leq 0.001$.

4.3.2. Avaliação da densidade de elementos de matriz extracelular

O timo de animais diabéticos não revelou alterações na marcação para fibronectina em relação aos controles (Figura 22A e 22B, respectivamente), apresentando um padrão normal de marcação de fibronectina distribuída pelos septos, cápsula, membranas basais, espaços perivasculares e medula. Quantitativamente também não observamos alterações (Figura 22C)

A análise de laminina, por sua vez, mostrou intensa marcação no timo de animais diabéticos quando comparado aos respectivos controles, com forte marcação por todo o parênquima tímico (Figura 22D e 22E). A análise quantitativa das seções confirmou a maior densidade deste elemento no órgão de animais diabéticos (Figura 24F).

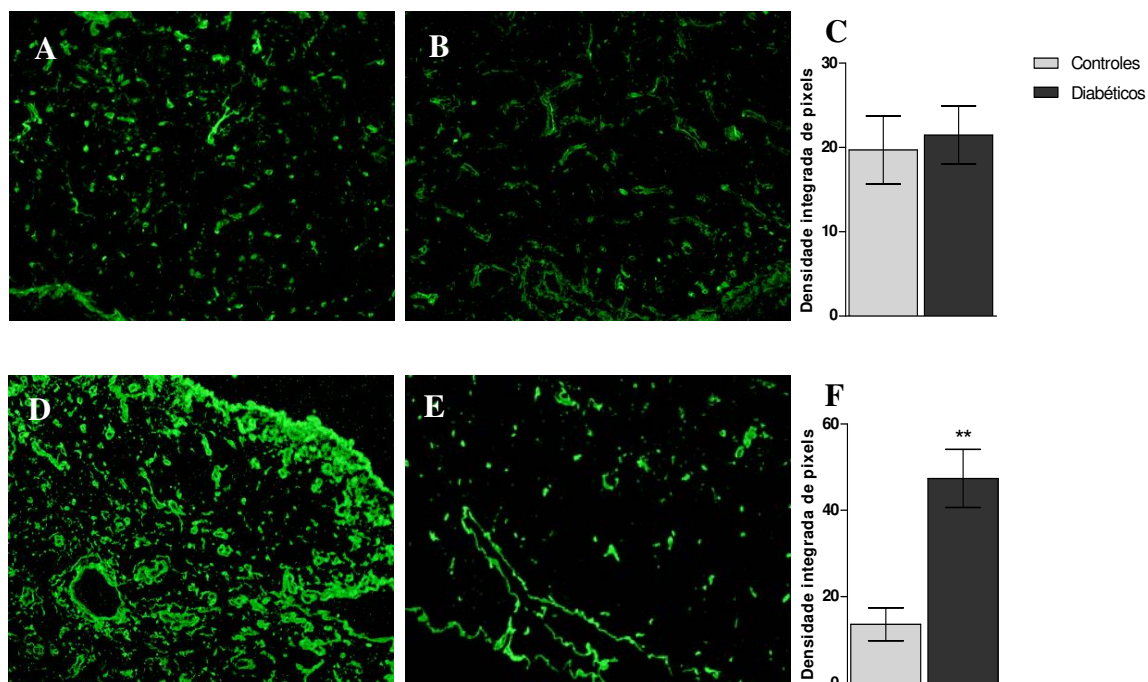


Figura 22: Imunofluorescência para elementos de matriz extracelular. (A) Marcação para fibronectina em animais diabéticos e (B) fibronectina em animais controle. Magnitude 100x. (C) Análise quantitativa da expressão de fibronectina, aumento da densidade em animais diabéticos em relação aos controles. (D) Marcação para laminina em animais diabéticos e (E) fibronectina em animais controle. Magnitude 100x. (F) Análise quantitativa da expressão de laminina, aumento de densidade em animais diabéticos em relação aos controles.

4.3.3. Análise da expressão de VLA-4 (CD49d/CD29) e VLA-5 (CD49e/CD29), receptores para fibronectina e VLA-6 (CD49f/CD29), receptor para laminina

A análise dos receptores de matriz extracelular na superfície de timócitos revelou alterações significativas entre o timo de animais diabéticos e controles. Quanto à expressão do receptor, foi possível observar diminuição na intensidade de fluorescência em timócitos duplo negativos e CD8⁺ de animais diabéticos em relação aos controles, conforme histograma (Figura 23A) e gráfico (figura 23B). Nota-se ainda, diminuição na porcentagem de timócitos totais, duplo negativos e CD8⁺ que expressam o receptor no timo de animais diabéticos (Figura 23C).

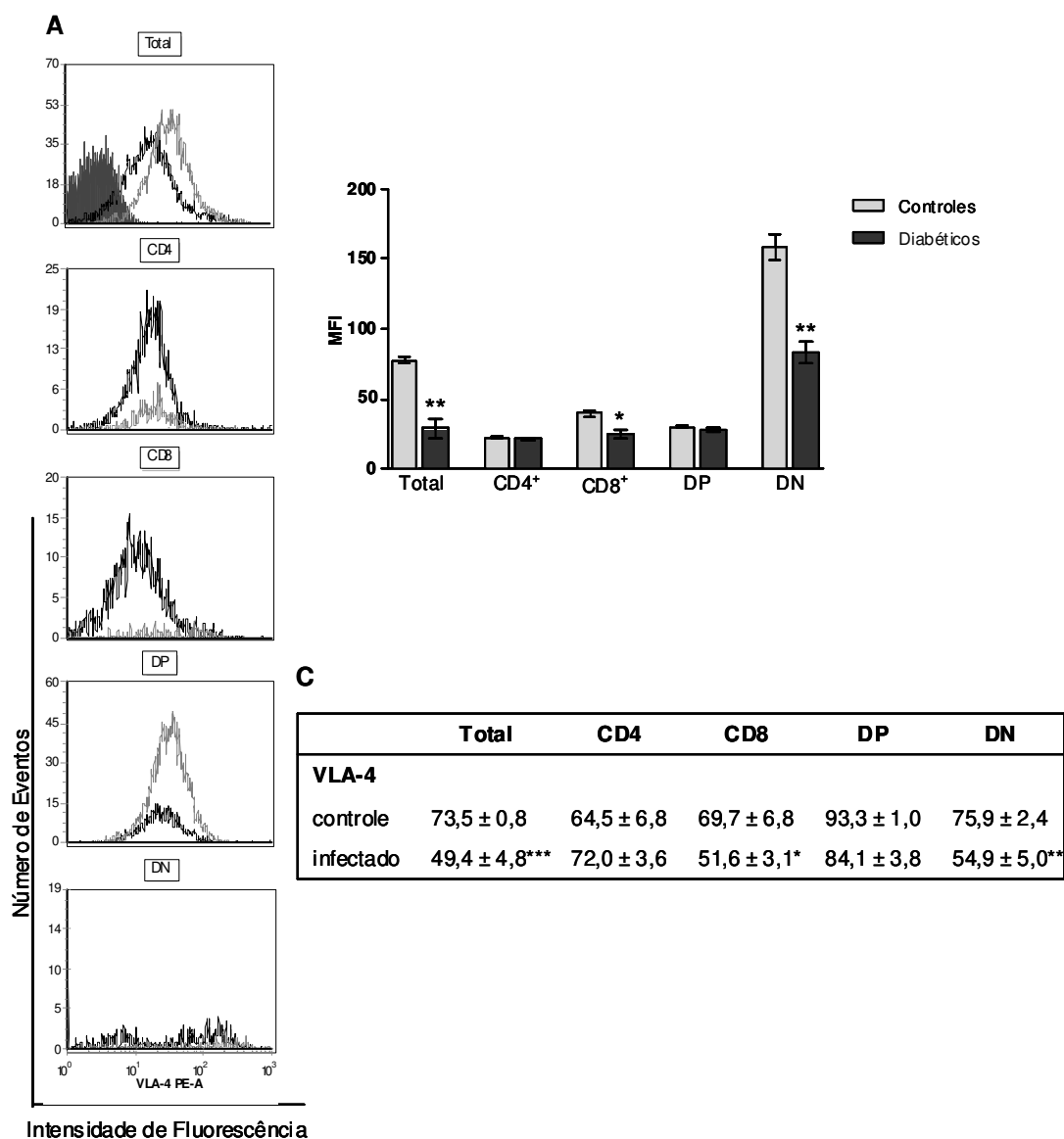


Figura 23: Citometria de Fluxo para expressão do receptor VLA-4 no total de timócitos e nas subpopulações definidas por CD4 e CD8. O histograma cheio representa o controle de isotipo, o histograma aberto cinza e o preto representam, respectivamente, a expressão do receptor nos animais controle e diabéticos. **(A)** Histograma representativo da expressão de VLA-4 nos timócitos de animais controle e diabéticos. **(B)** Expressão de VLA-4 representada pela média de intensidade de fluorescência (MFI) **(C)** Número relativo de timócitos que expressam VLA-4. Resultados expressos em média ± SE de cinco animais. * $p \leq 0.05$ e ** $p \leq 0.01$.

A análise do receptor VLA-5 revelou alterações acentuadas entre o timo de animais diabéticos e controles. Alterações significativas foram observadas na expressão do receptor VLA-5 com diminuição da intensidade de fluorescência em todas as subpopulações de timócitos de animais diabéticos quando comparados aos controles, conforme histograma (Figura 24A) e gráfico (Figura 24B). Houve ainda, redução no número relativo de timócitos duplo negativos, duplo positivos e $CD4^+$ que expressam o receptor VLA-5 no timo de animais diabéticos (Figura 24C).

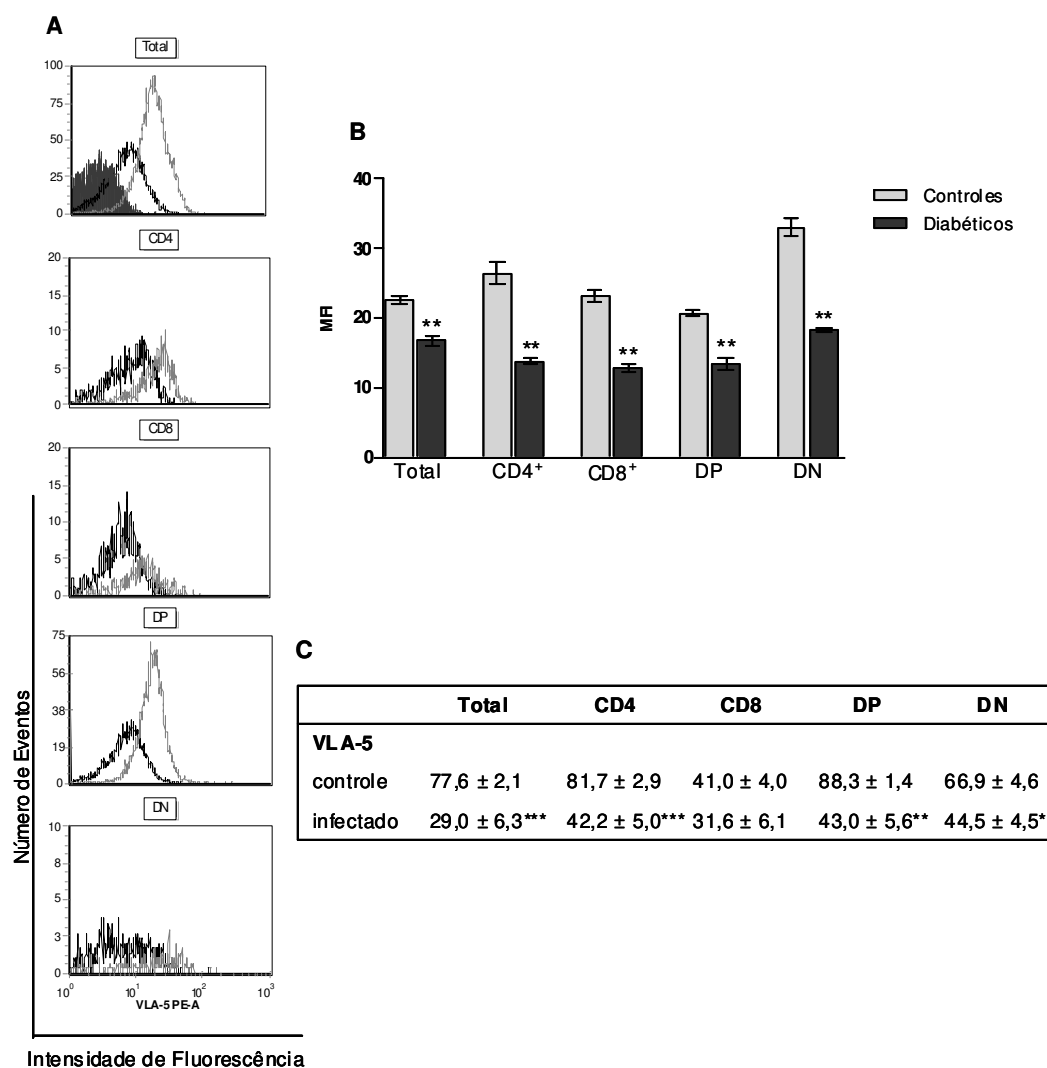


Figura 24: Citometria de Fluxo para expressão do receptor VLA-5 no total de timócitos e nas subpopulações definidas por CD4 e CD8. O histograma cheio representa o controle de isotipo, o histograma aberto cinza e o preto representam, respectivamente, a expressão do receptor nos animais controle e diabéticos. **(A)** Histograma representativo da expressão de VLA-5 nos timócitos de animais controle e diabéticos. **(B)** Expressão de VLA-5 representada pela média de intensidade de fluorescência (MFI) **(C)** Número relativo de timócitos que expressam VLA-5. Resultados expressos em média ± SE de cinco animais. * $p \leq 0.05$ e ** $p \leq 0.01$.

Em relação ao VLA-6, timócitos de animais diabéticos apresentaram diminuição significativa na expressão do receptor em todas as subpopulações de timócitos quando comparados aos controles, conforme histograma (Figura 25A) e gráfico (Figura 25B). Observa-se também queda no número relativo de timócitos duplo negativos e CD8⁺, que expressam VLA-6 no timo de animais diabéticos (Figura 25C).

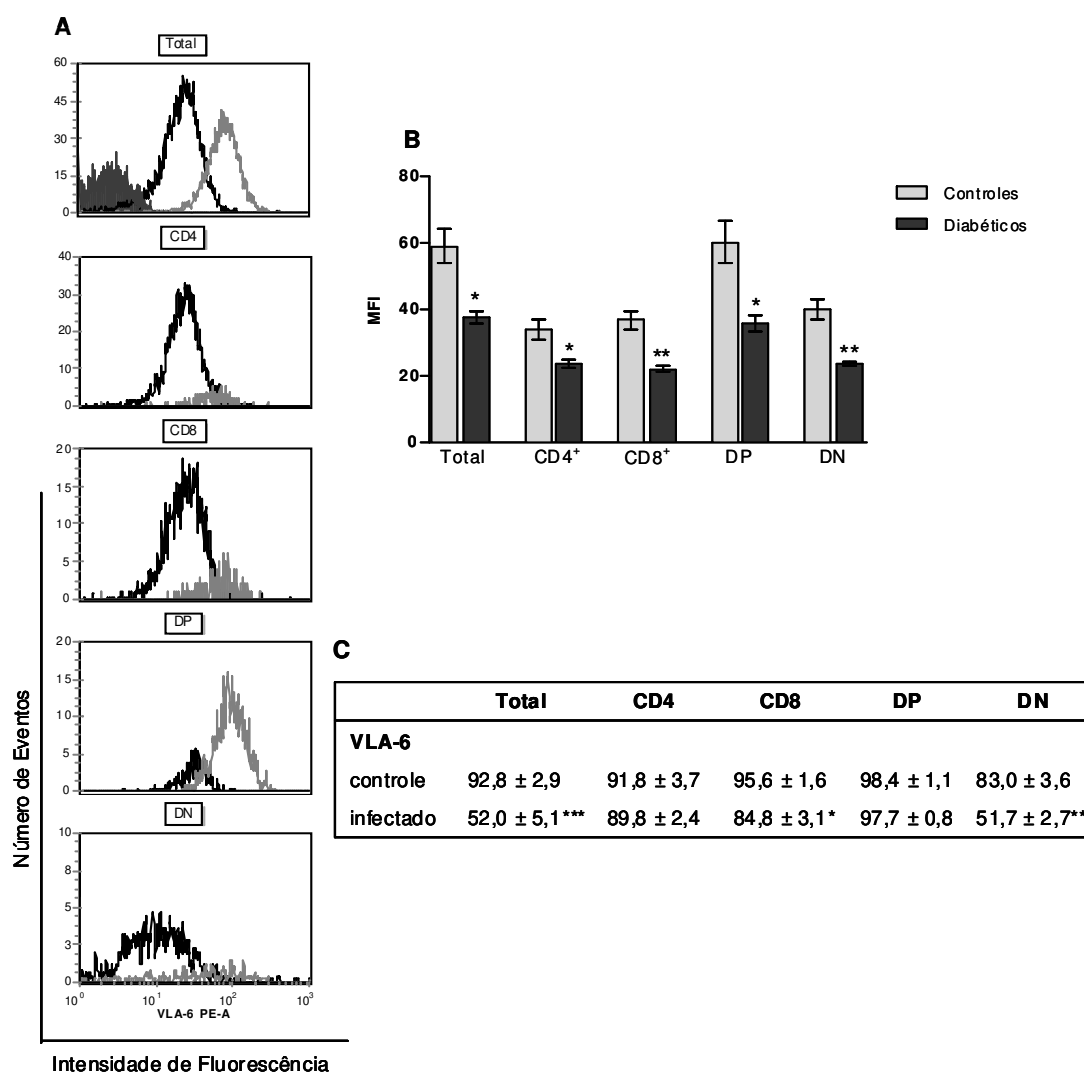


Figura 25: Citometria de Fluxo para expressão do receptor VLA-6 no total de timócitos e nas subpopulações definidas por CD4 e CD8. O histograma cheio representa o controle de isotipo, o histograma aberto cinza e o preto representam, respectivamente, a expressão do receptor nos animais controle e diabéticos. **(A)** Histograma representativo da expressão de VLA-6 nos timócitos de animais controle e diabéticos. **(B)** Expressão de VLA-6 representada pela média de intensidade de fluorescência (MFI) **(C)** Número relativo de timócitos que expressam VLA-6. Resultados expressos em média ± SE de cinco animais. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ e *** $p \leq 0.001$

4.3.4. Análise da expressão de CXCL12 e CCL25 por PCR em Tempo Real

A análise da expressão das quimiocinas CXCL12 e CCL25 no timo de animais diabéticos apresentou alterações significativas quando comparados ao grupo controle.

A quimiocina CXCL12 revelou queda na expressão, com diminuição de aproximadamente quatro vezes quando comparada à expressão no timo de animais controle (Figura 26A). Ao analisarmos a quimiocina CCL25, foi possível detectar acentuada queda na expressão, uma diminuição de aproximadamente nove vezes na expressão gênica quando comparada ao timo de animais controle (Figura 26B).

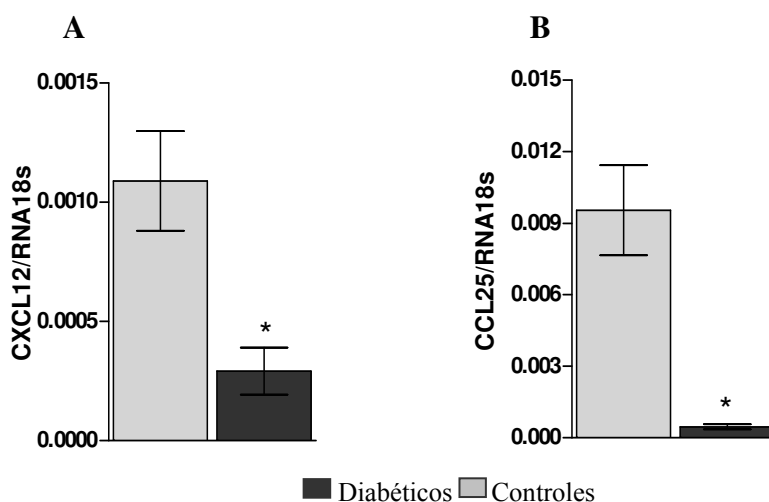


Figura 26: PCR em tempo real para a expressão gênica de quimiocinas (A) Expressão gênica de CXCL12 (B) Expressão gênica de CCL25. Resultados expressos em média \pm SE de quatro animais. * $p \leq 0.05$.

4.3.5. Alterações nos receptores de quimiocinas CXCR4 e CCR9

A análise de CXCR4, receptor para CXCL12, revelou diferenças significativas no timo de animais diabéticos em relação ao timo de animais controle. Foi possível observar acentuado aumento na densidade de CXCR4 em todas as subpopulações de timócitos de animais diabéticos, exceto CD8⁺, quando comparado ao grupo controle, conforme histograma (Figura 27A) e gráfico (Figura 27B). Houve ainda, aumento relativo de todas as subpopulações de timócitos que expressam o receptor CXCR4 no timo de animais diabéticos quando comparados ao controle (Figura 27C).

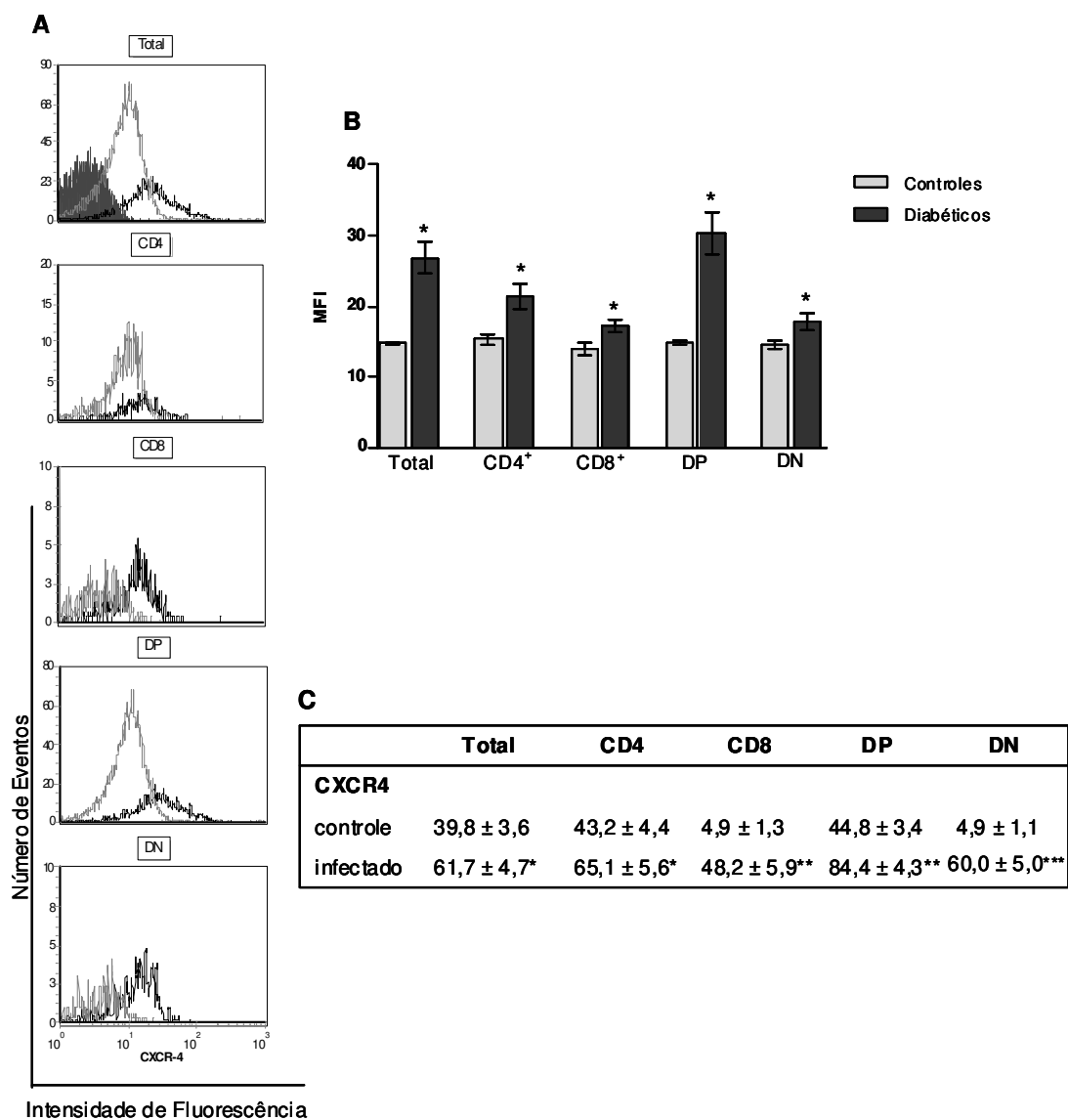


Figura 27: Citometria de Fluxo para expressão do receptor CXCR4 no total de timócitos e nas subpopulações definidas por CD4 e CD8. O histograma cheio representa o controle de isotipo, o histograma aberto cinza e o preto representam, respectivamente, a expressão do receptor nos animais controle e diabéticos. **(A)** Histograma representativo da expressão de CXCR4 nos timócitos de animais controle e diabéticos. **(B)** Expressão de CXCR4 representada pela média de intensidade de fluorescência (MFI) **(C)** Número relativo de timócitos que expressam CXCR4. Resultados expressos em média ± SE de cinco animais. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ e *** $p \leq 0.001$

Em contrapartida ao observado na análise do receptor CXCR4, a molécula CCR9, apresentou queda na expressão do receptor nas subpopulações de timócitos duplo positivos, duplo negativos e CD8⁺ de animais diabéticos, conforme histograma (Figura 28A) e gráfico (Figura 28B). O número relativo de timócitos duplo positivos, CD4⁺ e CD8⁺ que expressam o receptor também diminuiu no timo de animais diabéticos (Figura 28C).

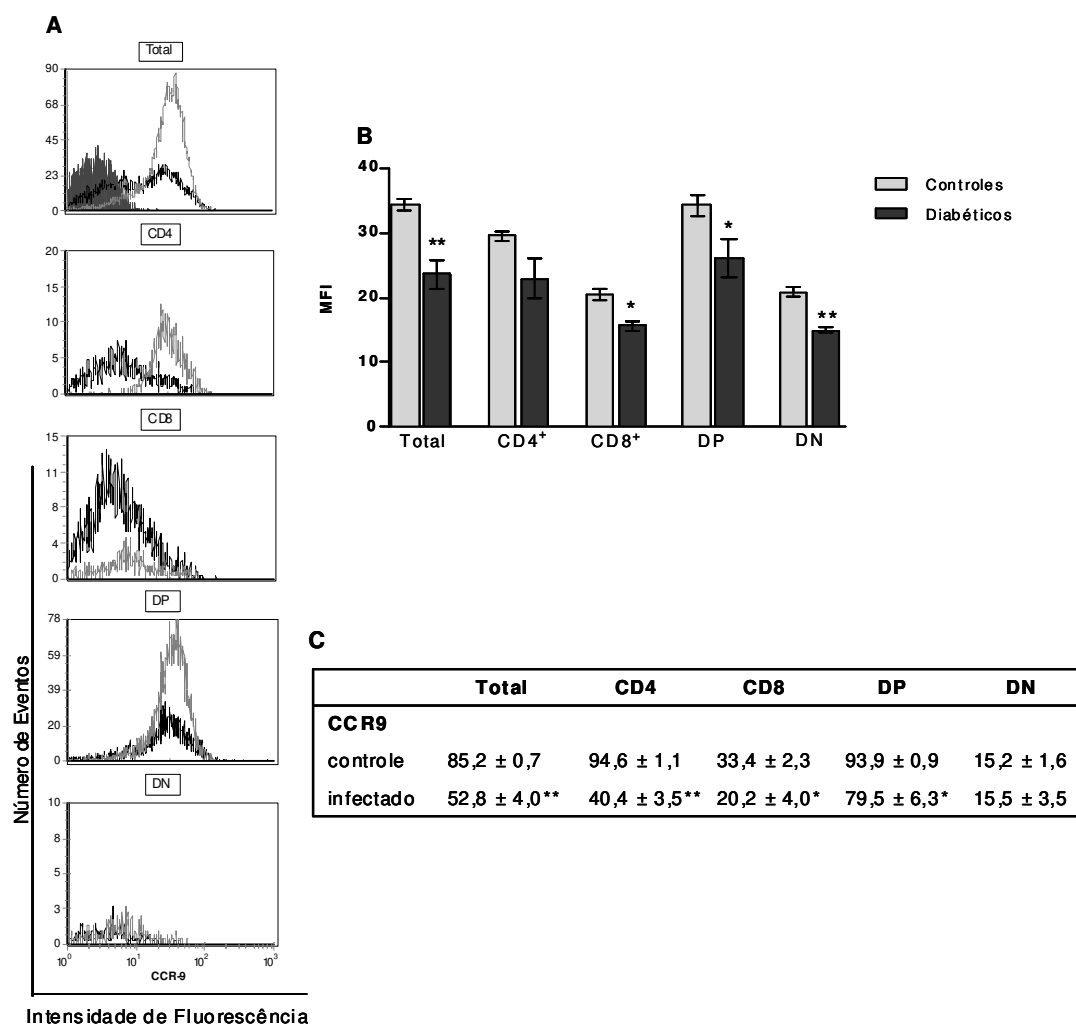


Figura 28: Citometria de Fluxo para expressão do receptor CCR9 no total de timócitos e nas subpopulações definidas por CD4 e CD8. O histograma cheio representa o controle de isótipo, o histograma aberto cinza e o preto representam, respectivamente, a expressão do receptor nos animais controle e diabéticos. **(A)** Histograma representativo da expressão de CCR9 nos timócitos de animais controle e diabéticos. **(B)** Expressão de CCR9 representada pela média de intensidade de fluorescência (MFI) **(C)** Número relativo de timócitos que expressam CCR9. Resultados expressos em média ± SE de cinco animais. * $p \leq 0.05$ e ** $p \leq 0.01$.

4.3.6. Avaliação do potencial migratório *ex vivo* de timócitos através de ensaios de migração

Com o objetivo de avaliar possíveis modificações funcionais desencadeadas pelas alterações observadas no microambiente tímico de animais diabéticos, realizamos experimentos de migração *ex vivo*.

Interessantemente, apesar da constatação de alterações nos receptores matriz extracelular e quimiocinas, não foram observadas diferenças, em número absoluto, na migração entre timócitos de animais diabéticos e controles.

Independente do estímulo utilizado, sozinho ou em combinação, não houve diferenças significativas na capacidade migratória (Figura 29A), embora a combinação fibronectina /CXCL12 e laminina/CXCL12 tenha aumentado a capacidade migratória de timócitos, não houve alterações significativas entre diabéticos e controles. A análise das subpopulações de linfócitos no baço de animais diabéticos revelou aumento somente no número de células T CD8⁺ (Figura 29B).

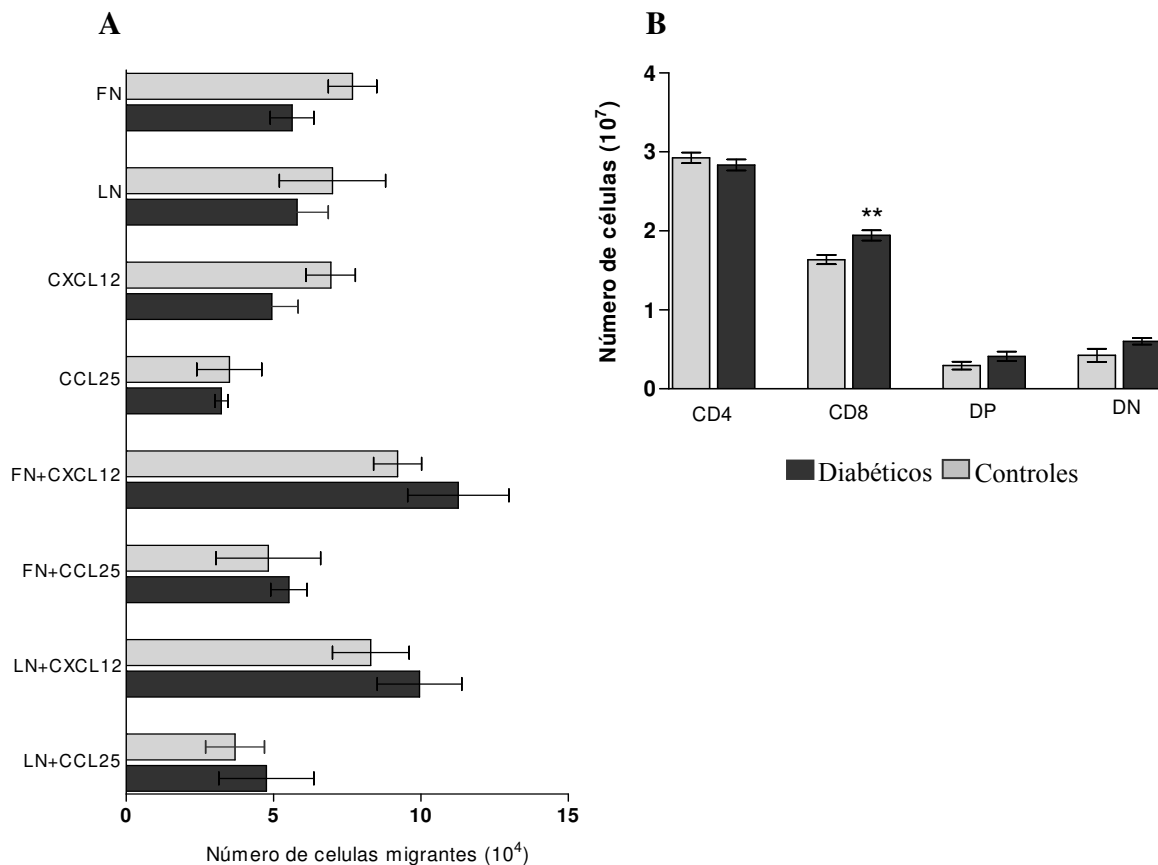


Figura 29: Análise de migração *ex vivo* através de câmaras de “transwell”. **(A)** Migração de timócitos frente a diferentes estímulos. **(B)**. Análise das subpopulações de linfócitos T no baço de animais diabéticos e controles. Resultados expressos em média \pm SE derivados de 5 experimentos cada um com pool de 4 animais. ** $p \leq 0.01$.

A análise das subpopulações de timócitos que migraram frente aos estímulos, sozinhos ou combinados, demonstrou que os timócitos CD8⁺ e duplo negativos de animais diabéticos migram, em número relativo, mais do que os timócitos de animais controle (Figura 32A e 32B).

	CD4 ⁺	CD8 ⁺	DP	DN
Fibronectina				
<i>Controles</i>	2,01±0,25	0,65±0,15	4,1±0,12	0,72±0,05
<i>Diabéticos</i>	1,20±0,17	0,69±0,13	2,69±0,72	0,61±0,25
Laminina				
<i>Controles</i>	1,71±0,20	0,70±0,11	3,79±0,66	0,58±0,16
<i>Diabéticos</i>	0,73±0,26*	1,45±0,54	2,79±0,99	0,45±0,13
CXCL12				
<i>Controles</i>	0,90±0,31	0,44±0,06	4,35±0,80	0,21±0,01
<i>Diabéticos</i>	0,37±0,16	0,60±0,20	2,13±0,55*	0,37±0,16
CCL25				
<i>Controles</i>	0,55±0,18	0,26±0,06	2,72±0,42	0,11±0,02
<i>Diabéticos</i>	1,72±0,36*	1,69±0,06**	0,72±0,16*	0,58±0,08*

	CD4 ⁺	CD8 ⁺	DP	DN
Fibronectina +CXCL12				
<i>Controles</i>	1,06±0,32	0,49±0,17	5,50±1,33	0,32±0,09
<i>Diabéticos</i>	1,76±0,75	2,36±0,60**	4,90±1,10	1,76±0,0,75*
Fibronectina +CCL25				
<i>Controles</i>	0,73±0,14	0,24±0,07	3,43±0,73	0,22±0,06
<i>Diabéticos</i>	0,68±0,10	3,13±0,78**	1,48±0,11*	0,78±0,22*
Laminina+CXCL12				
<i>Controles</i>	1,64±0,35	0,84±0,18	4,89±0,46	0,32±0,31
<i>Diabéticos</i>	3,39±0,20*	2,5±0,37*	4,15±0,84	1,43±0,46
Laminina +CCL25				
<i>Controles</i>	0,57±0,15	0,22±0,07	2,90±0,39	0,11±0,02
<i>Diabéticos</i>	1,58±0,72*	2,78±1,02*	0,45±0,14*	0,57±0,22

Tabela 3: Número relativo das subpopulações de timócitos que migraram frente aos estímulos. **(A)** Análise de timócitos que migraram frente ao estímulo utilizado sozinho. **(B)** Análise de timócitos que migraram frente ao estímulo utilizados em combinação. Resultados expressos em média ± SE derivados de 5 experimentos cada um com pool de 4 animais. * p≤0.05 e ** p≤0.01

4.4. Comparação das alterações no microambiente tímico frente aos diferentes agentes de atrofia

A tabela abaixo mostra um resumo das alterações observadas no microambiente tímico frente aos diferentes agentes indutores de atrofia utilizados neste trabalho.

Agente Alterações	<i>P.brasiliensis</i>	<i>P.berghei</i>	Diabetes - Aloxana
Atrofia tímica	Leve	Intensa	Moderada
Matriz Extracelular	Sem alterações	↑ Laminina e Fibronectina	↑ Laminina
Receptores de matriz	↓ VLA-4, 5 e 6	↓ VLA-4, 5 e 6	↓ VLA-4, 5 e 6
Quimiocinas	↓ CXCL12	↑ CXCL12 ↓ CCL25	↓ CXCL12 e CCL25
Receptores de quimiocinas	↓ CXCR4 e CCR9	↑ CXCR4 e CCR9	↑ CXCR4 e ↓ CCR9
Migração <i>ex vivo</i>	Inibição	Aumento	Sem alterações

5. Discussão

O timo, composto por diferentes células e moléculas é o órgão responsável pelo desenvolvimento dos linfócitos T. A funcionalidade do timo é dependente de diversas moléculas e seus diferentes níveis de interação proporcionam o desenvolvimento dos timócitos. Entre os principais componentes do timo, os elementos de matriz extracelular e as quimiocinas atuam em conjunto no microambiente tímico, definindo os distintos nichos intratímicos e proporcionando os sinais necessários para a maturação de timócitos (revisto CIOFANI & ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2007 e PETRIE & ZÚÑIGA-PFLÜCKER *et al.*, 2007).

Assim, o estabelecimento de modelos indutores de atrofia pode auxiliar no entendimento do complexo processo de maturação de linfócitos T. No presente trabalho, os modelos empregados induzem modificações distintas no microambiente. Desta forma, apresentamos a discussão separadamente para cada um dos modelos de atrofia.

5.1. Alterações tímicas induzidas pelo *Paracoccidioides brasiliensis*

O *Paracoccidioides brasiliensis*, agente causador da paracoccidioidomicose, é capaz de colonizar diferentes órgãos do indivíduo afetado. O patógeno é capaz de acometer os órgãos linfóides, disseminando-se pelo baço e linfonodos, sendo que na forma mais grave (juvenil) provoca o aumento exacerbado do órgão (BENARD *et al.*, 1994, PEREIRA, *et al.*, 2004). Dados do nosso grupo mostram que além da colonização de órgãos linfóides secundários, o *P. brasiliensis* é capaz de invadir o timo de animais

experimentalmente infectados, provocando atrofia tímica e alterações histológicas e ultra-estruturais no órgão (BRITO *et al.*, 2003, SOUTO *et al.*, 2003)..

No presente trabalho procuramos investigar se a infecção por *P. brasiliensis* é capaz de alterar o microambiente tímico, cuja manutenção é essencial para os eventos de migração intratímica que culminam com a maturação e exportação de linfócitos T para a periferia do sistema imune.

Nossos resultados mostram que o microambiente tímico é alterado após a inoculação com *P. brasiliensis* o que pode contribuir para a patogenia da doença, uma vez que a resposta imune celular, desencadeada por linfócitos T é fundamental para o controle das lesões e conseqüentemente da infecção (SINGER-VERMES *et al.*, 1993).

Apesar das alterações histológicas já documentadas no timo de animais inoculados por *P. brasiliensis*, os elementos de matriz extracelular, laminina e fibronectina, não apresentaram modificações na sua distribuição e densidade quando comparadas aos controles. Embora a fibronectina e laminina não estejam alteradas, é possível que outros componentes, como colágeno, possam apresentar modificações durante a infecção pelo fungo, implicando em alterações na arquitetura tímica.

Ainda que não tenham sido constatadas modificações nos elementos de matriz extracelular, a análise dos receptores para estes componentes mostrou-se alterada nos timócitos de animais infectados. Este dado sugere que a modulação destes receptores pode não estar diretamente relacionada com a disponibilidade da proteína, ou ainda que outros ligantes, como VCAM-1 (do inglês, vascular cell

adhesion molecule-1), que se liga ao VLA-4, receptor para fibronectina, por exemplo, expressos em células epiteliais tímicas estejam alterados e possam modular a expressão dos receptores de matriz nos timócitos (SALOMON *et al.*, 1997, PROCKOP *et al.*, 2002).

Em timos normais os timócitos de perfil mais imaturo, duplo negativos e duplo positivos, apresentam alta expressão de VLA-4 que é modulada negativamente nos estágios mais maduros SP CD4⁺ e CD8⁺ (MOJCIK *et al.*, 1995). Em nosso modelo, as populações imaturas apresentam queda na expressão de VLA-4, sugerindo alteração na ligação entre os elementos de matriz e seus receptores nos timócitos nestes estágios.

A literatura mostra que a adesão firme e a modulação deste fenômeno promovida pela ligação entre o VLA-4 e a fibronectina é essencial para a migração e a progressão DN para DP e posteriormente para timócitos simples positivos (revisto por SAVINO, *et al.*, 2002 e 2004). Interessantemente, observa-se um aumento no número absoluto de timócitos DN no timo de animais inoculados e um decréscimo em DP (dados não mostrados), podendo ocasionar a retenção de timócitos no estágio DN, diretamente relacionada com a diminuição da expressão observada no receptor VLA-4.

Ainda que mais discretas alterações, no receptor VLA-5, outra integrina que se liga a fibronectina, foram observadas. Houve redução no número relativo de timócitos SP CD8⁺ que expressam esta molécula. Crisa e colaboradores (1996) mostraram que existe uma cooperação entre os receptores VLA-4 e VLA-5 na ligação com fibronectina e que a velocidade de migração e o tempo de adesão são

sinalizados por esta interação. Assim, é possível que as alterações observadas nos receptores de fibronectina após a inoculação com *P. brasiliensis* alterem o tempo de adesão dos timócitos ao substrato provocando alterações no sinal gerado e na migração intratímica com conseqüências para a progressão necessária para a diferenciação de timócitos.

A inoculação com *P. brasiliensis* provocou queda na expressão de VLA-6, receptor de laminina, em timócitos duplo negativos, o que pode afetar a correta sinalização e migração intratímica, uma vez que a progressão de timócitos duplo negativos para duplo positivos é parcialmente mediada pela interação laminina/VLA-6 (CHANG *et al.*, 1995, MAGNER *et al.*, 2000).

O conjunto de alterações observado na expressão de receptores de matriz extracelular aponta comprometimento dos processos de adesão e sinalização de timócitos, dependentes da interação com componentes da matriz. Possivelmente, resultando em menor tempo de adesão dos timócitos ao substrato, ocasionando defeitos na sinalização intracelular que desencadearia, ao menos em tese, processos de morte celular, diretamente relacionados a intensa apoptose observada na região cortical do timo de animais inoculados com *P. brasiliensis*.

As quimiocinas configuram-se como elementos essenciais na condução de timócitos para os diferentes microambientes tímicos e, portanto, imprescindíveis para a manutenção dos diferentes nichos no timo (revisto por TAKAHAMA, 2006).

O timo de animais inoculados com *P. brasiliensis* apresentou queda na expressão gênica de CXCL12, mas não houve modulação da expressão do receptor nos timócitos, uma vez que o mesmo não se alterou. Contudo, observou-

se aumento no número relativo de timócitos duplo negativos que expressam CXCR4, sugerindo uma possível retenção destas células neste estágio de diferenciação. Timócitos mais imaturos são os mais afetados no timo de animais inoculados com *P. brasiliensis* e o aumento em número absoluto desta subpopulação no timo está diretamente relacionado com as alterações no microambiente tímico.

A menor expressão da quimiocina CXCL12, observada no timo dos animais infectados, pode estar relacionada com a apoptose cortical já documentada neste modelo, uma vez que esta quimiocina possui importante papel anti-apoptótico (BROXMEYER *et al.*, 2003, GEUTSKENS *et al.*, 2004, HERNANDEZ-LOPEZ *et al.*, 2008). Vale ressaltar que o seu receptor é principalmente expresso em células duplo-positivas e duplo-negativas, localizadas no córtex (SUZUKI *et al.*, 1999) região da intensa apoptose induzida pela inoculação com *P. brasiliensis* (BRITO *et al.*, 2003, SOUTO *et al.*, 2003)

Além da ocorrência de morte celular, a própria migração intratímica pode estar alterada neste modelo, considerando-se a importância da interação CXCL12/CXCR4 para a modulação destes eventos e diferenciação dos timócitos. No timo normal, a quimiocina CXCL12 induz a migração de timócitos duplo negativos para a porção subcapsular do córtex. Assim, modificações na interação CXCL12/CXCR4, podem afetar os eventos iniciais de migração, alterando seqüencialmente os eventos seguintes.

Fisiologicamente, timócitos simples positivos apresentam uma regulação negativa da expressão de CCR9 que estaria relacionada com a emigração para

órgãos linfóides periféricos (CAMPBELL, *et al.*, 1999, CARRAMOLINO *et al.*, 2001). Timócitos CD8⁺ apresentaram aumento de expressão de CCR9, indicando que não houve uma regulação negativa do receptor nesta subpopulação, sugerindo alterações no padrão de exportação de linfócitos T para a periferia do sistema imune e conseqüentemente a resposta imune contra o fungo.

É importante lembrar que, além de participar nos eventos de progressão de timócitos, principalmente na transição de duplo negativos para duplo positivos, a interação entre CCL25 e CCR9 tem papel importante na liberação de sinais que afetam a seleção positiva no timo (CARRAMOLINO *et al.*, 2001, YOUN *et al.*, 2002, SVENSSOM *et al.*, 2008), assim não podemos descartar a hipótese de falhas nos mecanismos de seleção frente as alterações na expressão da quimiocina CCL25 e seu receptor CCR9.

As alterações descritas no microambiente tímico de animais infectados estão intimamente relacionadas com possíveis alterações funcionais na migração dos timócitos. De fato, a análise *in vitro* da migração de timócitos frente a diferentes estímulos, mostrou alterações significativas nos eventos de migração.

Foi possível observar redução na migração frente aos elementos de matriz, indicando que a queda nos receptores relacionados (VLA-4, 5 e 6) de fato altera os padrões de migração de timócitos em animais infectados. A literatura mostra que a diminuição na expressão de tais receptores leva realmente a diferenças na migração dirigida por elementos de matriz extracelular (MENDES-DA-CRUZ, *et al.*, 2006 e 2008).

A migração também se mostrou alterada frente à quimiocina CXCL12, apresentando inibição em relação aos controles. Embora não tenham sido observadas alterações significativas na expressão do CXCR4, seu receptor, é possível que o nível de ativação do mesmo esteja alterado e isso resulte em redução da migração.

Combinações entre quimiocinas e elementos de matriz induzem elevada migração de timócitos *ex vivo* (MENDES-DA-CRUZ *et al.*, 2006). Por exemplo, CXCL12 quando combinada com fibronectina aumenta a atividade migratória de timócitos quando comparada com fibronectina ou CXCL12 sozinha, o mesmo efeito é observado com laminina (SILVA-MONTEIRO *et al.*, 2007).

Nossos resultados mostram que mesmo com aumento da migração provocada pela combinação das moléculas, os timócitos de animais infectados migram numa frequência menor que os controles, sugerindo que as modificações descritas nos receptores, em especial nos de matriz extracelular afetam funcionalmente os timócitos, e as alterações menos pronunciadas nos receptores de quimiocinas não são suficientes para compensar os efeitos nos receptores de matriz.

No timo ocorrem interações entre elemento de matriz extracelular e quimiocinas importantes no direcionamento e adesão necessários para a diferenciação de timócitos. (revisto por SAVINO *et al.*, 2002 e 2004). A quimiocina CXCL12, por exemplo, é capaz de aumentar a expressão de VLA-4 em progenitores hematopoiéticos, resultando em maior adesão à fibronectina (GLODEK *et al.*, 2007). É possível que em nosso modelo a queda na expressão

de VLA-4 possa estar sendo modulada pela expressão de CXCL12, indicando que mais do que um papel de atração, as quimiocinas modulam outras moléculas no microambiente tímico, mostrando que a diferenciação de timócitos é complexa e diferentes moléculas combinadas atuam na maturação destas células e na manutenção do microambiente propício para o desenvolvimento dos linfócitos T.

Alterações no padrão de migração *ex vivo*, em infecções, estão diretamente relacionadas a modificações nas subpopulações de órgãos linfóides periféricos (MENDES-DA-CRUZ *et al.*, 2003). Assim, foram investigadas possíveis alterações nas subpopulações de linfócitos T no baço de animais inoculados com *P. brasiliensis*.

Embora tenhamos constatado alterações na migração *ex vivo*, a análise do baço de animais infectados não mostrou alterações no perfil de linfócitos T. Assim, é possível que a atrofia tímica, em conjunto com as alterações descritas sejam resultados mais relacionados com a apoptose do que com a exportação de timócitos imaturos. Entretanto, é provável que distúrbios na migração intratímica, que afetam a funcionalidade do órgão, estejam ocorrendo e resultando em maturação alterada de timócitos em animais experimentalmente inoculados com *P. brasiliensis*, com conseqüências para a resposta imune periférica.

De fato, a literatura mostra que o timo parece ter papel importante no curso da infecção, uma vez que camundongos atímicos são mais susceptíveis a infecção do que os eutímicos. No modelo de infecção com a cepa PB 18 (virulenta), eles vão a óbito antes de animais eutímicos e são incapazes de controlar a disseminação do patógeno, que coloniza diferentes tecidos com

progressão das lesões enquanto animais eutímicos morrem posteriormente e apresentam pequenas lesões com granulomas fusionados (LENZI, *et al.*, 1994, BURGER *et al.*, 1996a e 1996b).

Desta forma, é possível que as alterações observadas no microambiente ocasionem falhas na maturação de timócitos levando a distúrbios na resposta imune periférica mediada por linfócitos T, uma vez que o microambiente intacto, imprescindível para o correto desenvolvimento de timócitos, é modificado frente a inoculação do patógeno.

Além disso, é importante lembrar que o *P.brasiliensis* está presente no parênquima tímico, indicando que os mecanismos de tolerância central podem estar corrompidos, gerando um desequilíbrio na resposta dos linfócitos T na periferia do sistema imune ou ainda, um aumento de células T regulatórias que afetariam a resposta do indivíduo ao patógeno.

5.2. Alterações no microambiente tímico de animais inoculados com *Plasmodium berghei* cepa NK65

É bem documentada na literatura a atrofia tímica desencadeada por agentes patogênicos, sendo que a infecção por *T. cruzi* é a mais bem caracterizada quanto a alterações estruturais e funcionais, bem como as possíveis conseqüências destas modificações para o estabelecimento da resposta imune contra o parasita e na promoção da resposta auto-imune observada na Doença de Chagas (SILVA-MONTEIRO *et al.*, 2007, MENDES-DA-CRUZ *et al.*, 2006,

HENRIQUE-PONS *et al.*, 2004, COTTA –DE-ALMEIDA *et al.*, 2003, MENDES-DA-CRUZ *et al.*, 2003).

Dados do nosso grupo mostram que infecção aguda por *P. berghei* é capaz de provocar intensa atrofia tímica que coincide com o pico de parasitemia, a exemplo do que ocorre na infecção por *T. cruzi*. Esta atrofia é acompanhada por intensa desorganização cortico-medular, com aparente depleção da região cortical (ANDRADE *et al.*, 2008).

Embora não seja alvo do presente estudo, é possível que a presença do patógeno, estimulando a produção local de mediadores ou mesmo alguma molécula oriunda do agente parece ser importante para o estabelecimento da atrofia observada. Em infecções por *T. cruzi*, por exemplo, a apoptose observada em TNCs parece ser devida a uma enzima transialidase derivada do parasita (MUCCI *et al.*, 2002). Em nosso modelo, a atrofia somente foi observada após a detecção do parasita no microambiente tímico, o que corrobora a hipótese acima levantada (ANDRADE *et al.*, 2008).

A matriz extracelular configura-se como um elemento chave na migração intratímica e a interação entre os timócitos e a matriz é essencial para a sinalização dependente da adesão (revisto por SAVINO *et al.*, 2002 e 2004).

Na infecção por *P. berghei*, observamos aumento na densidade de laminina e fibronectina, indicando que a intensa atrofia tímica observada é acompanhada de alterações no microambiente tímico.

O aumento na densidade de fibronectina e de laminina pode estar relacionado com a produção de citocinas como IFN- γ que em determinadas concentrações pode estimular a síntese de elementos de matriz, (LANNES-VIEIRA *et al.*, 1991, LAGROTA-CANDIDO *et al.*, 1996). A malária é uma doença que provoca liberação de IFN- γ durante a resposta imunológica (revisto por SCHOFIELD & GRAU, 2005) e esta molécula pode contribuir para o adensamento de matriz extracelular observado no timo de animais infectados.

Na atrofia tímica induzida por *T.cruzi*, observa-se um aumento na deposição de matriz extracelular, uma vez que a infecção de cultura de células epiteliais tímicas pelo patógeno resulta em aumento da produção de fibronectina. Conjuntamente com o aumento na deposição de matriz extracelular, a infecção por *T.cruzi* leva ao aumento na expressão dos seus receptores específicos (COTTA-DE-ALMEIDA *et al.*, 2003). No nosso modelo, surpreendentemente, observa-se diminuição na expressão de VLA-4, VLA-5 receptores para fibronectina e VLA-6, receptor para laminina, levantando duas hipóteses (i) o aumento da densidade não regula positivamente os receptores ou (ii) a alta densidade dos elementos não revela necessariamente maior deposição de matriz extracelulares.

Interessantemente, embora a subpopulação de timócitos duplo positivos tenha sido a mais afetada no nosso modelo, com drástica diminuição em números absolutos e relativos, os timócitos duplo negativos e simples positivos, mostraram maiores alterações em relação aos receptores de matriz extracelular. Considerando o papel da interação entre matriz extracelular e seus receptores na diferenciação de timócitos, é possível que a diminuição na expressão dos

receptores diminua o tempo de adesão à matriz e assim os processos de migração e a sinalização dependentes desta adesão estejam alterados e os timócitos possam, inclusive, entrar em apoptose, com conseqüências para o estabelecimento da resposta imune contra o parasita.

Os elementos de matriz, em conjunto com as quimiocinas, promovem a migração coordenada de timócitos, que culmina com a maturação dos mesmos (revisto por SAVINO *et al.*, 2004).

O timo de animais inoculados com *P. berghei*, apresenta aumento significativo da expressão gênica de CXCL12. O incremento de CXCL12 pode estar diretamente ligado ao aumento da densidade de fibronectina, uma vez que este elemento de matriz pode prevenir a degradação da quimiocina e ainda liberar sítios da molécula para a interação com os timócitos (PELLETIER *et al.*, 2000).

Conjuntamente com o aumento de CXCL12, foi possível observar o aumento na densidade do seu receptor, CXCR4 nas subpopulações de timócitos, possivelmente regulada positivamente pelo aumento na expressão da quimiocina. Como em nosso modelo, a infecção com *T. cruzi* provoca o aumento de CXCL12, acompanhado de aumento na expressão de CXCR4, o que altera a capacidade migratória dos timócitos infectados (MENDES-DA-CRUZ *et al.*, 2006). Embora a quimiocina CXCL12 tenha um papel anti-apoptótico através da regulação positiva de Bcl-2 e negativa de Bax (HERNANDEZ-LOPEZ *et al.*, 2008), não é descartada a hipótese de que a atrofia possa ser um conjunto de alterações no padrão de migração e de apoptose, induzida por sinalização inadequada para os timócitos, uma vez que quimiocinas têm sido descritas como participantes nos processo de

seleção negativa e positiva (ANDERSON *et al.*, 2000, YOUN, *et al.*, 2002, ANDERSON & JENKINSON *et al.*, 2007)

Em contrapartida ao observado na quimiocina CXCL12, a quimiocina CCL25 apresentou queda acentuada na expressão gênica, associada com o aumento da expressão do seu receptor CCR9 nas subpopulações de timócitos, o que indica uma possível modulação do receptor pela proteína, onde um decréscimo em CCL25 induz o aumento do receptor para a melhor utilização da quimiocina disponível no microambiente.

Dados sobre o papel de CCL25 e seu receptor em doenças infecciosas são escassos, mas seu papel na maturação de linfócitos T é bem documentado. Camundongos “knockout” para CCR9 apresentam distúrbios no desenvolvimento de linfócitos T (WURBEL *et al.*, 2001). A regulação positiva do receptor CCR9 parece ser um importante fator anti-apoptótico (revisto por YOUN *et al.*, 2002). Entretanto, em nosso modelo, a hipótese de morte celular não pode ser descartada, pois, a disponibilidade de CCL25 para interagir com CCR9 é reduzida, além disso, outras moléculas como TNF- α , IFN- γ e hormônios poderiam estimular a ativação da cascata de sinalização indutora de apoptose (revisto por YARILIN *et al.*, 2004).

As modificações observadas no microambiente tímico dos animais inoculados com *Plasmodium berghei*, promoveram alterações funcionais na migração *ex vivo*, a exemplo da infecção por *T. cruzi*, onde ocorre aumento da atividade migratória frente à elementos de matriz (laminina e fibronectina), quimiocinas (CXCL12) e a combinação entre eles, indicando que o microambiente

tímico alterado tem conseqüências para a migração e conseqüentemente para o desenvolvimento de linfócitos T (COTTA-DE ALMEIDA *et al.*, 2003, MENDES-DA CRUZ, *et al.*, 2006).

A migração frente à fibronectina não aumentou a capacidade migratória dos timócitos infectados, este dado pode estar relacionado com a queda na expressão dos receptores deste elemento nos timócitos. Entretanto, mesmo com queda na expressão de VLA-6, houve aumento na migração dirigida por laminina, sugerindo que mais do que a densidade do receptor na superfície, seu estado de ativação parece ser fator determinante na avidéz ao ligante e, conseqüentemente, na resposta ao estímulo. De fato, St Pyerre e colaboradores (1996) mostraram que as mudanças na avidéz do receptor com o seu ligante são mais relacionadas ao estado de fosforilação do receptor do que a quantidade do mesmo na superfície celular.

Frente às quimiocinas CXCL12 e CCL25 também houve aumento na atividade migratória dos timócitos e neste caso, o aumento da expressão dos receptores de quimiocinas, favoreceu o resultado obtido. Interessantemente, a combinação entre fibronectina e CXCL12 ou CCL25 aumentou a atividade migratória dos timócitos, de forma mais acentuada com CXCL12 do que com CCL25. Este incremento foi maior ainda nos timócitos de animais infectados, sugerindo um possível mecanismo compensatório induzido pelos receptores CXCR4 e CCR9 frente à queda de expressão dos receptores de matriz extracelular ou ainda corroborando a hipótese que o estado de ativação seja um fator preponderante na resposta ao estímulo.

A combinação entre laminina e as quimiocinas também proporcionou intensa atividade migratória em timócitos de animais inoculados com *P.berghei*. Em infecções por *T. cruzi*, o aumento de migração frente à laminina e CXCL12 combinadas, é também verificado (SILVA-MONTEIRO *et al.*, 2007)

Para avaliar se a intensa atividade migratória observada *ex vivo* alterava o padrão das subpopulações na periferia do sistema imune, foi analisado o baço de animais infectados por *P.berghei*, onde foi detectado aumento de células duplo negativas, CD4⁺ e CD8⁺ que interessantemente, são as subpopulações que possuem a maior porcentagem de migração frente aos estímulos utilizados.

É possível que o aumento das células duplo negativas, CD4⁺ e CD8⁺ observado no baço possa ser de fato relacionado com a migração alterada detectada na migração *ex vivo*, mas não podemos descartar o aumento gerado pela resposta proliferativa dos linfócitos T residentes no baço durante a resposta imunológica ao *P. berghei*.

O aumento de timócitos imaturos nos linfonodos, com TCR que deveriam ser eliminados nos processos de seleção no timo, é observado nas infecções por *T.cruzi* (MENDES-DA-CRUZ *et al.*, 2003). É possível que a análise de tais órgãos linfóides na infecção por malária apresente resultados semelhantes. Mas, é importante ressaltar que a malária não apresenta caráter autoimune como observado na doença de Chagas (KIERSZENBAUM, 1999), sugerindo que, além da exportação de células imaturas para a periferia, as alterações na arquitetura e microambiente tímicos resultam de prováveis distúrbios na migração intratímica

que por sua vez alteram a maturação de timócitos com implicações para a resposta imune periférica.

Além disso, a intensa apoptose sugerida, principalmente em timócitos duplo positivos, poderia diminuir a diversidade do repertório de linfócitos T, uma vez que se tem um menor número de timócitos passando pelos processos de seleção positiva e negativa, o que conseqüentemente pode alterar a resposta imunológica do indivíduo, não somente na infecção por malária mas em outras co-infecções.

Os fatores indutores da atrofia tímica e das alterações no microambiente não foram alvos deste estudo, mas não podemos descartar a participação de mediadores da resposta imune sistêmica e os hormônios produzidos em resposta ao “stress” como desencadeadores do processo de atrofia aqui documentados.

5.3. Alterações no microambiente tímico de animais diabéticos induzidos por aloxana.

A diabetes configura-se como uma síndrome complexa e seus efeitos sob o sistema imune ainda não são totalmente elucidados (MULLER *et al.*, 2005, ALBA LOUEIRO *et al.*, 2007, BENFIELD *et al.*, 2007, HIRSCH *et al.*, 2008). Neste sentido, o estudo da função tímica durante o diabetes é essencial para o entendimento de possíveis alterações na maturação de linfócitos T que podem ter conseqüências para a resposta imune.

A atrofia tímica observada em nosso modelo é acompanhada de alterações histológicas nas regiões cortical e medular do timo e considerando que o processo

de diferenciação de timócitos é dependente da integridade da arquitetura tímica, acreditamos que a maturação dos timócitos é comprometida, com conseqüências para a resposta imune periférica

Como ocorre em algumas doenças infecciosas, além da ocorrência de atrofia, o microambiente tímico de animais diabéticos também é afetado. Animais inoculados com estreptozotocina apresentam perda de delimitação córtico - medular e aumento de apoptose (ELMAS *et al.*, 2008). O microambiente tímico de animais NOD (do inglês, non obese diabetic) apresenta alterações em receptores de matriz e quimiocinas que alteram o padrão migratório de timócitos (MENDES-DA-CRUZ *et al.*, 2008).

Contrariamente ao observado em animais NOD, onde há aumento de densidade de fibronectina (MENDES- DA-CRUZ *et al.*, 2008), o timo de animais diabéticos induzidos por aloxana não demonstrou alterações na densidade deste elemento. Aliado a este dado, houve acentuada queda na expressão dos receptores VLA-4 e VLA-5 na superfície dos timócitos, sendo que as alterações no receptor VLA-5 foram mais pronunciadas. Em animais NOD também ocorre a diminuição da expressão de VLA-5, mas é importante esclarecer que nestes estudos os animais são pré-diabéticos, diferente do nosso modelo, onde a diabetes já esta estabelecida.

Embora a densidade de laminina tenha aumentando no timo de animais diabéticos induzidos por aloxana, isto não refletiu aumento no nível de expressão do seu receptor VLA-6 nas subpopulações de timócitos. O aumento de expressão de laminina está relacionada com altas taxas de migração (SMANIOTTO *et al.*,

2005, OCAMPO *et al.*, 2008), assim, é possível, que em nosso modelo, ocorram alterações na interação entre a matriz e o receptor, modificando os padrões de migração e a sinalização oriunda desta interação.

Conjuntamente com as alterações nos elementos de matriz e seus receptores, as quimiocinas e seus receptores também exibiram alterações no timo de animais diabéticos. Houve decréscimo na expressão gênica de CXCL12, mas em contrapartida o seu receptor CXCR4 teve sua expressão aumentada nos timócitos.

A diminuição de CXCL12 pode estar diretamente relacionada com a atrofia tímica e a perda de timócitos corticais observadas neste modelo, uma vez que é bem documentado o papel anti- apoptótico de CXCL12 (HERNANDEZ-LOPEZ *et al.*, 2008). Além da baixa expressão de CXCL12, o timo de animais diabéticos induzidos por aloxana apresenta diminuída expressão de CCL25 e do seu receptor, CCR9, outra molécula fortemente associada com eventos apoptóticos no timo.

Estes dados em conjunto, apontam que a atrofia tímica induzida neste modelo pode ser relacionada com mecanismos de apoptose de timócitos corticais, uma vez que a subpopulação de timócitos imaturos é a que sofre a maior depleção.

Embora o microambiente tímico esteja alterado no timo de animais diabéticos induzidos por aloxana, a migração *ex vivo* não se mostrou alterada, como em outros modelos de atrofia, nem mesmo quando CXCL12 foi utilizada em conjunto com laminina ou fibronectina, sugerindo que o aumento na expressão de

CXCR4 não teve efeito compensatório sobre o decréscimo da expressão dos receptores de matriz.

A análise das subpopulações de linfócitos T no baço de animais diabéticos não revelou alterações, indicando que a maciça perda de timócitos, principalmente duplo positivos esteja mais relacionada com apoptose do que com a liberação de timócitos imaturos para a periferia, como observado em outros modelos.

Corroborando esta hipótese, a quimiocina CXCL12 e o receptor CCR9 possuem papel anti-apoptótico, e a sua interação com CXCR4 e CCL25, respectivamente, promove a sobrevivência dos timócitos (HERNANDEZ-LOPEZ *et al.*, 2008, revisto por YOUN, *et al.*, 2002).. Assim, a menor expressão destes componentes poderia induzir a morte celular, principalmente em timócitos duplo positivos, mais susceptíveis. Interessantemente, em nosso modelo é esta a subpopulação que mais sofre queda.

O conjunto de dados exposto mostra que o microambiente tímico de animais diabéticos induzidos por aloxana é alterado, com modificações em componentes descritos como essenciais para a manutenção da funcionalidade do órgão. De fato, as alterações sugerem fortemente que migração intratímica e conseqüentemente a maturação de timócitos é prejudicada nestas condições, o que pode gerar impacto no sistema imune periférico, contribuindo para a maior susceptibilidade de pacientes diabéticos a infecções (MULLER *et al.*, 2005, BENFIELD *et al.*, 2007, HIRSCH *et al.*, 2008).

Diversas moléculas, principalmente hormônios, podem ser os responsáveis pelas alterações descritas no microambiente tímico, entre estes, a leptina, um

hormônio derivado de adipócitos, regulado por glicose, cortisol, insulina e citocinas (GRUVER *et al*, 2008). A literatura mostra que no diabetes, os níveis de leptina caem (SIVITZ, *et al.*, 1998, HAVEL *et al*, 1998). É possível que este decréscimo tenha influencia na atrofia tímica.

Desta forma, fica evidente a complexidade do controle da diferenciação de timócitos, que ocorre em um órgão com múltiplas interações como o timo, mas que sofre influências sistêmicas que alteram sua funcionalidade. Entender a rede de interações que ocorrem durante o desenvolvimento de timócitos em condições fisiológicas e patológicas pode contribuir para o entendimento e futura manipulação da resposta imunológica periférica favorecendo pacientes com distúrbios imunológicos.

5.4. Considerações finais e perspectivas

O timo é um órgão que sofre atrofia mediada por agentes infecciosos, mas também frente a distúrbios metabólicos, como a indução de diabetes por drogas. Na maioria dos modelos estabelecidos de atrofia tímica, observam-se alterações na arquitetura do órgão e perda pronunciada de timócitos, principalmente os duplo positivos, localizados no córtex tímico.

Embora este padrão de alterações seja observado em modelos distintos de indução de atrofia tímica, as modificações nos componentes do microambiente tímico parecem ser diferentes para cada modelo.

No presente trabalho, foi possível observar que os agentes indutores de atrofia utilizados apresentam graus diferentes de atrofia, que vão desde modificações leves (*P.brasiliensis*) e moderadas (diabetes), a intensas (malária).

Os resultados obtidos indicam que o nível de atrofia pode ser dependente da intensidade das alterações observadas e estas ainda relacionada a atividade migratória, uma vez que na malária observamos maior atrofia e intensa migração quando comparada aos outros modelos estudados.

Estas alterações por sua vez, podem estar intimamente ligadas com a patogênese da doença e, portanto, condicionada a fatores sistêmicos inerentes a resposta do hospedeiro, como liberação de citocinas e hormônios que podem atuar sobre o timo promovendo as alterações documentadas.

Além disso, no caso de agentes infecciosos, o próprio agente indutor, com suas estruturas, enzimas e metabólitos pode alterar de forma distinta o microambiente tímico, causando os diferentes resultados observados em cada um dos modelos. Apesar de distintas, as modificações aqui descritas sugerem impacto na migração intratímica, que podem ter conseqüências para a maturação dos linfócitos T e para a resposta imune periférica.

Acreditamos que além dos distúrbios na migração intratímica, o timo de animais infectados com *P.brasiliensis* ou oriundos de animais diabéticos induzidos por aloxana, sofra intenso processo de apoptose, que parece ser mais importante para o estabelecimento da atrofia do que distúrbios na migração. Esta perda de timócitos é prejudicial ao hospedeiro, pois pode haver queda no repertório de

linfócitos T na periferia do sistema imune, o que prejudicaria a resposta imune, não somente contra o patógeno em questão, mas contra outros microorganismos.

Ainda, a desorganização do timo pode alterar os processos de seleção positiva e negativa, exportando timócitos imaturos, com TCRs que deveriam ser eliminados na seleção tímica gerando processos autoimunes.

Nosso grupo tem buscado entender os mecanismos responsáveis pela atrofia tímica e uma questão levantada neste trabalho é a participação da apoptose no estabelecimento da atrofia. Neste sentido, investigações abordando o papel da morte celular programada e as possíveis vias relacionadas a este fenômeno estão em curso no nosso laboratório.

Igualmente, é possível que outros componentes do microambiente, intimamente relacionados com elementos de matriz extracelular e quimiocinas, como as MMPs (metaloproteinases de matriz) também participem ativamente no estabelecimento da atrofia e o papel destas moléculas no desencadeamento da atrofia também será investigado por nosso grupo. Pretendemos ainda, analisar a participação de hormônios como a leptina e outras moléculas relacionadas na promoção de alterações no microambiente tímico, contribuindo para o entendimento da função tímica durante processos atróficos que podem gerar distúrbios na resposta imune periférica.

6. Conclusões

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que:

- A intensidade da atrofia tímica é distinta, variando de leve a intensa nos diferentes modelos utilizados.
- As alterações no microambiente tímico também são diferentes em cada modelo, indicando que os mecanismos de atrofia são específicos.
- No modelo de atrofia tímica induzida por Pb, as alterações nos componentes de matriz, quimiocinas e receptores têm impacto na migração, causando inibição o que pode alterar a resposta imune periférica do hospedeiro.
- A atrofia desencadeada pela infecção com *P.berghei* é intensa, com alterações pronunciadas nos componentes do microambiente tímico, sugerindo forte comprometimento da função tímica.
- A indução de diabetes causa alterações significativas nos elementos analisados, mas estas alterações não afetam a migração. Com a ausência de um agente patogênico, é possível que as alterações documentadas sejam oriundas de componentes hormonais.
- As modificações diferenciais nos elementos analisados sugerem comprometimento da migração intratímica e na exportação de timócitos, com comprometimento da função tímica.

- As alterações observadas indicam a maturação desequilibrada dos timócitos, o que pode ter consequências para a resposta imune periférica.

Assim, a atrofia tímica e o comprometimento do órgão parecem estar associados com componentes sistêmicos que podem atuar sobre o timo, mas também, no caso de patógenos, com a presença do mesmo no tecido tímico a eventual liberação de metabólitos.

7. Referências Bibliográficas

Alba-Loureiro, T. C., Munhoz, C. D., Martins, J. O., Cerchiaro, G. A., Scavone, C., Curi, R., & Sannomiya, P. (2007). Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus. *Braz J Med Biol Res*, 40(8), 1037-1044.

Alvarez, F., Villena, A., Zapata, A., & Razquin, B. (1995). Histopathology of the thymus in *Saprolegnia*-infected wild brown trout, *Salmo trutta* L. *Vet Immunol Immunopathol*, 47(1-2), 163-172.

Anderson, G., Harman, B. C., Hare, K. J., & Jenkinson, E. J. (2000). Microenvironmental regulation of T cell development in the thymus. *Semin Immunol*, 12(5), 457-464.

Anderson, G., & Jenkinson, E. J. (2001). Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat Rev Immunol*, 1(1), 31-40.

Anderson, G., & Jenkinson, E. J. (2007). Investigating central tolerance with reaggregate thymus organ cultures. *Methods Mol Biol*, 380, 185-196.

Andrade, C. F., Gameiro, J., Nagib, P. R., Carvalho, B. O., Talaisys, R. L., Costa, F. T., & Verinaud, L. (2008). Thymic alterations in *Plasmodium berghei*-infected mice. *Cell Immunol*, 253(1-2), 1-4.

Andrew, D., & Aspinall, R. (2002). Age-associated thymic atrophy is linked to a decline in IL-7 production. *Exp Gerontol*, 37(2-3), 455-463.

Annunziato, F., Romagnani, P., Cosmi, L., Lazzeri, E., & Romagnani, S. (2001). Chemokines and lymphopoiesis in human thymus. *Trends Immunol*, 22(5), 277-281.

Ara, T., Itoi, M., Kawabata, K., Egawa, T., Tokoyoda, K., Sugiyama, T., Fujii, N., Amagai, T., & Nagasawa, T. (2003). A role of CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor-1/pre-B cell growth stimulating factor and its receptor CXCR4 in fetal and adult T cell development in vivo. *J Immunol*, 170(9), 4649-4655.

Aspinall, R., Andrew, D., & Pido-Lopez, J. (2002). Age-associated changes in thymopoiesis. *Springer Semin Immunopathol*, 24(1), 87-101.

Aspinall, R., & Mitchell, W. (2008). Reversal of age-associated thymic atrophy: treatments, delivery, and side effects. *Exp Gerontol*, 43(7), 700-705.

Bachmann, M. F., Kopf, M., & Marsland, B. J. (2006). Chemokines: more than just road signs. *Nat Rev Immunol*, 6(2), 159-164.

Benard, G., Mendes-Giannini, M. J., Juvenale, M., Miranda, E. T., & Duarte, A. J. (1997). Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. *J Infect Dis*, 175(5), 1263-1267.

Benard, G., Orii, N. M., Marques, H. H., Mendonca, M., Aquino, M. Z., Campeas, A. E., del Negro, G. B., Durandy, A., & Duarte, A. J. (1994). Severe acute paracoccidioidomycosis in children. *Pediatr Infect Dis J*, 13(6), 510-515.

Benfield, T., Jensen, J. S., & Nordestgaard, B. G. (2007). Influence of diabetes and hyperglycaemia on infectious disease hospitalisation and outcome. *Diabetologia*, 50(3), 549-554.

Berrih, S., Savino, W., & Cohen, S. (1985). Extracellular matrix of the human thymus: immunofluorescence studies on frozen sections and cultured epithelial cells. *J Histochem Cytochem*, 33(7), 655-664.

Bertho, J. M., Demarquay, C., Moulian, N., Van Der Meeren, A., Berrih-Aknin, S., & Gourmelon, P. (1997). Phenotypic and immunohistological analyses of the human adult thymus: evidence for an active thymus during adult life. *Cell Immunol*, 179(1), 30-40.

Bertho, J. M., Demarquay, C., Moulian, N., Van Der Meeren, A., Berrih-Aknin, S., & Gourmelon, P. (1997). Phenotypic and immunohistological analyses of the human adult thymus: evidence for an active thymus during adult life. *Cell Immunol*, 179(1), 30-40.

Bleul, C. C., & Boehm, T. (2000). Chemokines define distinct microenvironments in the developing thymus. *Eur J Immunol*, 30(12), 3371-3379.

Brito, V. N., Souto, P. C., Cruz-Hofling, M. A., Ricci, L. C., & Verinaud, L. (2003). Thymus invasion and atrophy induced by *Paracoccidioides brasiliensis* in BALB/c mice. *Med Mycol*, 41(2), 83-87.

Broxmeyer, H. E., Kohli, L., Kim, C. H., Lee, Y., Mantel, C., Cooper, S., Hangoc, G., Shaheen, M., Li, X., & Clapp, D. W. (2003). Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 directly enhances survival/antiapoptosis of myeloid progenitor cells through CXCR4 and G(alpha)i proteins and enhances engraftment of competitive, repopulating stem cells. *J Leukoc Biol*, 73(5), 630-638.

Brummer, E., Castaneda, E., & Restrepo, A. (1993). Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev*, 6(2), 89-117.

Burger, E., Miyaji, M., Sano, A., Calich, V. L., Nishimura, K., & Lenzi, H. L. (1996). Histopathology of paracoccidioidomycotic infection in athymic and euthymic mice: a sequential study. *Am J Trop Med Hyg*, 55(2), 235-242.

Burger, E., Vaz, C. C., Sano, A., Calich, V. L., Singer-Vermes, L. M., Xidieh, C. F., Kashino, S. S., Nishimura, K., & Miyaji, M. (1996). *Paracoccidioides brasiliensis* infection in nude mice: studies with isolates differing in virulence and definition of their T cell-dependent and T cell-independent components. *Am J Trop Med Hyg*, 55(4), 391-398.

Campbell, J. J., Pan, J., & Butcher, E. C. (1999). Cutting edge: developmental switches in chemokine responses during T cell maturation. *J Immunol*, 163(5), 2353-2357.

Carramolino, L., Zaballos, A., Kremer, L., Villares, R., Martin, P., Ardavin, C., Martinez, A. C., & Marquez, G. (2001). Expression of CCR9 beta-chemokine receptor is modulated in thymocyte differentiation and is selectively maintained in CD8(+) T cells from secondary lymphoid organs. *Blood*, 97(4), 850-857.

Chakravarty, S., Baldeviano, G. C., Overstreet, M. G., & Zavala, F. (2008). Effector CD8⁺ T lymphocytes against liver stages of *Plasmodium yoelii* do not require gamma interferon for antiparasite activity. *Infect Immun*, 76(8), 3628-3631.

Chakravarty, S., Cockburn, I. A., Kuk, S., Overstreet, M. G., Sacci, J. B., & Zavala, F. (2007). CD8⁺ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. *Nat Med*, 13(9), 1035-1041.

Chang, A. C., Salomon, D. R., Wadsworth, S., Hong, M. J., Mojcik, C. F., Otto, S., Shevach, E. M., & Coligan, J. E. (1995). Alpha 3 beta 1 and alpha 6 beta 1 integrins mediate laminin/merosin binding and function as costimulatory molecules for human thymocyte proliferation. *J Immunol*, 154(2), 500-510.

Chen, W., Kuolee, R., Austin, J. W., Shen, H., Che, Y., & Conlan, J. W. (2005). Low dose aerosol infection of mice with virulent type A *Francisella tularensis* induces severe thymus atrophy and CD4⁺CD8⁺ thymocyte depletion. *Microb Pathog*, 39(5-6), 189-196.

Ciofani, M., & Zuniga-Pflucker, J. C. (2006). A survival guide to early T cell development. *Immunol Res*, 34(2), 117-132.

Ciofani, M., & Zuniga-Pflucker, J. C. (2007). The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23, 463-493.

Collins, T. J. (2007). ImageJ for microscopy. *Biotechniques*, 43(1 Suppl), 25-30.

Colognato, H., & Yurchenco, P. D. (2000). Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn*, 218(2), 213-234.

Cotta-de-Almeida, V., Bonomo, A., Mendes-da-Cruz, D. A., Riederer, I., De Meis, J., Lima-Quaresma, K. R., Vieira-de-Abreu, A., Villa-Verde, D. M., & Savino, W. (2003). Trypanosoma cruzi infection modulates intrathymic contents of extracellular matrix ligands and receptors and alters thymocyte migration. *Eur J Immunol*, 33(9), 2439-2448.

Crisa, L., Cirulli, V., Ellisman, M. H., Ishii, J. K., Elices, M. J., & Salomon, D. R. (1996). Cell adhesion and migration are regulated at distinct stages of thymic T cell development: the roles of fibronectin, VLA4, and VLA5. *J Exp Med*, 184(1), 215-228.

Dalmau, S. R., Freitas, C. S., & Savino, W. (1999). Upregulated expression of fibronectin receptors underlines the adhesive capability of thymocytes to thymic epithelial cells during the early stages of differentiation: lessons from sublethally irradiated mice. *Blood*, 93(3), 974-990.

Delamaire, M., Maugendre, D., Moreno, M., Le Goff, M. C., Allannic, H., & Genetet, B. (1997). Impaired leucocyte functions in diabetic patients. *Diabet Med*, 14(1), 29-34.

Douek, D. C., & Koup, R. A. (2000). Evidence for thymic function in the elderly. *Vaccine*, 18(16), 1638-1641.

Douek, D. C., McFarland, R. D., Keiser, P. H., Gage, E. A., Massey, J. M., Haynes, B. F., Polis, M. A., Haase, A. T., Feinberg, M. B., Sullivan, J. L., Jamieson, B. D., Zack, J. A., Picker, L. J., & Koup, R. A. (1998). Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*, 396(6712), 690-695.

Dudley, E. C., Girardi, M., Owen, M. J., & Hayday, A. C. (1995). Alpha beta and gamma delta T cells can share a late common precursor. *Curr Biol*, 5(6), 659-669.

Elmas, C., Erdogan, D., Take, G., Ozogul, C., Nacar, A., & Koksai, M. (2008). Ultrastructure of the thymus in diabetes mellitus and starvation. *Adv Ther*, 25(1), 67-76.

Foss, D. L., Donskoy, E., & Goldschneider, I. (2001). The importation of hematogenous precursors by the thymus is a gated phenomenon in normal adult mice. *J Exp Med*, 193(3), 365-374.

Franco, M. (1987). Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol*, 25(1), 5-18.

Franco, M., Montenegro, M. R., Mendes, R. P., Marques, S. A., Dillon, N. L., & Mota, N. G. (1987). Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop*, 20(2), 129-132.

Fu, W., & Chen, W. (2004). Roles of chemokines in thymopoiesis: redundancy and regulation. *Cell Mol Immunol*, 1(4), 266-273.

Garcia-Suarez, O., Perez-Perez, M., Germana, A., Esteban, I., & Germana, G. (2003). Involvement of growth factors in thymic involution. *Microsc Res Tech*, 62(6), 514-523.

Geutskens, S. B., Mendes-da-Cruz, D. A., Dardenne, M., & Savino, W. (2004). Fibronectin receptor defects in NOD mouse leucocytes: possible consequences for type 1 diabetes. *Scand J Immunol*, 60(1-2), 30-38.

Glodek, A. M., Le, Y., Dykxhoorn, D. M., Park, S. Y., Mostoslavsky, G., Mulligan, R., Lieberman, J., Beggs, H. E., Honczarenko, M., & Silberstein, L. E. (2007). Focal adhesion kinase is required for CXCL12-induced chemotactic and pro-adhesive responses in hematopoietic precursor cells. *Leukemia*, 21(8), 1723-1732.

Goldani, L. Z., & Sugar, A. M. (1995). Paracoccidioidomycosis and AIDS: an overview. *Clin Infect Dis*, 21(5), 1275-1281.

Goldschneider, I., Komschlies, K. L., & Greiner, D. L. (1986). Studies of thymocytopoiesis in rats and mice. I. Kinetics of appearance of thymocytes using a direct intrathymic adoptive transfer assay for thymocyte precursors. *J Exp Med*, 163(1), 1-17.

Gray, D. H., Chidgey, A. P., & Boyd, R. L. (2002). Analysis of thymic stromal cell populations using flow cytometry. *J Immunol Methods*, 260(1-2), 15-28.

Gray, D. H., Ueno, T., Chidgey, A. P., Malin, M., Goldberg, G. L., Takahama, Y., & Boyd, R. L. (2005). Controlling the thymic microenvironment. *Curr Opin Immunol*, 17(2), 137-143.

Greenwood, B. M., Bojang, K., Whitty, C. J., & Targett, G. A. (2005). Malaria. *Lancet*, 365(9469), 1487-1498.

Gruver, A. L., Hudson, L. L., & Sempowski, G. D. (2007). Immunosenescence of ageing. *J Pathol*, 211(2), 144-156.

Gruver, A. L., & Sempowski, G. D. (2008). Cytokines, leptin, and stress-induced thymic atrophy. *J Leukoc Biol*, 84(4), 915-923.

Guidos, C. (2006). Thymus and T-lymphocyte development: what is new in the 21st century? *Immunol Rev*, 209, 5-9.

Havel, P. J., Uriu-Hare, J. Y., Liu, T., Stanhope, K. L., Stern, J. S., Keen, C. L., & Ahren, B. (1998). Marked and rapid decreases of circulating leptin in streptozotocin diabetic rats: reversal by insulin. *Am J Physiol*, 274(5 Pt 2), R1482-1491.

Haynes, B. F., Sempowski, G. D., Wells, A. F., & Hale, L. P. (2000). The human thymus during aging. *Immunol Res*, 22(2-3), 253-261.

Henriques-Pons, A., DeMeis, J., Cotta-De-Almeida, V., Savino, W., & Araujo-Jorge, T. C. (2004). Fas and perforin are not required for thymus atrophy induced by *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitol*, 107(1-2), 1-4.

Hernandez-Lopez, C., Valencia, J., Hidalgo, L., Martinez, V. G., Zapata, A. G., Sacedon, R., Varas, A., & Vicente, A. (2008). CXCL12/CXCR4 signaling promotes human thymic dendritic cell survival regulating the Bcl-2/Bax ratio. *Immunol Lett*, 120(1-2), 72-78.

Hernandez-Lopez, C., Varas, A., Sacedon, R., Jimenez, E., Munoz, J. J., Zapata, A. G., & Vicente, A. (2002). Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for early human T-cell development. *Blood*, 99(2), 546-554.

Hirokawa, K., Utsuyama, M., Kasai, M., Kurashima, C., Ishijima, S., & Zeng, Y. X. (1994). Understanding the mechanism of the age-change of thymic function to promote T cell differentiation. *Immunol Lett*, 40(3), 269-277.

Hirsch, T., Spielmann, M., Zuhaili, B., Koehler, T., Fossum, M., Steinau, H. U., Yao, F., Steinstraesser, L., Onderdonk, A. B., & Eriksson, E. (2008). Enhanced susceptibility to infections in a diabetic wound healing model. *BMC Surg*, 8, 5.

Iwao, M., Fukada, S., Harada, T., Tsujikawa, K., Yagita, H., Hiramane, C., Miyagoe, Y., Takeda, S., & Yamamoto, H. (2000). Interaction of merosin (laminin 2) with very late activation antigen-6 is necessary for the survival of CD4⁺ CD8⁺ immature thymocytes. *Immunology*, 99(4), 481-488.

Jamieson, B. D., Douek, D. C., Killian, S., Hultin, L. E., Scripture-Adams, D. D., Giorgi, J. V., Marelli, D., Koup, R. A., & Zack, J. A. (1999). Generation of functional thymocytes in the human adult. *Immunity*, 10(5), 569-575.

Jenkinson, W. E., Bacon, A., White, A. J., Anderson, G., & Jenkinson, E. J. (2008). An epithelial progenitor pool regulates thymus growth. *J Immunol*, 181(9), 6101-6108.

Jenkinson, W. E., Rossi, S. W., Parnell, S. M., Agace, W. W., Takahama, Y., Jenkinson, E. J., & Anderson, G. (2007). Chemokine receptor expression defines heterogeneity in the earliest thymic migrants. *Eur J Immunol*, 37(8), 2090-2096.

Jimenez-Finkel, B. E., & Murphy, J. W. (1988). Characterization of efferent T suppressor cells induced by *Paracoccidioides brasiliensis*-specific afferent T suppressor cells. *Infect Immun*, 56(4), 744-750.

Jimenez-Finkel, B. E., & Murphy, J. W. (1988). Induction of antigen-specific T suppressor cells by soluble *Paracoccidioides brasiliensis* antigen. *Infect Immun*, 56(4), 734-743.

Kierszenbaum, F. (1999). Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin Microbiol Rev*, 12(2), 210-223.

Lagrotta-Candido, J. M., Villa-Verde, D. M., Vanderlei, F. H., Jr., & Savino, W. (1996). Extracellular matrix components of the mouse thymus microenvironment.

V. Interferon-gamma modulates thymic epithelial cell/thymocyte interactions via extracellular matrix ligands and receptors. *Cell Immunol*, 170(2), 235-244.

Lannes-Vieira, J., Chammas, R., Villa-Verde, D. M., Vannier-dos-Santos, M. A., Mello-Coelho, V., de Souza, S. J., Brentani, R. R., & Savino, W. (1993). Extracellular matrix components of the mouse thymic microenvironment. III. Thymic epithelial cells express the VLA6 complex that is involved in laminin-mediated interactions with thymocytes. *Int Immunol*, 5(11), 1421-1430.

Lannes-Vieira, J., Dardenne, M., & Savino, W. (1991). Extracellular matrix components of the mouse thymus microenvironment: ontogenetic studies and modulation by glucocorticoid hormones. *J Histochem Cytochem*, 39(11), 1539-1546.

Le, P. T., Lazorick, S., Whichard, L. P., Yang, Y. C., Clark, S. C., Haynes, B. F., & Singer, K. H. (1990). Human thymic epithelial cells produce IL-6, granulocyte-monocyte-CSF, and leukemia inhibitory factor. *J Immunol*, 145(10), 3310-3315.

Le, P. T., Tuck, D. T., Dinarello, C. A., Haynes, B. F., & Singer, K. H. (1987). Human thymic epithelial cells produce interleukin 1. *J Immunol*, 138(8), 2520-2526.

Legrand, N., Dontje, W., van Lent, A. U., Spits, H., & Blom, B. (2007). Human thymus regeneration and T cell reconstitution. *Semin Immunol*, 19(5), 280-288.

Lenzi, H. L., Calich, V. L., Miyaji, M., Sano, A., Nishimura, K., & Burger, E. (1994). Fibrosis patterns of lesions developed by athymic and euthymic mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Braz J Med Biol Res*, 27(9), 2301-2308.

Lind, E. F., Prockop, S. E., Porritt, H. E., & Petrie, H. T. (2001). Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med*, 194(2), 127-134.

Lum, L. G. (1987). The kinetics of immune reconstitution after human marrow transplantation. *Blood*, 69(2), 369-380.

Lum, L. G. (1987). The kinetics of immune reconstitution after human marrow transplantation. *Blood*, 69(2), 369-380.

Mackall, C. L., Fleisher, T. A., Brown, M. R., Andrich, M. P., Chen, C. C., Feuerstein, I. M., Horowitz, M. E., Magrath, I. T., Shad, A. T., Steinberg, S. M., & et al. (1995). Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *N Engl J Med*, 332(3), 143-149.

Magner, W. J., Chang, A. C., Owens, J., Hong, M. J., Brooks, A., & Coligan, J. E. (2000). Aberrant development of thymocytes in mice lacking laminin-2. *Dev Immunol*, 7(2-4), 179-193.

Mendes-da-Cruz, D. A., de Meis, J., Cotta-de-Almeida, V., & Savino, W. (2003). Experimental *Trypanosoma cruzi* infection alters the shaping of the central and peripheral T-cell repertoire. *Microbes Infect*, 5(10), 825-832.

Mendes-da-Cruz, D. A., Silva, J. S., Cotta-de-Almeida, V., & Savino, W. (2006). Altered thymocyte migration during experimental acute *Trypanosoma cruzi* infection: combined role of fibronectin and the chemokines CXCL12 and CCL4. *Eur J Immunol*, 36(6), 1486-1493.

Mendes-da-Cruz, D. A., Smaniotto, S., Keller, A. C., Dardenne, M., & Savino, W. (2008). Multivectorial abnormal cell migration in the NOD mouse thymus. *J Immunol*, 180(7), 4639-4647.

Miller, J. H., & Warrell, D. A. (1994). Imported falciparum malaria. *Bmj*, 309(6963), 1233-1234.

Mojcik, C. F., Salomon, D. R., Chang, A. C., & Shevach, E. M. (1995). Differential expression of integrins on human thymocyte subpopulations. *Blood*, 86(11), 4206-4217.

Moore, N. C., Anderson, G., Smith, C. A., Owen, J. J., & Jenkinson, E. J. (1993). Analysis of cytokine gene expression in subpopulations of freshly isolated

thymocytes and thymic stromal cells using semiquantitative polymerase chain reaction. *Eur J Immunol*, 23(4), 922-927.

Mucci, J., Hidalgo, A., Mocetti, E., Argibay, P. F., Leguizamon, M. S., & Campetella, O. (2002). Thymocyte depletion in *Trypanosoma cruzi* infection is mediated by trans-sialidase-induced apoptosis on nurse cells complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(6), 3896-3901.

Muller, L. M., Gorter, K. J., Hak, E., Goudzwaard, W. L., Schellevis, F. G., Hoepelman, A. I., & Rutten, G. E. (2005). Increased risk of common infections in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Clin Infect Dis*, 41(3), 281-288.

Murphy, P. M. (1994). The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol*, 12, 593-633.

Nishino, M., Ashiku, S. K., Kocher, O. N., Thurer, R. L., Boisselle, P. M., & Hatabu, H. (2006). The thymus: a comprehensive review. *Radiographics*, 26(2), 335-348.

Ocampo, J. S., de Brito, J. M., Correa-de-Santana, E., Borojevic, R., Villa-Verde, D. M., & Savino, W. (2008). Laminin-211 controls thymocyte--thymic epithelial cell interactions. *Cell Immunol*, 254(1), 1-9.

Overbergh, L., Giulietti, A., Valckx, D., Decallonne, R., Bouillon, R., & Mathieu, C. (2003). The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J Biomol Tech*, 14(1), 33-43.

Overstreet, M. G., Cockburn, I. A., Chen, Y. C., & Zavala, F. (2008). Protective CD8 T cells against *Plasmodium* liver stages: immunobiology of an 'unnatural' immune response. *Immunol Rev*, 225, 272-283.

Pelletier, A. J., van der Laan, L. J., Hildbrand, P., Siani, M. A., Thompson, D. A., Dawson, P. E., Torbett, B. E., & Salomon, D. R. (2000). Presentation of chemokine SDF-1 alpha by fibronectin mediates directed migration of T cells. *Blood*, 96(8), 2682-2690.

Pereira, R. M., Tresoldi, A. T., da Silva, M. T., & Bucarechi, F. (2004). Fatal disseminated paracoccidioidomycosis in a two-year-old child. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 46(1), 37-39.

Petrie, H. T., Scollay, R., & Shortman, K. (1992). Commitment to the T cell receptor-alpha beta or -gamma delta lineages can occur just prior to the onset of CD4 and CD8 expression among immature thymocytes. *Eur J Immunol*, 22(8), 2185-2188.

Petrie, H. T., & Zuniga-Pflucker, J. C. (2007). Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu Rev Immunol*, 25, 649-679.

Pezzano, M., Samms, M., Martinez, M., & Guyden, J. (2001). Questionable thymic nurse cell. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65(3), 390-403, table of contents.

Plotkin, J., Prockop, S. E., Lepique, A., & Petrie, H. T. (2003). Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus. *J Immunol*, 171(9), 4521-4527.

Poznansky, M. C., Olszak, I. T., Evans, R. H., Wang, Z., Foxall, R. B., Olson, D. P., Weibrecht, K., Luster, A. D., & Scadden, D. T. (2002). Thymocyte emigration is mediated by active movement away from stroma-derived factors. *J Clin Invest*, 109(8), 1101-1110.

Pratley, R. E. (2002). The quality of fat in the diet and its impact on insulin sensitivity. *Curr Diab Rep*, 2(1), 69-70.

Prockop, S. E., Palencia, S., Ryan, C. M., Gordon, K., Gray, D., & Petrie, H. T. (2002). Stromal cells provide the matrix for migration of early lymphoid progenitors through the thymic cortex. *J Immunol*, 169(8), 4354-4361.

Rezzani, R., Bonomini, F., & Rodella, L. F. (2008). Histochemical and molecular overview of the thymus as site for T-cells development. *Prog Histochem Cytochem*, 43(2), 73-120.

Salomon, D. R., Crisa, L., Mojcik, C. F., Ishii, J. K., Klier, G., & Shevach, E. M. (1997). Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed by cortical thymic epithelial cells and mediates thymocyte adhesion. Implications for the function of alpha4beta1 (VLA4) integrin in T-cell development. *Blood*, 89(7), 2461-2471.

Sasaki, T., Fassler, R., & Hohenester, E. (2004). Laminin: the crux of basement membrane assembly. *J Cell Biol*, 164(7), 959-963.

Savino, W. (2006). The thymus is a common target organ in infectious diseases. *PLoS Pathog*, 2(6), e62.

Savino, W., Boitard, C., Bach, J. F., & Dardenne, M. (1991). Studies on the thymus in nonobese diabetic mouse. I. Changes in the microenvironmental compartments. *Lab Invest*, 64(3), 405-417.

Savino, W., Dalmau, S. R., & Dealmeida, V. C. (2000). Role of extracellular matrix-mediated interactions in thymocyte migration. *Dev Immunol*, 7(2-4), 279-291.

Savino, W., Dardenne, M., Marche, C., Trophilme, D., Dupuy, J. M., Pekovic, D., Lapointe, N., & Bach, J. F. (1986). Thymic epithelium in AIDS. An immunohistologic study. *Am J Pathol*, 122(2), 302-307.

Savino, W., Dardenne, M., Velloso, L. A., & Dayse Silva-Barbosa, S. (2007). The thymus is a common target in malnutrition and infection. *Br J Nutr*, 98 Suppl 1, S11-16.

Savino, W., Leite-de-Moraes, M. C., Hontebeyrie-Joskowicz, M., & Dardenne, M. (1989). Studies on the thymus in Chagas' disease. I. Changes in the thymic microenvironment in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Immunol*, 19(9), 1727-1733.

Savino, W., Mendes-da-Cruz, D. A., Silva, J. S., Dardenne, M., & Cotta-de-Almeida, V. (2002). Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? *Trends Immunol*, 23(6), 305-313.

Savino, W., Mendes-Da-Cruz, D. A., Smaniotto, S., Silva-Monteiro, E., & Villa-Verde, D. M. (2004). Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *J Leukoc Biol*, 75(6), 951-961.

Schofield, L., & Grau, G. E. (2005). Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol*, 5(9), 722-735.

Seixas, E., & Ostler, D. (2005). *Plasmodium chabaudi chabaudi* (AS): differential cellular responses to infection in resistant and susceptible mice. *Exp Parasitol*, 110(4), 394-405.

Sempowski, G. D., Hale, L. P., Sundy, J. S., Massey, J. M., Koup, R. A., Douek, D. C., Patel, D. D., & Haynes, B. F. (2000). Leukemia inhibitory factor, oncostatin M, IL-6, and stem cell factor mRNA expression in human thymus increases with age and is associated with thymic atrophy. *J Immunol*, 164(4), 2180-2187.

Shiraishi, J., Utsuyama, M., Seki, S., Akamatsu, H., Sunamori, M., Kasai, M., & Hirokawa, K. (2003). Essential microenvironment for thymopoiesis is preserved in human adult and aged thymus. *Clin Dev Immunol*, 10(1), 53-59.

Shortman, K., Egerton, M., Spangrude, G. J., & Scollay, R. (1990). The generation and fate of thymocytes. *Semin Immunol*, 2(1), 3-12.

Silva-Monteiro, E., Reis Lorenzato, L., Kenji Nihei, O., Junqueira, M., Rabinovich, G. A., Hsu, D. K., Liu, F. T., Savino, W., Chammas, R., & Villa-Verde, D. M. (2007). Altered expression of galectin-3 induces cortical thymocyte depletion and premature exit of immature thymocytes during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol*, 170(2), 546-556.

Singer-Vermes, L. M., Caldeira, C. B., Burger, E., & Calich, L. G. (1993). Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. *Clin Exp Immunol*, 94(1), 75-79.

Sivitz, W. I., Walsh, S., Morgan, D., Donohoue, P., Haynes, W., & Leibel, R. L. (1998). Plasma leptin in diabetic and insulin-treated diabetic and normal rats. *Metabolism*, 47(5), 584-591.

Smaniotto, S., de Mello-Coelho, V., Villa-Verde, D. M., Pleau, J. M., Postel-Vinay, M. C., Dardenne, M., & Savino, W. (2005). Growth hormone modulates thymocyte development in vivo through a combined action of laminin and CXC chemokine ligand 12. *Endocrinology*, 146(7), 3005-3017.

Sotomayor, C. E., Rubinstein, H. R., Cervi, L., Riera, C. M., & Masih, D. T. (1989). Immunosuppression in experimental cryptococcosis in rats. Induction of thymic suppressor cells. *Mycopathologia*, 108(1), 5-10.

Souto, P. C., Brito, V. N., Gameiro, J., da Cruz-Hofling, M. A., & Verinaud, L. (2003). Programmed cell death in thymus during experimental paracoccidioidomycosis. *Med Microbiol Immunol*, 192(4), 225-229.

Steinmann, G. G., Klaus, B., & Muller-Hermelink, H. K. (1985). The involution of the ageing human thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study. *Scand J Immunol*, 22(5), 563-575.

Steinmann, G. G., & Muller-Hermelink, H. K. (1985). [Age-related changes in the thymus-dependent immune system]. *Dtsch Med Wochenschr*, 110(34), 1300-1307.

St-Pierre, Y., Hugo, P., Legault, D., Tremblay, P., & Potworowski, E. F. (1996). Modulation of integrin-mediated intercellular adhesion during the interaction of thymocytes with stromal cells expressing VLA-4 and LFA-1 ligands. *Eur J Immunol*, 26(9), 2050-2055.

Suster S; Rosai J. (1997) Thymus In: *Histology for Pathologists* (Sternberg SS,ed).Pp 687-706. Lippincott –Raven Publishers: Philadelphia.

Suzuki, G., Sawa, H., Kobayashi, Y., Nakata, Y., Nakagawa, K., Uzawa, A., Sakiyama, H., Kakinuma, S., Iwabuchi, K., & Nagashima, K. (1999). Pertussis

toxin-sensitive signal controls the trafficking of thymocytes across the corticomedullary junction in the thymus. *J Immunol*, 162(10), 5981-5985.

Svensson, M., Marsal, J., Uronen-Hansson, H., Cheng, M., Jenkinson, W., Cilio, C., Jacobsen, S. E., Sitnicka, E., Anderson, G., & Agace, W. W. (2008). Involvement of CCR9 at multiple stages of adult T lymphopoiesis. *J Leukoc Biol*, 83(1), 156-164.

Szkudelski, T. (2001). The mechanism of Alloxan and Streptozotocin in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50, 536-546.

Tabata, T., Okuno, Y., Fujii, S., Kimura, S., & Kinoshita, Y. (1984). Maturation impairment of thymic lymphocytes in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Cell Immunol*, 89(1), 250-258.

Takahama, Y. (2006). Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol*, 6(2), 127-135.

Teixeira, H. C., Calich, V. L., Singer-Vermes, L. M., D'Imperio-Lima, M. R., & Russo, M. (1987). Experimental paracoccidioidomycosis: early immunosuppression occurs in susceptible mice after infection with pathogenic fungi. *Braz J Med Biol Res*, 20(5), 587-589.

Thomas, J. A., Sloane, J. P., Imrie, S. F., Ritter, M. A., Schuurman, H. J., & Huber, J. (1986). Immunohistology of the thymus in bone marrow transplant recipients. *Am J Pathol*, 122(3), 531-540.

Tsuji, M., & Zavala, F. (2003). T cells as mediators of protective immunity against liver stages of *Plasmodium*. *Trends Parasitol*, 19(2), 88-93.

Uehara, S., Grinberg, A., Farber, J. M., & Love, P. E. (2002). A role for CCR9 in T lymphocyte development and migration. *J Immunol*, 168(6), 2811-2819.

Urban, B. C., Ing, R., & Stevenson, M. M. (2005). Early interactions between blood-stage plasmodium parasites and the immune system. *Curr Top Microbiol Immunol*, 297, 25-70.

Verinaud, L., Da Cruz-Hofling, M. A., Sakurada, J. K., Rangel, H. A., Vassallo, J., Wakelin, D., Sewell, H. F., & Camargo, I. J. (1998). Immunodepression induced by *Trypanosoma cruzi* and mouse hepatitis virus type 3 is associated with thymus apoptosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 5(2), 186-191.

von Boehmer, H., & Fehling, H. J. (1997). Structure and function of the pre-T cell receptor. *Annu Rev Immunol*, 15, 433-452.

Wallis, V. J., Leuchars, E., Chwalinski, S., & Davies, A. J. (1975). On the sparse seeding of bone marrow and thymus in radiation chimaeras. *Transplantation*, 19(1), 2-11.

Watson, S. R., Redington, T. J., Miller, T. B., & Bullock, W. E. (1984). Flow microfluorometry analysis of alterations in T-lymphocyte subsets during murine listeriosis. *Infect Immun*, 45(2), 372-377.

Wellhausen, S. R., & Boros, D. L. (1982). Atrophy of the thymic cortex in mice with granulomatous schistosomiasis mansoni. *Infect Immun*, 35(3), 1063-1069.

Wolf, S. S., & Cohen, A. (1992). Expression of cytokines and their receptors by human thymocytes and thymic stromal cells. *Immunology*, 77(3), 362-368.

Wurbel, M. A., Malissen, M., Guy-Grand, D., Meffre, E., Nussenzweig, M. C., Richelme, M., Carrier, A., & Malissen, B. (2001). Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T- and B-cell development and a reduction in T-cell receptor gamma delta(+) gut intraepithelial lymphocytes. *Blood*, 98(9), 2626-2632.

Yarilin, A. A., & Belyakov, I. M. (2004). Cytokines in the thymus: production and biological effects. *Curr Med Chem*, 11(4), 447-464.

Youn, B. S., Yu, K. Y., Oh, J., Lee, J., Lee, T. H., & Broxmeyer, H. E. (2002). Role of the CC chemokine receptor 9/TECK interaction in apoptosis. *Apoptosis*, 7(3), 271-276.

Zuniga-Pflucker, J. C., & Ciofani, M. (2006). Pre-T cell receptor's clashing signals: "should I stay or should I go". *Immunity*, 24(6), 669-670.

Anexos

Artigo 1



Rapid Communication

Thymic alterations in *Plasmodium berghei*-infected miceC.F. Andrade ^{a,1}, J. Gameiro ^{a,1}, P.R.A. Nagib ^{a,1}, B.O. Carvalho ^b, R.L. Talaisys ^b, F.T.M. Costa ^b, L. Verinaud ^{a,*}^a Department of Microbiology and Immunology, Biology Institute, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil^b Department of Parasitology, Biology Institute, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 April 2008

Accepted 4 June 2008

Available online 16 July 2008

Keywords:

Plasmodium berghei

Thymus

Thymic atrophy

T-cell generation

ABSTRACT

The primary function of the thymus is to develop immature T-cells into cells that further in the periphery will be able to carry out immune functions. The Literature has shown that thymus can be a target for many pathogens and severe structural alterations take place in this organ during infectious diseases. Here, we investigated if thymus is also a target organ during experimental malaria infection by analyzing the presence of parasites inside the organ and histological alterations in thymuses from *Plasmodium berghei* NK65-infected BALB/c. After 14 days of infection, parasites were found inside the thymus that presented a profound atrophy with total loss of its architecture. We propose that the presence of parasites in the thymus induces histological modifications that alter the microenvironment, impairing by consequence the successful T cell development. Additional studies are currently being developed in our laboratory to verify if such thymic alterations can influence the systemic immune response to the parasite.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The complex molecular structure of *Plasmodium* sp., the etiological agent of malaria, stimulates multifaceted immune responses, including antibodies, NK and NKT cells, CD4⁺ and CD8⁺ T cells [1]. However, the precise mechanisms responsible for host protective immunity against the parasite have not been fully elucidated. Some experimental models have demonstrated that T cells play a major role in protection against *Plasmodium*. According to the literature, CD4⁺ T cells stimulate CD8⁺ T cell cytotoxic activity, inhibiting the development of liver stages and preventing the infection of red blood cells [2,3]. In a murine model of *Plasmodium berghei* NK 65 infection, the initial innate response to the intraerythrocytic stages of malaria parasites engages CD4⁺ Th₁ cells illustrated by detection of serum IgG and IFN γ producing CD4⁺ T cells [4].

Mature T cells are generated from marrow-derived T lymphocyte precursors that differentiate and mature in the thymus through a complex process characterized by lymphocyte (or thymocytes while in the thymus) migration throughout the thymic microenvironment. Alongside the thymocytes, at different stages of maturation, the thymic microenvironment is formed by epithelial cells, which form a meshwork to provide mechanical support

and stimuli for the proliferation and development of thymocytes and by macrophages, dendritic cells, fibroblasts and matrix molecules that provide mechanical support and molecular stimuli for complete T cell development [5,6].

It has been demonstrated that several pathogens, such as *Trypanosoma cruzi* [7,8], Human Immunodeficiency Virus [9,10] and *Paracoccidioides brasiliensis* [11,12], are able to invade the thymus causing severe atrophy and deep disorganization of thymic architecture [13]. Recently, Seixas et al. (2005) [14] have also observed thymic alterations in mice treated with non-lethal malaria model of *Plasmodium chabaudi*. In this paper, we reported thymic atrophy and histological alterations by using lethal murine malaria model of *P. berghei*. Besides, we demonstrate for the first time the presence of parasites inside thymus. We conjecture that such events may influence the process of intrathymic T cell differentiation impairing the normal development of T cells and, most probably, the peripheral immune response to the parasite.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Specific pathogen-free BALB/c male mice, 5-week-old, were purchased from CEMIB/UNICAMP (Campinas, São Paulo, Brazil) and housed in microisolator cages with free access to water and food. All protocols were performed in accordance with the guidelines of the State University of Campinas Committee on the Use and Care of Animals.

* Corresponding author. Address: Departamento de Microbiologia e Imunologia-UNICAMP, Cidade Universitária Zeferino, Vaz s/n., CEP: 13084-970 Campinas-São Paulo, Brazil.

E-mail address: verinaud@unicamp.br (L. Verinaud).

¹ These authors contributed equally to this work.

2.2. Infection of mice

Nine groups of five animals each were intraperitoneally infected with 5×10^6 parasitized red blood cells obtained from a source mouse or with saline (control group). Parasitemia was assessed daily by counting the number of infected erythrocytes in Giemsa-stained thin blood films. At days 3, 7 and 14 following infection, three groups of mice were sacrificed and their thymuses collected and analyzed by histological methods, Polymerase Chain Reaction (PCR) and Transmission Electron Microscopy (TEM).

2.3. Thymic index

The gross weight of each mouse was recorded on 3, 7 and 14 days of infection. The mice were then sacrificed and the thymus glands were collected and weighed. The thymic index was calculated as: organ weight (g)/body weight (g) \times 100.

2.4. Histological analysis

For microscopic histological evaluation, thymuses were collected and fixed in a solution 2% paraformaldehyde for 12 h at room temperature. The specimens were submitted to diafanization with xylene, dehydrated by graded ethanol, embedded in paraffin and cut in 5- μ m-thick sections. Histologic changes were evaluated on sections stained with hematoxylin and eosin (H&E).

2.5. Polymerase chain reaction

Detection of parasites inside thymus was assessed by PCR method. Briefly, thymuses were perfused with ACK via the heart to prevent erythrocyte contamination and teased apart in 1 ml of digestion buffer with proteinase K for DNA extraction. DNA was purified by phenol/chloroform and precipitated in 100% ethanol and sodium acetate and then washed in 70% ethanol and resuspended in water. The control of PCR amplification was performed using oligonucleotides based on the sequence of the mouse β -actin gene (sense: BA1 5'-ATGGATGACGATATCGCT-3' and the anti-sense: BA2 5'-ATGAGGTAGTCTGTCTCAGGT-3'). For PCR reaction based on the malaria ribosomal RNA gene, the following oligonucleotides were utilized as template: sense rPLU3 5'-TTTTTATAAGGATACGGAAAAGCTGT-3' and anti-sense rPLU4 5'-TACCCGTCATAGCCATGTTAGGCCAATACC-3' [15]. DNA amplification was made by technique of thermal denaturation with one cycle of 5 min at 94 °C, followed by 45 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min 30 s at 63 °C and 1 min 30 s at 72 °C. PCR products were analyzed in a 2% agarose gel.

2.6. Transmission electron microscopy

For TEM studies, animals were perfused via the heart with ACK and fixative solution containing glutaraldehyde and paraformaldehyde. Then, thymuses were collected, fixed by the same fixative solution, post fixed in 1% osmium tetroxide and embedded in resin (Epon 812). Ultrathin sections were double stained in uranyl acetate and lead citrate and examined in a LEO 906 transmission electron microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) operated at 60 kV.

2.7. Cytofluorometry

Thymuses were removed from infected (14 days of infection) and control animals. They were minced, washed and resuspended in PBS–FBS 5% for subsequent cellularity evaluation, which was followed by triple immunofluorescence staining. Appropriate dilutions of the following fluorochrome-labeled monoclonal antibodies

(mAbs) were used: FITC/anti-CD4 (clone GK1.5), Alexa Fluor 647/anti-CD8 (clone 53–6.7) and PeCy-7/anti-CD3 (clone 145-2C11). These reagents were purchased from Pharmingen/Becton–Dickinson (South San Francisco, CA, USA). Fluorochrome-labeled isotype-matched negative controls for the specific mAbs were also Pharmingen products. Cells were staining for 20 min and then washed with PBS, fixed and analyzed by flow cytometry in a FACSAria® device (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) equipped with Diva software. Analyses were done after recording 10,000 events for each sample using FCS Express V3 software. Lymphocytes were gated based on forward and side scatter parameters, so as to avoid larger leukocytes such as macrophages and granulocytes.

2.8. Statistical analysis

Statistical evaluation of the results between control and infected mice was carried out by unpaired *t* test (GraphPad Prism 4.0 software). Results are presented as mean \pm SE and *p* values equal or lower than 0.05 were considered significant.

3. Results

All mice infected with lethal murine malaria *P. berghei* NK65 developed high levels of parasitemia, which peaked on day 14 after parasite inoculation and 100% mortality until 15 days after infection (data not shown).

Severe thymic atrophy, with pronounced fall of thymus weight, was observed from 7 days of infection. This atrophy was progressive and reached its maximum value at 14 days post-infection, coinciding with the parasitemia peak. Before 3 days of infection, no thymic alterations could be detected (Fig. 1).

Atrophy was accompanied by histological alterations in thymus architecture with total loss of cortical-medullar delimitation at 14 days post-infection when compared to the control mice and/or to the infected mice on day 3 after infection (Fig. 2A–C). Furthermore, changes in the histological pattern of thymus were detected at 14 days after infection when higher atrophy levels were detected.

In order to investigate if histological alterations were associated with the presence of parasites inside the thymus, we have proceeded with transmission electron microscopy and PCR methods. Analysis of thymus by TEM has suggested the presence of parasites

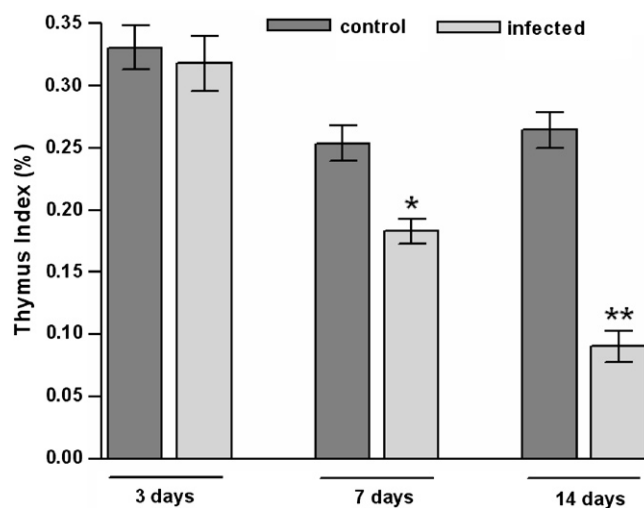


Fig. 1. Changes in thymus weight in *Plasmodium berghei*-infected BALB/c mice. Significant differences between control and infected mice were only observed on days 7 and 14 p.i., although such differences were more prominent at day 14 after infection. Asterisks indicate a statistically significant difference at **p* < 0.05 and ***p* < 0.001. Results are representative of three similar experiments.

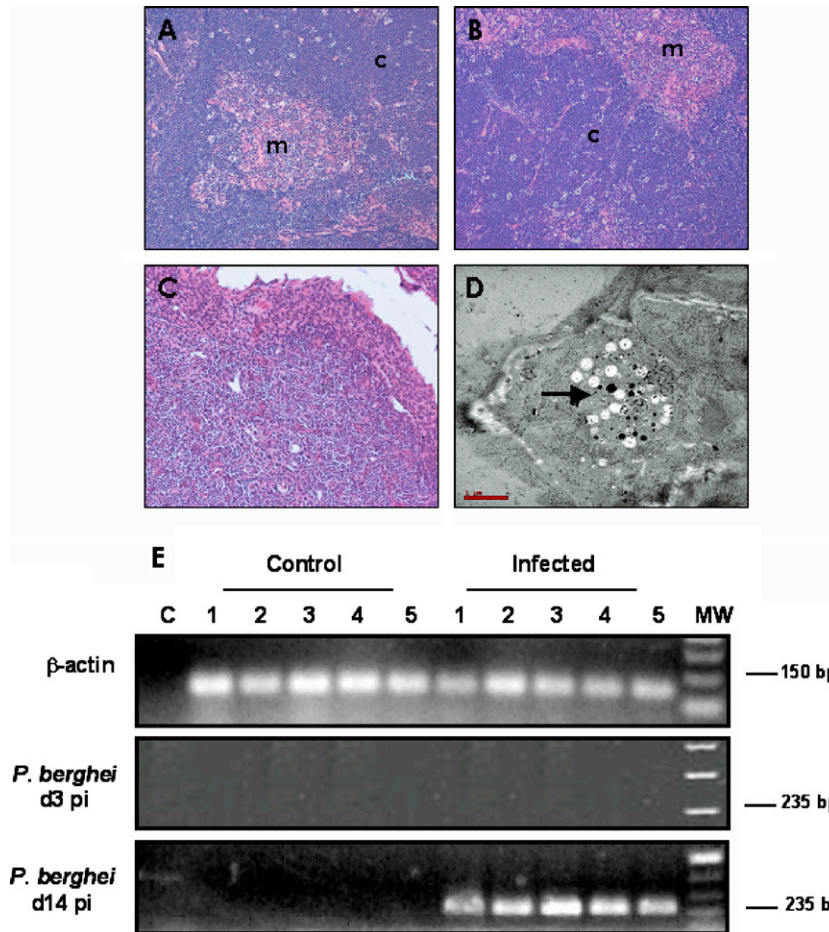


Fig. 2. (A–C) Histopathological analysis. Thymus from control mice and infected mice at 3 days post-infection showing preserved delimitation between cortical (c) and medullary zones (m) (A and B). Thymus from *Plasmodium berghei*-infected mice presenting total loss of cortical-medullary delimitation after 14 days p.i. (C). (D) Transmission Electron Microscopy. Thymus from *Plasmodium berghei*-infected mice showing evidences for the presence of haemozoin pigments (arrow) inside macrophage on day 14 p.i. (E) DNA amplification by Polymerase-Chain Reaction. No specific PCR products were detected in control mice or infected mice on day 3 after infection. Specific PCR products were detected at 14 days of infection in thymus from *Plasmodium berghei*-infected mice. All results are representative of three similar experiments.

in the organ based on the observation of *Plasmodium* hemozoin inside thymic macrophages (Fig. 2D). Amplification of *Plasmodium* parasite DNA fragments in thymus from experimental mice has confirmed this hypothesis. No specific PCR products could be detected in the thymus of control mice or infected mice at 3 days of infection. On the other hand, specific PCR products were only detected in thymus from *P. berghei*-infected animals on day 7 (data not shown) and at 14 days post-infection (Fig. 2E).

Next, cytofluorometry analysis of CD4 and CD8 expression on thymocytes was conducted. As expected, thymocytes from uninfected mice were mostly immature and cortical CD4⁺CD8⁺ cells. Around the day of peak parasitemia, infected mice showed low numbers of double negative (CD4⁻CD8⁻), double positive (CD4⁺CD8⁺) and single positive cell subsets (CD4⁺CD8⁻; CD4⁻CD8⁺). Somewhat impressing, immature CD4⁺CD8⁺ thymocyte subpopulation decreased sharply (about 50 times) in infected mice when compared to the control ones. Representative results obtained with thymic cells from control and infected mice are depicted in Fig. 3.

4. Discussion

Thymus is the central lymphoid organ that plays an important role in cellular immunity by generating circulating T lymphocytes. Although its function declines with age, the thymus remains indispensable to T-cell-repertoire reconstitution, which ensures immune reactions in various situations until late adulthood [16,17]. The

T-cell development process in the thymus requires a complex structural organization formed by non-lymphoid cells and elements of extracellular matrix that provide a favorable microenvironment to interactions that are essential for the evolution of lymphocytes in different stages of maturation [18,19]. Thus, it is reasonable to suppose that insults to this organ can threaten its function since T-cell generation depends on the structural maintenance of its compartments, i.e., cortex, sub capsular cortex zone, cortico-medullary junction and thymic medulla.

It has long been known that the thymus is vulnerable to several infectious diseases [7–13]. Here, we demonstrated that murine malaria lethal strain *P. berghei* NK65 infection is also able to trigger severe thymic alterations. *Plasmodium berghei* NK65 infection in BALB/c mice induces high parasitemia and 100% lethality without the development of cerebral malaria [20]. Now, our results using this experimental model show a decrease in the total number of thymic cells observed from data of thymic index and total loss of delimitation among cortical and medullary zones. These findings suggest that the normal thymocytes maturation may be severely impaired given that the successful development of these cells into mature T cells depends on their ordered and constant migration through an organized thymic microenvironment. Similar results, i.e., thymic atrophy and histological disorganization with alteration of thymocyte migration, were already shown in experimental infections by *T. cruzi* [7,8] and *P. brasiliensis* [11,12]. The causes of thymic atrophy were not available here, however, accumulating

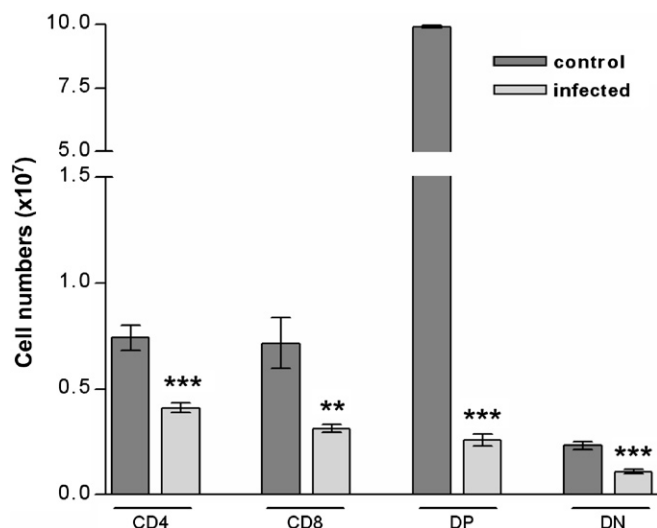


Fig. 3. Thymocytes subset variation in the thymus of control and *Plasmodium berghei*-infected mice. The figure shows absolute numbers of single-positive (CD4⁺CD8⁻ or CD4⁺CD8⁺) cells, double positive (DP/CD4⁺CD8⁺) and double negative (DN/CD4⁻CD8⁻) cells per group. Values expressed by mean \pm S.E.; $n = 10$ –12 animals per group, with infected animals being sacrificed on day 14 post-infection. *** $P < 0.001$ and ** $P < 0.0001$.

evidences from the literature have indicated that among them are apoptosis and precocious migration of immature thymocytes to the periphery [13]. Amplification of parasite-specific DNA in the peak of parasitemia (14th day post-infection) argues strongly in favor of the direct participation of *Plasmodium* in such thymic alterations, since it unequivocally demonstrates the presence of parasites inside the thymus. These data were obtained even when the organ was perfused with hypotonic solution to exclude the possibility of contamination by cytoadherence of parasitized erythrocytes to microvascular endothelium, a common phenomenon observed in mature stages of *Plasmodium*-parasitized erythrocytes. Moreover, thymic atrophy could not be observed in the beginning of infection (3rd day post-infection); it was only noted 7 days after infection coinciding with the time when parasites were detected inside the thymus. It is important to highlight that the sequence utilized as primer for detection of the *Plasmodium* DNA only amplifies the genetic material of viable parasites [15], reinforcing our hypothesis of direct participation of the pathogen in thymic alterations.

We have also observed changes in thymocyte subsets that, most probably, are related to the structural thymic alterations reported here after *Plasmodium* infection since maintenance of thymus microenvironment is essential for T cell maturation. It is reasonable to suppose that both the presence of parasites inside the thymus and the histological alterations, with a severe depletion of thymocyte absolute numbers mainly in very immature DP cells, lead to functional alterations in this primary lymphoid organ. Alterations in thymus compartment and thymocyte subpopulations with changes in the peripheral T cell repertoire were already reported during *T. cruzi* infection [8]. We believe that alterations in secondary lymphoid organs are also present in our infection model and new experiments are being conducted to investigate such possibility. In any way, results presented here showing that the thymus is a target during *P. berghei* NK65 infection strongly suggest an important role for the organ in the immune response to malaria.

To the best of our knowledge, data presented here show for the first time a correlation between the presence of malaria parasites inside the thymus and parasitism with significant atrophy

and histological alterations of this lymphoid organ. A fundamental question that remains open is whether such thymic insults during malaria infection are relevant for the peripheral immune response. We believe that future studies, from this and other laboratories, could elucidate the functional consequences of thymic alterations during *P. berghei* infection, opening up new possibilities for the understanding of immune response during malaria infections.

Acknowledgments

We thank Dr. Nobuko Yoshida from Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, UNIFESP, São Paulo, SP, Brazil who kindly provided *P. berghei* NK65 parasites. This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (#05/59774-9 & 04/03599-1) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- [1] M. Tsuji, F. Zavala, T cells as mediators of protective immunity against liver stages of *Plasmodium*, Trends Parasitol. 19 (2003) 88–93.
- [2] L. Schofield, G.E. Grau, Immunological processes in malaria pathogenesis, Nat. Rev. Immunol. 5 (2005) 722–734.
- [3] A. Morrot, F. Zavala, Regulation of the CD8⁺ T cell response against *Plasmodium* liver stages in mice, Int. J. Parasitol. 34 (2004) 1529–1534.
- [4] T.T.A. Long, S. Nakazawa, S. Onizuka, M.C. Huaman, H. Kanbara, Influence of CD4⁺ CD25⁺ T cells on *Plasmodium berghei* NK65 infection in BALB/c mice, Int. J. Parasitol. 33 (2003) 175–183.
- [5] S. Sustar, J. Rosai, Thymus, in: S.S. Sternberg (Ed.), Histology for Pathologists, Lippincott–Raven Publishers, Philadelphia, 1997, pp. 687–706.
- [6] B.D. Jamieson, D.C. Douek, S. Killian, L.E. Hultin, D.D. Scripture-Adams, J.V. Giorgi, D. Marelli, R.A. Koup, J.A. Zack, Generation of functional thymocytes in the human adult, Immunity 10 (1999) 569–575.
- [7] W. Savino, M.C. Leite-de Moraes, M. Hontebervie-Joskowicz, M. Dardenne, Studies on the thymus in Chagas' disease. I. Changes in the thymic microenvironment in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*, Eur. J. Immunol. 19 (1989) 1727–1733.
- [8] V. Cotta-de-Alemlida, A. Bonomo, D.A. Mendes-da-Cruz, I. Riederer, J. De Meis, K.R. Lima-Quaresma, A. Vieira-de-Abreu, D.M. Villa-Verde, W. Savino, *Trypanosoma cruzi* infection modulates intrathymic contents of extracellular matrix ligands and receptors and alters thymocyte migration, Eur. J. Immunol. 33 (2003) 2439–2448.
- [9] W. Savino, M. Dardenne, C. Marche, D. Trophimie, J.M. Dupuy, D. Pekovic, N. Lapointe, J.F. Bach, Thymic epithelium in AIDS. An immunohistologic study, Am. J. Pathol. 122 (1986) 302–307.
- [10] D.L. Sodor, J.M. Milush, F. Ware, A. Wozniakowski, L. Montgomery, H.M. McCullure, A.A. Lackner, M. Marthas, V. Hirsch, R.P. Johnson, D.C. Douek, R.A. Koup, Decreased levels of recent thymic emigrants in peripheral blood of simian immunodeficiency virus-infected macaques correlate with alterations within the thymus, J. Virol. 76 (2002) 9981–9990.
- [11] V.N. Brito, P.C.S. Souto, M.A. Cruz-Höfling, L.C. Ricci, L. Verinaud, Thymus invasion and atrophy induced by *Paracoccidioides brasiliensis* in BALB/c mice, Med. Mycol. 41 (2) (2003) 83–87.
- [12] P.C.S. Souto, V.N. Brito, J. Gameiro, M.A. da Cruz Höfling, L. Verinaud, Programmed cell death in thymus during experimental paracoccidioidomycosis, Med. Microbiol. Immunol. 192 (2003) 225–229.
- [13] W. Savino, The thymus is a common target organ in infectious diseases, PLoS Pathog. 6 (2006) 472–483.
- [14] E. Seixas, D. Ostler, *Plasmodium chabaudi chabaudi* (AS): differential cellular responses to infection in resistant and susceptible mice, Exp. Parasitol. 110 (2005) 394–405.
- [15] W. Jarra, G. Snounou, Only viable parasites are detected by PCR following clearance of rodent malarial infections by drug treatment or immune responses, Infect. Immun. 66 (1998) 3783–3787.
- [16] R. Hong, The thymus: finally getting some respect, Chest. Surg. Clin. N. Am. 11 (2001) 295–310.
- [17] A. Shanker, Is thymus redundant after adulthood?, Immunol. Lett. 91 (2004) 79–86.
- [18] M. Ciofani, J.C. Zúñiga-Pflücker, The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis, Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 23 (2007) 463–493.
- [19] H.T. Petrie, J.C. Zúñiga-Pflücker, Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus, Annu. Rev. Immunol. 25 (2007) 649–679.
- [20] S. Nakazawa, *Plasmodium berghei* NK65: studies on the effect of treatment duration and inoculum size on recrudescence, Exp. Parasitol. 111 (1) (2005) 59–63.

Artigo 2

Changes in Cell Migration-Related Molecules Expressed by Thymic
Microenvironment during Experimental *Plasmodium berghei* Infection:
Consequences on Thymocyte Development.

Jacy Gameiro¹, Patrícia R A Nagib¹, Carolina F Andrade¹, Déa MS Villa-Verde², Suse Dayse Silva-Barbosa², Wilson Savino², Fabio TM Costa³ & Liana Verinaud^{1*}.

¹Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biology, State University of Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil.

²Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

³Department of Parasitology, Institute of Biology, State University of Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil.

J.G. & P.R.A.N contributed equally to this work.

* Corresponding author.

Mailing address: Departamento de Microbiologia e Imunologia – UNICAMP. Cidade Universitária Zeferino Vaz s/n. CEP: 13084-970. Campinas – São Paulo – Brasil.

E-mail: verinaud@unicamp.br

ABSTRACT

Background: We previously showed alterations in the thymus during experimental infection with *Plasmodium berghei*, the causative agent of Malaria. Such alterations were characterized by histological changes, with loss of cortical-medullary delimitation, and the intrathymic presence of parasites. As the combination of chemokines, adhesion molecules and extracellular matrix (ECM) is critical to the appropriate thymocyte development and migration, we analyzed the thymic expression of selected chemokines CXCL12 and CCL25 and their respective receptors (CXCR4 and CCR9) as well as the expression of extracellular matrix ligands (fibronectin and laminin) and corresponding integrin-type receptors.

Methodology/Principal Findings: Increased expression of ECM components was observed in thymus from infected mice when compared to controls. In contrast, down-regulated surface expression of the fibronectin receptors VLA4 and VLA5, and the laminin receptor VLA6 was observed in thymocytes from infected animals. Differently, we found in the thymus from infected mice an increased expression of CXCL12 and CXCR4, and a decreased expression of CCL25 and CCR9. An altered thymocyte migration towards ECM elements and chemokines (alone or in combination) was seen when the thymus from infected mice were analyzed. Evaluation of *ex vivo* migration patterns of CD4/CD8-defined thymocyte subpopulations revealed that double-negative (DN), and CD4⁺ and CD8⁺ single-positive (SP) cells from *P. berghei*-infected mice have higher migratory activity as compared to controls. Interestingly, increased numbers of DN, and SP (CD4⁺ and CD8⁺) subpopulations were found in the spleen of infected mice.

Conclusions/Significance: Overall, we show herein that the thymic atrophy observed in *P. berghei*-infected mice is accompanied by thymic microenvironmental changes that comprise altered expression of thymocyte migration-related molecules of the ECM and chemokine protein families, which in turn, can alter the thymocyte migration pattern. These thymic

disturbances compartment may have consequences on the control of the immune response against this protozoan.

INTRODUCTION

The Immune response during malaria is highly complex, and this is partially due to the intricate molecular structure of *Plasmodium* sp., the etiological agent of the disease. This protozoan stimulates multifaceted immune responses, including antibodies, NK and NKT cells, CD4⁺ and CD8⁺ T cells [1, 2]. The immune response to the intraerythrocytic stages of the parasite has been better characterized by the use of murine experimental models. In this stage the CD4⁺ Th1 response is essential for the development of the next events of the immune response in experimental malaria [3, 4].

We and others previously reported that the thymus gland is also a target organ in *Plasmodium* infection: there is atrophy with depletion of CD4⁺CD8⁺ double-positive (DP) thymocytes, and histological alterations with loss of delimitation between cortical and medullar regions. Moreover, we detected the intrathymic presence of parasites [5].

The thymus is a primary lymphoid organ, responsible for the differentiation of T lymphocytes, including the shaping of an appropriate T cell repertoire. This process is essentially controlled by cells and molecules of the thymic microenvironment, a tridimensional network essentially formed epithelial cells, together with small numbers of dendritic cells, macrophages and fibroblasts [6, 7]. Accordingly, it is conceivable that pathological changes of the thymic microenvironment, including those induced by infectious agents [8], may result in a disruption of the normal intrathymic T cell development, which may lead (among other changes) to an altered exportation of T cell to the periphery, as shown in experimental Chagas disease [9].

Thymocyte migration seems to be controlled by combined effects of a series of molecular interactions, including those mediated by extracellular matrix proteins, as well as by chemokines; all being produced/secreted by thymic microenvironmental cells [9, 10]. For example the chemokines CXCL12 and CCL25 are relevant for inducing migration of developing thymocytes, an effect that is mediated by the CXCR4 and CCR9 receptors respectively [11]. The ECM ligands fibronectin and laminin, are also very important for migration of developing thymocytes, through the interaction with specific integrin-type receptors, including VLA-4 and VLA-5 (CD49d/CD29 and CD49e/CD29) with fibronectin, and VLA-6 (CD49f/CD29) with laminin [10, 12, 13]. Again, any changes in these interactions might lead to a disturbance in thymocyte migration. In fact this has been demonstrated in the thymus of the nonobese diabetic (NOD) mouse, which has an expression/functional defect of VLA-5 [14, 15]. Moreover, in *T. cruzi* experimental infection, the thymic atrophy, here defined by loss of thymus weight and cellularity, was characterized by premature escape of immature cells, mainly DP subpopulation [14], likely due to a hyper responsiveness to ECM and chemokine components, and resulting in the premature and abnormal escape of DP lymphocytes, and the consequent presence of immature T cells in the periphery [16, 17].

Thus, we can conceive that changes in the expression/function of one or more of the cell migration related molecules discussed above may result in an abnormal intrathymic T cell development, with consequences in the shaping of the peripheral T cell pool. Herein we investigated the intrathymic expression of ECM ligands and receptors, as well as chemokines and their respective receptors during the experimental *P. berghei* infection. We also evaluated the thymus atrophy in this infectious disease, and its possible consequences to the T cell migratory response.

Our data unravel significant intrathymic alterations in *P. berghei*-infected mice, comprising the expression of cell migration-related ligands, including the ECM elements

laminin and fibronectin, as well as the chemokines CCL25 and CXCL12. Moreover, thymocyte migratory response to these ECM and chemokine ligands is enhanced in infected mice, suggesting that a defect of cell migration-related thymic function may contribute to shaping the abnormal the peripheral pool of T lymphocytes seen in murine malaria.

RESULTS

Extracellular matrix ligands and receptors are modulated in thymuses from *P. berghei*-infected mice

We first investigated if thymic contents of ECM ligands and receptors were altered in *P. berghei*-infected animals. As ascertained by imunohistochemistry, we detected an increase of fibronectin and laminin deposition within the thymic lobules of infected mice, as compared to controls. This was further confirmed quantitatively by histometric computer-based analyses (Figure 1).

In contrast to the increase in fibronectin and laminin contents, flow cytometric evaluation of thymocytes from infected mice revealed a decrease in the relative numbers and membrane density of the fibronectin receptors VLA4 and VLA5 (CD49d and CD49e, respectively), as well as the laminin receptor VLA6 (CD49f). Infected mice presented decrease in the relative numbers of VLA4⁺/DN thymocytes, and a decrease in membrane expression levels of this receptor on DN and CD8⁺ SP subpopulations (Figures 2A and 2B). When we analyzed VLA5, we found that the relative numbers of cells expressing this receptor was not changed, as compared to controls. However, thymocytes from infected mice presented decrease VLA-5 density, particularly in the CD4⁺ and CD8⁺ SP subpopulations (Figures 2C and 2D).

Both, DN and DP thymocyte subsets from *P.berghei*-infected mice exhibited a decrease in the relative numbers of VLA6⁺ cells, as compared to control animals. Membrane

expression levels were also altered, since DN, DP and CD8⁺ SP thymocytes showed a decreased density in VLA-6, as evaluated by the mean of fluorescence intensity (Figures 2E and 2F).

Overall, these data indicate that cell migration-related ECM integrin-type receptors are down-regulated in thymocyte subpopulations from *P. berghei*-infected mice.

The expression pattern of chemokines and their receptors are changed in thymocytes from *P. berghei*-infected mice.

We also evaluated two selected chemokines produced by the thymic microenvironment, CCL25 and CXCL12, as well as their corresponding receptors, CCR9 and CXCR4, expressed in thymocyte subsets. At 14 days post-infection, the thymus from *P.berghei*-infected mice showed a statistically significant increase in CXCL12 expression when compared to control thymuses, as ascertained by quantitative PCR (Figure 3A).

Concomitantly with such increase in CXCL12 expression, all thymocyte subpopulations from infected mice exhibited an increase in the relative numbers of cell expressing CXCR4 (Figure 3B). Membrane expression levels were also higher in thymocytes from infected mice (except in CD8⁺ SP thymocytes), when compared to controls (Figure 3C).

In contrast, the analysis of CCL25 expression in the thymus from *P.berghei*-infected mice revealed decreased levels in mRNA, when compared to controls (Figure 3D). Moreover, the relative numbers of thymocytes expressing CCR9 were decreased in DN and CD8⁺ SP subsets, and increased in DP thymocytes (Figure 3E). Nevertheless, membrane density of CCR9 was higher in all thymocyte subpopulations from infected mice, when compared to control mice (Figure 3F).

Chemokine/ECM-driven thymocyte migration is modified following *P. berghei* infection

To investigate a possible functional impact on thymocytes triggered by interreactions mediated by selected ECM and chemokines, we analyzed the migratory response through fibronectin or laminin, or towards CXCL12 or CCL25, as well as the combined effect of each chemokine combined with one given ECM element. Overall, when we evaluated the bulk of migrating thymocytes, we found an enhanced higher migratory response of thymocytes from infected mice, as compared to controls (Figure 4). This was seen in respect to laminina, CXCL12 and CCL25 applied alone, as well as the combine stimuli of laminina with a given chemokine. The only exception was seen when fibronectin was applied alone: in this case the migration pattern was similar in both control and infected groups. Nevertheless, thymocytes from infected mice migrated significantly more than the control ones when fibronectin was combined with CXCL12 or CCL25. In fact, these chemokines alone were able to enhance migratory response of thymocytes from *P.berghei*-infected mice, when compared to controls.

We next evaluated the migratory responses of each CD4/CD8-defined thymocyte subset, under the same stimuli. We found that DN, SPCD4⁺, and SPCD8⁺ cells from *P. berghei*-infected mice showed higher migratory activity as compared to controls (see data in Table 1). Rather surprisingly, the number of CD4⁺CD8⁺ living migrating cells were consistently decrease when they derived from infected animals, as compared to controls. This might represent a true decrease in the responding cells, or cell death during the migration period of three hours, since we knew that DPs are the most sensitive thymocyte subset in malaria infection. Actually, we noticed that in the wells having thymocytes from infected animals, the numbers of dying (Trypan blue positive) cells were much higher than what was found in thymocytes from controls.

Lastly, and considering that migratory responses of mature thymocytes from infected mice were significantly higher than the corresponding controls, we evaluated the T cell pool

in the periphery, more specifically in the spleen. In fact, the numbers of both CD4⁺ and CD8⁺ spleen-derived T cell subsets in infected mice were much higher than the corresponding controls (Figure 5).

DISCUSSION

The interplay between thymocytes and the thymic microenvironment is modulated by a variety of proteins, like ECM components and chemokines, and it has been considered of crucial importance to provide the correct signals to thymocyte migration and maturation [8, 18]. In this sense, it is reasonable to suppose that alterations in ECM elements and chemokines are implicated in thymic dysfunction.

We have previously reported that *Plasmodium berghei* infection induces thymus atrophy with changes in its architecture that is characterized by loss of the cortico-medullary delimitation and massive depletion of thymocytes, mainly the double-positive (DP) subpopulation [5]. In this paper we have described that thymic atrophy induced by malaria infection is also characterized by profound alterations in the expression of ECM components and chemokines, in such way that thymocyte migration inside the thymus, which is an essential event for T cell development, is severely compromised.

Like observed in the *Trypanosoma cruzi* infection by Cotta-de-Almeida and co-workers [16] we have found higher density of fibronectin and laminin elements in the thymus from infected animals than that observed in the controls. The participation and importance of these proteins in the thymocyte development has already been described [10, 11]. The ECM molecules form bridges between thymocytes and cells of the thymic microenvironment, such as thymic epithelial cells, dendritic cells and macrophages, providing a mechanical support to thymocyte migration inside thymus [19, 20]. Laminin plays an important role in thymocyte maturation and high levels of this molecule are associated with high migration rates [21, 22].

Besides, the enhancement of fibronectin is related to an increased of apoptosis in DP thymocytes [23].

In our experimental model, the DP thymocytes are the most subpopulation severely affected and this fact can be related to the increase in fibronectin density. We believe that such alterations in ECM elements are compromising the intrathymic migration and the T cell development in *P.berghei* infected mice.

Interestingly, alterations in ECM components were not accompanied by the increase of VLA4, VLA5 or VLA6 expression, suggesting that a high density of ECM elements not necessarily is accompanied by enhancement of their receptors on thymocyte surface. Interactions among ECM elements and their specific receptors are essentials to release signals which promote thymocyte migration. In fact, literature shows that the blockade of both VLA-4 and VLA-5 completely changes the pattern of fibronectin driven migration [24].

Other molecules, with significant importance to intrathymic migration, are the chemokines and their cognitive receptors. The chemokine CXCL12 is required by thymocytes to migrate from the cortical medullary junction to the subcapsular zone, where specific signals from intrathymic microenvironmental niches induce and regulate the earliest stages of thymocyte development [13, 25, 26]. It has been also demonstrated that an enhanced fibronectin expression favors the chemokine sequestration preventing its degradation by matrix metalloproteinases (MMPs) [27]. In fact, we have found that alterations in the ECM pattern were accompanied by increased expression of the chemokine CXCL12 and its respective receptor, the CXCR4 molecule.

The expression of another chemokine, the molecule CCL25, and its ligand, the receptor CCR9, were also found altered in our experimental group. Malaria infected animals showed decreased expression of CCL25 with an increased CCR9 density in all thymocyte subpopulations [28]. At DP stage, thymocytes become to express the CCR9 molecule in

response to CCL25 and then migrate towards medulla. It has been proposed that the interaction CCL25/CCR9 is extremely necessary to prevent apoptosis during thymocyte development [29]. The results found here suggest, besides abnormalities in thymocyte migration, the occurrence of high cell death in thymus from *P.berghei*-infected mice. Experiments are on going by our group to confirm, or not, this supposition.

Cell migration is crucial for intrathymic T-cell differentiation, and the combinatorial role for extracellular matrix elements and chemokines in this event was already proposed by Savino and co-workers [10]. Taking into account the alterations observed in our murine model of malaria, we have decided to investigate the *ex vivo* migratory activity of thymocytes towards the chemokines, CXCL12 and CCL25, alone or in combination with fibronectin and laminin. The chemokine-driven thymocyte migration was higher in *plasmodium*-infected group than in controls, suggesting that their specific receptors are more activated. Moreover, when fibronectin was applied with the chemokines the number of migrating cells was higher than that observed when the fibronectin was the only stimulus, suggesting a compensatory mechanism for CXCR4 and CCL25 in relation to the decreased expression of VLA-5. These results are similar to that observed in the murine model of *Trypanosoma cruzi* [16]

Interestingly, it was noted that the laminin-driven thymocyte migration was higher despite the decreased expression of the VLA-6 molecule. Once again, this result suggests that the state of activation of the receptor could be more important than its density on the membrane, at least to thymocyte migration.

Here, we have also observed, by using an *ex vivo* migration assay, a higher migratory activity of DN, CD4⁺ and CD8⁺ subpopulations of thymocytes from *Plasmodium berghei*-infected mice when compared to the controls. Coincidentally, spleen of infected mice presented increased numbers of DN, CD4⁺ and CD8⁺ subpopulations. Such an enhancement of CD4⁺ and CD8⁺ SP lymphocytes may be evidently attributed to the proliferation of these

subpopulations in response to the parasite. But the high numbers of DN thymocytes in spleen is an intriguing question. In the *T.cruzi* infection, for example, alterations in thymocyte migration are also observed and high numbers of DP thymocytes are found in the lymph nodes [30]. These authors suggest that these immature lymphocytes in the periphery can play an important role in the autoimmunity process observed during Chagas' disease [31]. Although *Plasmodium* infection does not present autoimmunity complications, it is possible that alterations observed in the migratory activity of thymocytes and the presence of DN subpopulation in the spleen of mice during the infection can also affect the immune response against the parasite.

We believe that the presence of *Plasmodium* inside the thymus, as reported earlier by our group, is important, and most probably sufficient, to evoke alterations in the thymic microenvironment [5]. However, the possibility that systemic factors, like cytokines, glucocorticoids and/or other hormones, released during the immune response against the parasite, are also inducing alterations in the thymus can not be discarded. Further studies examining the role of these possible interfering proteins are required to define their contribution to the thymus atrophy during malaria infection.

Overall, we provided evidence that the thymic atrophy observed in *Plasmodium berghei*-infected mice is accompanied by severe thymic microenvironmental changes that comprise altered expression of thymocyte migration-related molecules of the ECM and chemokine protein families, which in turn, alter the thymocyte migration pattern. Such altered migration response may contribute to shaping the abnormal the peripheral pool of T lymphocytes seen in murine malaria.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Specific pathogen-free 8 week-old male BALB/c mice were purchased from CEMIB/UNICAMP (Campinas, São Paulo, Brazil) and housed in microisolator cages with free access to water and food. All protocols were performed in accordance with the guidelines of the State University of Campinas' Committee on the Use and Care of Animals.

Infection of mice

Ten animals were infected with 5×10^6 red blood cells parasitized by *Plasmodium berghei*-NK65 (PbNK-65) or only injected with saline (negative control group). After 14 days of infection, control and infected mice were anesthetized, sacrificed and their thymuses collected and used in experiments described below.

Cytofluorometry

Thymuses were minced, washed and resuspended in PBS-FCS 5% for subsequent cellularity evaluation, which was followed by triple immunofluorescence staining. Appropriate dilutions of the following fluorochrome-labeled monoclonal antibodies (mAbs) were used: FITC/anti-CD4 (clone GK1.5), Alexa Fluor 647/anti-CD8 (clone 53-6.7), PeCy-7/anti-CD3 (clone 145-2C11), PE/anti-CD49d (clone 9C10), PE/anti-CD49e (clone 5H10-27), PE/anti-CD49f (clone GOH3), PE/anti-CXCR4 (clone B11/CXCR4) and PE/anti-CCR9 (clone 242503). These reagents were purchased from Pharmingen/Becton-Dickinson (South San Francisco, CA, USA) and R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Fluorochrome-labeled isotype-matched negative controls for the specific mAbs were Pharmingen products. Cells were stained for 20 minutes and then washed with PBS, fixed and analyzed by flow cytometry in a FACsCANTO[®] device (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) equipped with Diva

software. Analyses were done after recording 10,000 events for each sample using FCS Express V3 software. Splenic cells from infected and control animals were also processed and analyzed by flow cytometry. In this case, cell populations were analyzed by gating on forward scatter (FSC), side scatter (SSC), CD3, CD4 and CD8.

Immunofluorescence

Thymuses were embedded in Tissue-Tek (LEICA Instruments - Germany) and subsequently frozen at -70°C . Five μm thick cryostat sections were settled on silanized glass slides, acetone fixed and blocked with PBS/1% BSA. Samples were submitted to anti-fibronectin or anti-laminin primary antibody incubation (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for 1 h at room temperature, washed three times with PBS and labeled FITC-coupled secondary antibody incubation (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA, USA) for an additional 30 min. Samples were analyzed by fluorescence microscopy Olympus and the images obtained were subsequently quantified for the presence of ECm proteins using the Image J software [32].

Quantitative polymerase chain reaction (q-PCR)

The expression of chemokine genes was evaluated by real-time quantitative transcription-PCR (RT-qPCR). Thymus RNA was extracted from tissues using the Illustra RNAspin Mini (GE Healthcare, Amersham, UK). After RNA quantification and analysis of RNA integrity on a 1.5% agarose gel, reverse transcription was performed with approximately 2 μg of RNA using the *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The cDNA was quantified in Nanodrop by determining the absorbance at 260 nm, and the 260/280 nm absorbance ratio was calculated. The polymerase chain reaction was performed with an ABI Prism 7300 device (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the reactions were carried out in 25

μL volume and in the presence of the TaqMan PCR Master Mix™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), using different sets of oligonucleotides and probes for the amplification of the RNA 18s, CXCL12 and CCL25 genes. These corresponded (respectively) to the following reference numbers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA): Rn00667869_ml, Mm00446190_ml and Mm00439616_ml. Expression levels of chemokine genes in control and infected mice were represented as relative copy numbers by using the delta threshold cycle method ($2^{-\Delta C_t}$) [33].

Transmigration experiments

Thymocyte migratory response was assessed as described before [17, 34]. Briefly, 5 μm-pore size inserts of transwell plates (Corning Costar, Cambridge, USA) were coated with 10 μg/mL of BSA, fibronectin, laminin (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) or PBS for 1 h at 37°C and then blocked with PBS/ 0,5% BSA for 45 minutes at 37°C. Thymocytes (2.5×10^6 in 100 μl RPMI/ 1% BSA) were added in the upper chambers. After 3 h incubation at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere, migration was defined by counting the cells that migrated to the lower chambers containing only migration milieu (RPMI/ 1% BSA) or containing 400 ng/ml of chemokines CXCL12 or CCL25 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Of note, the migration medium was always devoid of fetal calf serum, thus avoiding any serum-derived migration stimuli such as fibronectin and other soluble factors. Migrating cells were ultimately counted, labeled with appropriate antibodies and analyzed by flow cytometry. The results are presented in terms of total migration as well as of relative numbers (percentages of input) and correspond to specific migration after subtracting the numbers found in wells coated only with BSA.

Statistical Analysis

Statistical evaluation of the results between control and infected-mice was carried out by unpaired T test, using the GraphPad Prism 4.0 software. Results are given as mean values (\pm SE) and p values less than 0.05 were considered to be statistically significant.

ACKNOWLEDGEMENTS

We sincerely thank Ana Leda Longhini from Centro Integrado de Pesquisas Onco-hematológicas na Infância (CIPOI/UNICAMP). This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), grant number #04/03599-1. P.R.A.N. was a recipient of a doctoral fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq #14229/2005-1) and State University of Campinas (UNICAMP). FTMC & WS are recipients of a research scholarship from CNPq.

REFERENCES

- [1] Marsh K, Kinyanjui S (2006) Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol* 28: 51-60.
- [2] Schofield L, Grau, GE (2005) Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol* 5: 722-735.
- [3] Seixas E, Ostler, D (2005) *Plasmodium chabaudi chabaudi* (AS): differential cellular responses to infection in resistant and susceptible mice. *Exp Parasitol* 110: 394-405.
- [4] Fonseca L, Seixas E, Butcher G, Langhorne, J (2007) Cytokine responses of CD4⁺ T cells during a *Plasmodium chabaudi chabaudi* (ER) blood-stage infection in mice initiated by the natural route of infection. *Malar J* 6: 77-86.
- [5] Andrade CF, Gameiro J, Nagib PR, Carvalho BO, Talaisys RL, Carvalho BO, Talaisys RLB, Costa FTM, Verinaud L (2008) Thymic alterations in *Plasmodium berghei*-infected mice. *Cell Immunol* 253: 1-4.
- [6] Savino W., Dardenne M. (2000). Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocr Rev*, 21 412-443.
- [7] Ciofani, M., & Zuniga-Pflucker, J. C. (2007). The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23, 463-493.
- [8] Savino W (2006) The thymus is a common target organ in infectious diseases. *PLoS Pathog* 2:472-483.
- [9] Savino W (2007) Neuroendocrine control of T cell development in mammals: role of growth hormone in modulating thymocyte migration. *Exp Physiol* 92: 813-817.
- [10] Savino W, Mendes-da-Cruz D A, Silva J S, Dardenne M, Cotta-de-Almeida V (2002) Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? *Trends Immunol* 23: 305-313.

- [11] Fu W, Chen W (2004) Roles of chemokines in thymopoiesis: redundancy and regulation. *Cell Mol Immunol* 1: 266-273.
- [12] Savino W, Villa-Verde D M, Lannes-Vieira J (1993) Extracellular matrix proteins in intrathymic T-cell migration and differentiation? *Immunol Today* 14: 158-161.
- [13] Savino W, Mendes-Da-Cruz DA, Smaniotto S, Silva-Monteiro E, Villa-Verde DM (2004) Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *J Leukoc Biol* 75: 951-961.
- [14] Cotta-de-Almeida V, Villa-Verde D M, Lepault F, Pleau J M, Dardenne M, Savino W (2004) Impaired migration of NOD mouse thymocytes: a fibronectin receptor-related defect. *Eur J Immunol* 34: 1578-1587.
- [15] Mendes-da-Cruz DA, Smaniotto S, Keller AC, Dardenne M, Savino, W (2008) Multivectorial abnormal cell migration in the NOD mouse thymus. *J Immunol*, 180:4639-4647.
- [16] Cotta-de-Almeida V, Bonomo A, Mendes-da-Cruz DA, Riederer I, De Meis J, et al. (2003) *Trypanosoma cruzi* infection modulates intrathymic contents of extracellular matrix ligands and receptors and alters thymocyte migration. *Eur J Immunol* 33:2439-2448.
- [17] Mendes-da-Cruz DA, Silva JS, Cotta-de-Almeida V, Savino W (2006) Altered thymocyte migration during experimental acute *Trypanosoma cruzi* infection: combined role of fibronectin and the chemokines CXCL12 and CCL4. *Eur J Immunol* 36:1486-1493.
- [18] Petrie HT, Zuniga-Pflucker JC (2007) Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu Rev Immunol* 25:649-679.
- [19] Ramarli D, Scupoli MT, Fiorini E, Poffe O, Brentegani M, et al. (1998) Thymocyte contact or monoclonal antibody-mediated clustering of 3beta1 or 6beta4 integrins activate interleukin-6 (IL-6) transcription factors (NF-kappaB and NF-IL6) and IL-6 production in human thymic epithelial cells. *Blood* 92:3745-3755.

- [20] Prockop SE, Palencia S, Ryan CM, Gordon K, Gray D, et al. (2002) Stromal cells provide the matrix for migration of early lymphoid progenitors through the thymic cortex. *J Immunol* 169:4354-4361.
- [21] Ocampo JS, de Brito JM, Correa-de-Santana E, Borojevic R, Villa-Verde DM, et al. (2008) Laminin-211 controls thymocyte--thymic epithelial cell interactions. *Cell Immunol* 254:1-9.
- [22] Smaniotto S, de Mello-Coelho V, Villa-Verde DM, Pleau JM, Postel-Vinay MC, et al. (2005) Growth hormone modulates thymocyte development in vivo through a combined action of laminin and CXC chemokine ligand 12. *Endocrinology* 146:3005-3017.
- [23] Takayama E, Kina T, Katsura Y, Tadakuma T (1998) Enhancement of activation-induced cell death by fibronectin in murine CD4⁺CD8⁺ thymocytes. *Immunology* 95:553-558.
- [24] Crisa L, Cirulli V, Ellisman MH, Ishii JK, Elices MJ, et al. (1996) Cell adhesion and migration are regulated at distinct stages of thymic T cell development: the roles of fibronectin, VLA4, and VLA5. *J Exp Med* 184:215-228.
- [25] Plotkin J, Prockop SE, Lepique A, Petrie HT (2003) Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus. *J Immunol* 171:4521-4527.
- [26] Hernandez-Lopez C., Varas A, Sacedon R, Jimenez E, Munoz JJ, et al. (2002) Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for early human T-cell development. *Blood* 99:546-554.
- [27] Pelletier AJ, van der Laan LJ, Hildbrand P, Siani MA, Thompson DA, et al. (2000) Presentation of chemokine SDF-1 alpha by fibronectin mediates directed migration of T cells. *Blood* 96:2682-2690.

- [28] Svensson M, Marsal J, Uronen-Hansson H, Cheng M, Jenkinson W, et al. (2008) Involvement of CCR9 at multiple stages of adult T lymphopoiesis. *J Leukoc Biol* 83:156-164.
- [29] Youn BS, Yu KY, Oh J, Lee J, Lee TH, et al. (2002) Role of the CC chemokine receptor 9/TECK interaction in apoptosis. *Apoptosis* 7:271-276.
- [30] Mendes-da-Cruz DA, de Meis J, Cotta-de-Almeida V, Savino W (2003) Experimental *Trypanosoma cruzi* infection alters the shaping of the central and peripheral T-cell repertoire. *Microbes Infect* 5:825-832.
- [31] Kierszenbaum F (1999) Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin Microbiol Rev* 12:210-223.
- [32] Collins TJ (2007) ImageJ for microscopy. *Biotechniques* 43: 25-30.
- [33] Overbergh L, Giulietti A, Valckx D, Decallonne R, Bouillon R, et al. (2003) The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J Biomol Tech* 14:33-43.
- [34] Mendes-da-Cruz DA, Smaniotto S, Keller AC, Dardenne M, Savino, W (2008) Multivectorial abnormal cell migration in the NOD mouse thymus. *J Immunol*, 180:4639-4647.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Extracellular matrix density in the thymus. (A) Immunofluorescence staining shows enhanced density of fibronectin in the thymus from *P. berghei*-infected when compared to the control. Enhanced density was also observed to laminin staining (Original magnification, x 100). (B) and (C) The graphics correspond to quantitative analysis of selected microscopic fields of thymuses from control and infected mice in terms of fibronectin and laminin, respectively. Results are expressed in pixels/ μm^2 and represent the mean \pm SE for at least five animals. ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

Figure 2. Altered expression of fibronectin receptors (VLA4 and VLA5) and laminin receptor (VLA6) in total thymocytes and in CD4/CD8-defined subpopulations (DN: $\text{CD4}^-\text{CD8}^-$, DP: $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$, CD4: $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$, CD8: $\text{CD4}^-\text{CD8}^+$) from control and *P. berghei*-infected mice. Full histograms correspond to unrelated immunoglobulin staining controls of normal and *P. berghei*-infected mice. Open gray and open black histograms correspond to normal and infected mice, respectively. (A), (C), and (E) Decreased percentage of thymocytes from infected mice that express VLA4, VLA5 and VLA-6, respectively. (B), (D), and (F) Decreased expression of fibronectin receptor VLA4 and VLA5, and laminin receptor VLA6 in thymocyte from infected mice. Results are expressed as mean \pm SE for at least five animals. * $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$.

Figure 3. Altered expression of chemokines CCL25 and CXCL12, and their receptors (CCR9 and CXCR4, respectively) in total thymocytes and in CD4/CD8-defined subpopulations (DN: $\text{CD4}^-\text{CD8}^-$, DP: $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$, CD4: $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$, CD8: $\text{CD4}^-\text{CD8}^+$) from control and *P. berghei*-infected mice. Full histograms correspond to unrelated immunoglobulin staining controls for normal and infected mice. (A) and (D) Relative expression of CXCL12 and CCL25,

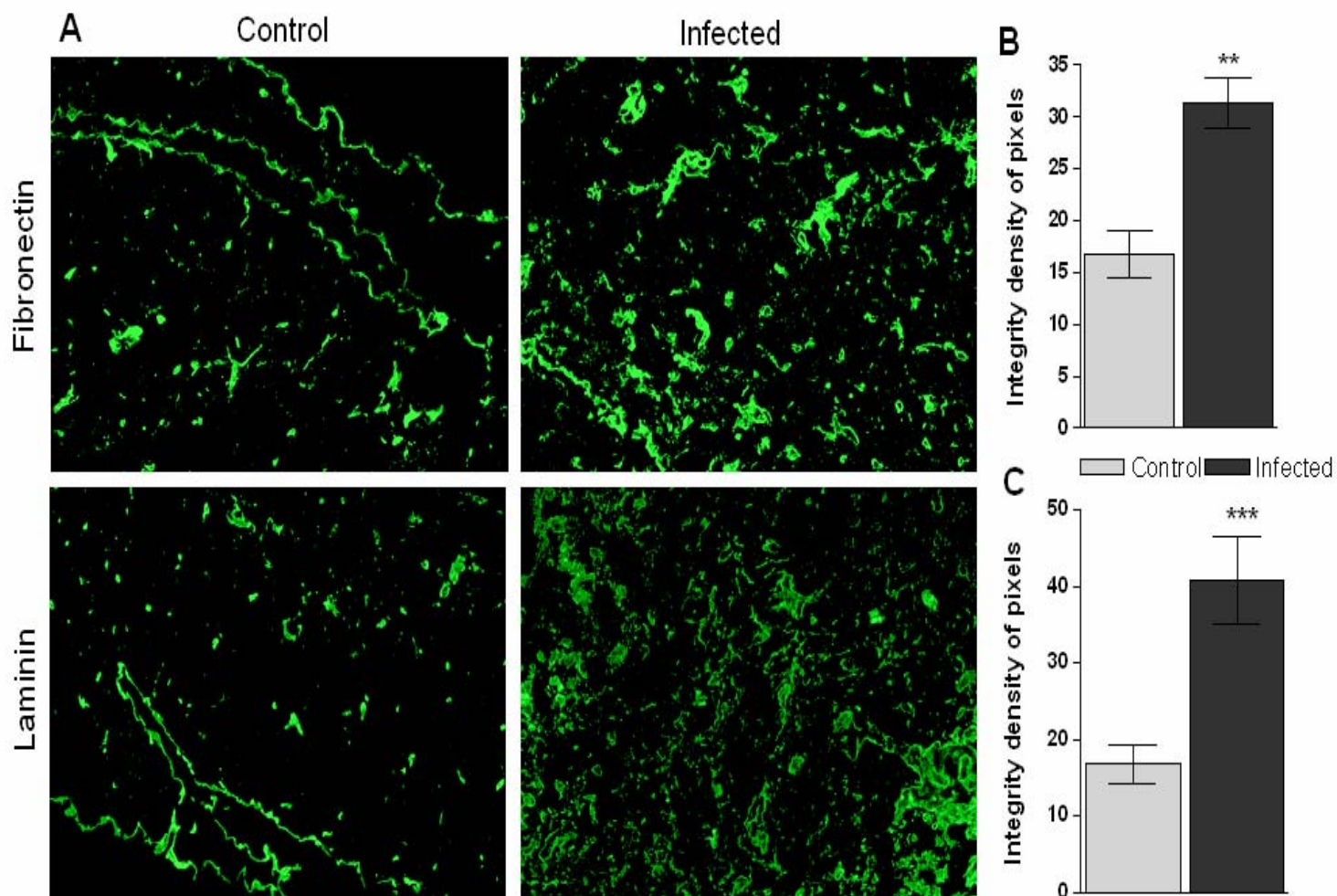
respectively in control and *P. berghei*-infected mice. (B) and (E) Increased percentage of CXCR4 and CCR9, respectively, in thymocytes from *P.berghei*-infected mice. (C) and (F) Increased expression of CXCR4 and CCR9, respectively, in thymocytes from infected mice. Results are expressed as mean \pm SE for at least five animals. * $p \leq 0.05$, and *** $p < 0.001$.

Figure 4. Altered thymocyte migration *P. berghei*-infected mice. (A) The graphic shows the numbers of total migrating cells towards fibronectin (FN) and laminin (LN), or CXCL12 and CCL25, as well as the chemokines combined with one given ECM element. (B) Spleen from infected mice showed increased numbers of DN, TCD4⁺ and TCD8⁺ subpopulation as compared to controls. Results are expressed as mean \pm SE derived from five experiments, each one obtained by a pool of at least five control and ten infected mice. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

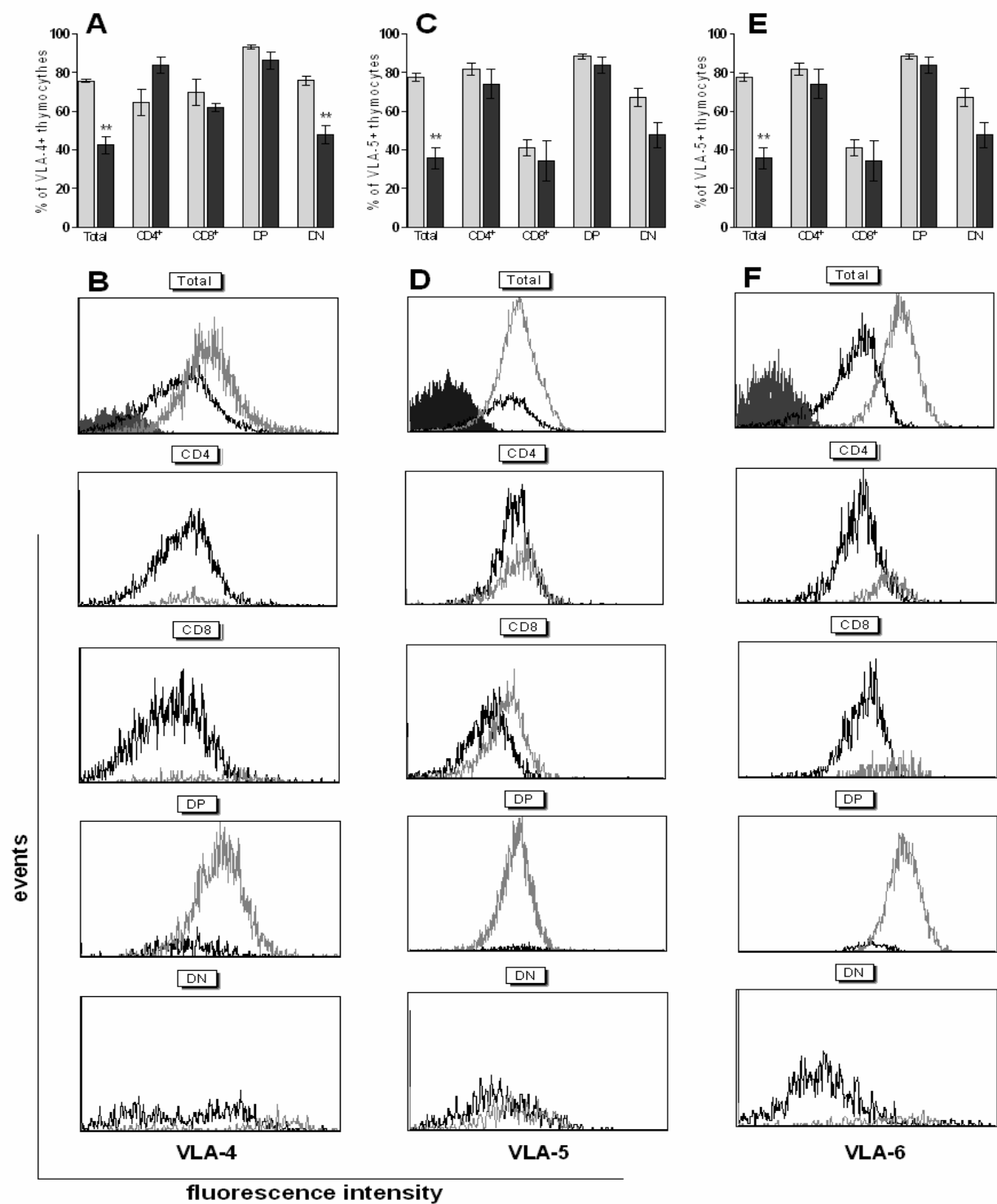
Table 1. Altered *ex vivo* migratory responses of CD4/CD8-defined thymocyte subpopulations from *Plasmodium berghei*-infected mice^{a,b}.

Stimuli	Group	DN	DP	CD4 ⁺	CD4 ⁺ fold change	CD8 ⁺	CD8 ⁺ fold change
Fibronectin	Control	0.72±0,05	4.1±0,12	2.01±0,25	2.5	0.65±0,15	4.3
	Infected	1.32±0,24	1.0±0,04**	5.04±0,76*		2.83±0,44*	
Laminin	Control	0.58±0.16	3.79±0.66	1.71±0.20	3.4	0.70±0.11	2.4
	Infected	1.56±0.34	1.13±0.06*	5.86±0.32*		1.71±0.20**	
CXCL12	Control	0.21±0.01	4.35±0.80	0.90±0.31	7.7	0.44±0.06	9.1
	Infected	1.50±0.20**	1.04±0.16*	6.96±0.88**		4.03±0.43**	
CCL25	Control	0.11±0.02	2.72±0.42	0.55±0.18	6.6	0.26±0.06	7.9
	Infected	0.90±0.17**	0.73±0.09*	3.68±0.36**		2.06±0.26**	
Fibronectin +CXCL12	Control	0.32±0.09	5.50±1.33	1.06±0.32	12.9	0.49±0.17	13.8
	Infected	2.35±0.44**	2.04±0.37*	13.68±2.13**		6.79±0.85**	
Fibronectin +CCL25	Control	0.22±0.06	3.43±0.73	0.73±0.14	7.4	0.24±0.07	11.3
	Infected	1.21±0.17*	0.93±0.03**	5.45±0.32**		2.73±0.16**	
Laminin+CXCL12	Control	0.32±0.31	4.89±0.46	1.64±0.35	8.5	0.84±0.18	10.2
	Infected	2.48±0.47**	2.06±0.16*	14.06±0.99**		8.61±0.85**	
Laminin +CCL25	Control	0.11±0.02	2.90±0.39	0.57±0.15	15.6	0.22±0.07	23.2
	Infected	1.88±0.44**	1.57±0.27*	8.91±1.75**		5.11±1.52**	

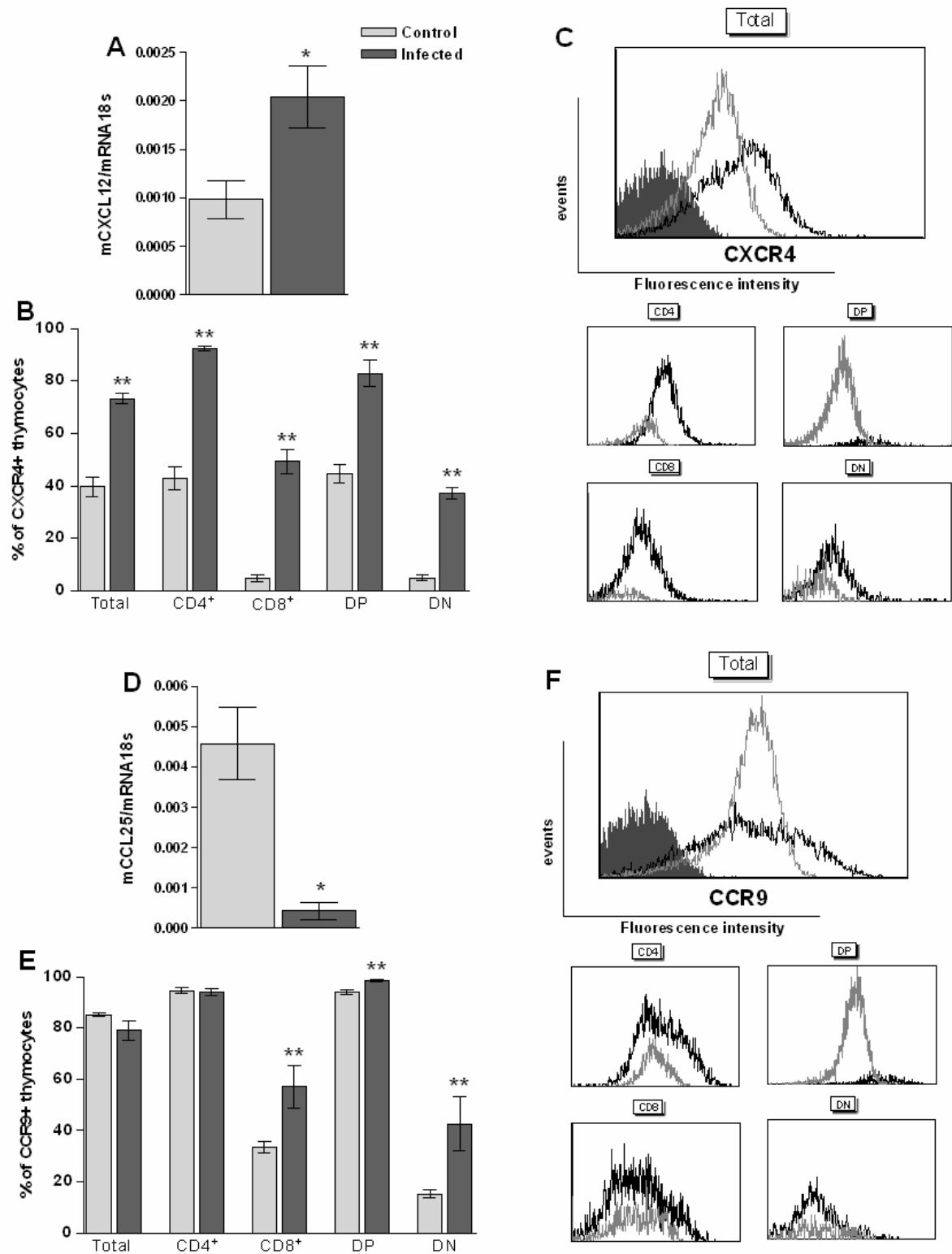
^aOnly living cells (ascertained by the Trypan blue exclusion test) were counted after migration. ^bThe relative numbers (percentage of input) of migrating thymocytes towards different haptotactic stimuli are representative of three similar experiments, each one corresponding to a pool of 4 control and 6 infected animals. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.



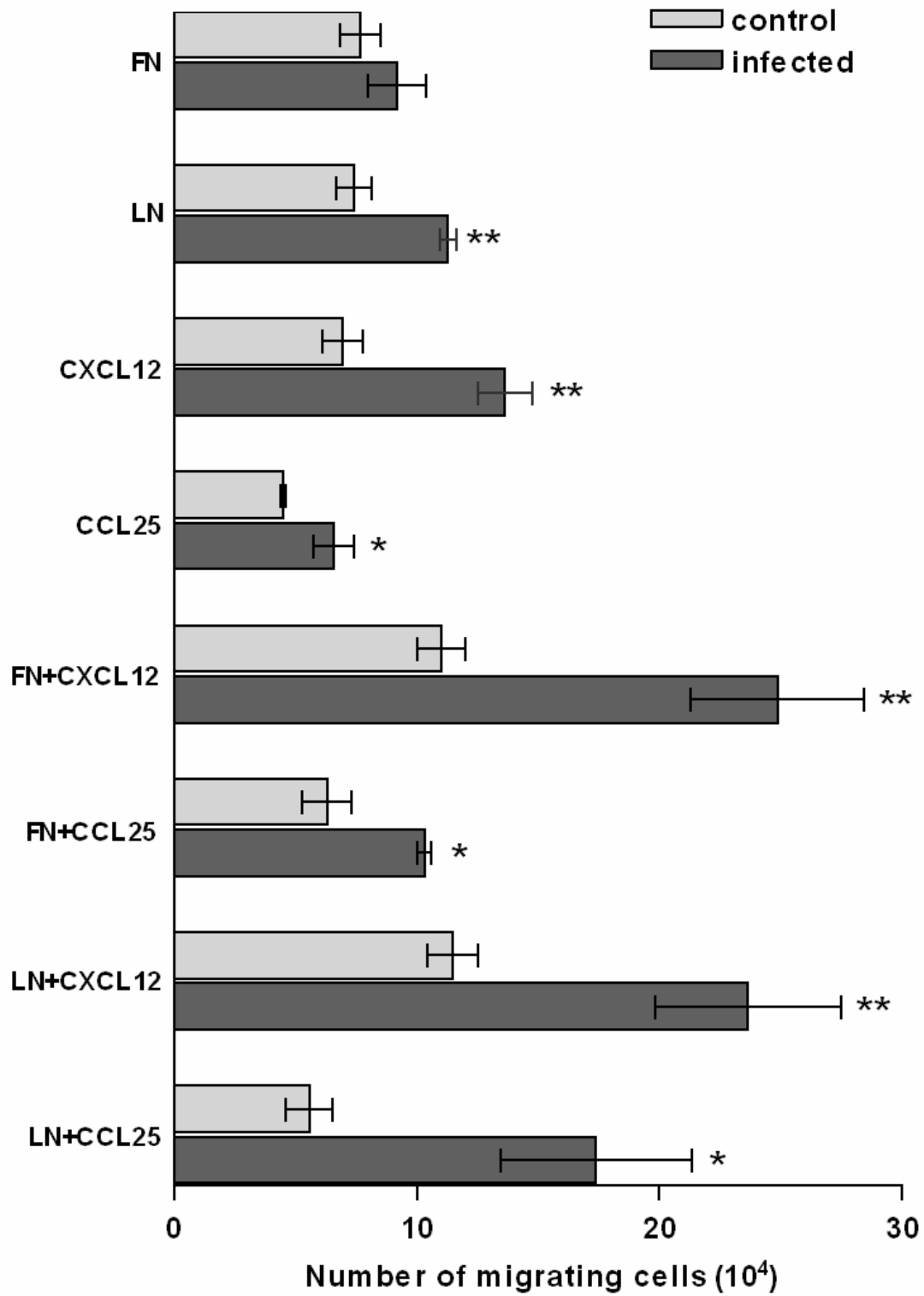
Gameiro *et al* , Figure 1.



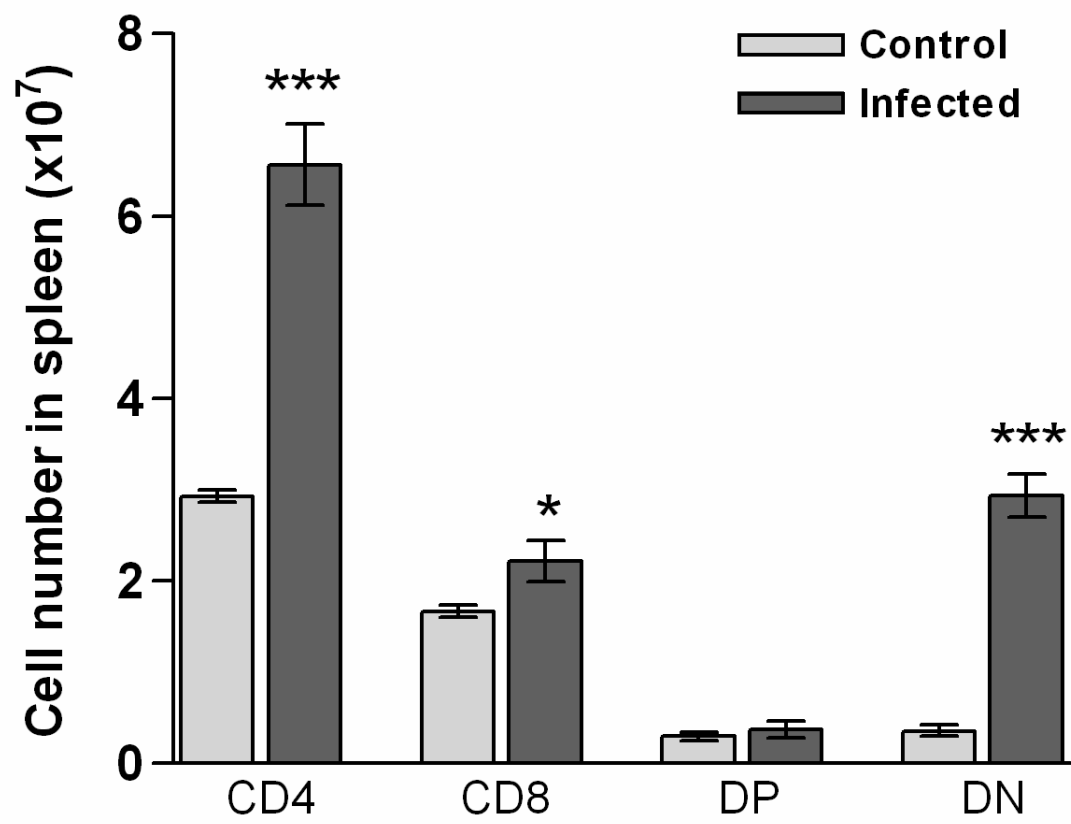
Gameiro *et al*, Figure 2



Gameiro *et al*, Figure 3



Gameiro *et al.*, Figura 4



Gameiro *et al.*, Figura 5

Artigo 3

THYMIC MICROENVIRONMENTAL ALTERATIONS IN EXPERIMENTALLY- INDUCED DIABETES

Patrícia R. A. Nagib¹, Jacy Gameiro¹, Luiz Guilherme Stivanin Silva ¹, Maria Sueli Parreira
de Arruda², Déa Maria Serra Villa-Verde³, Wilson Savino³ & Liana Verinaud^{1*}

¹Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biology, State University
of Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil.

²Department of Biological Sciences, Faculty of Science, State University Júlio de
Mesquita Filho - UNESP, Bauru, São Paulo, Brazil.

³Laboratory on Thymus Research, Department of Immunology, Oswaldo Cruz Institute,
Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

P.R.A. N. & J.G. contributed equally to this work.

* Corresponding author:

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Instituto de Biologia, C.P. 6109

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

CEP13 083-970, Campinas – SP – BRASIL

Phone: 55 19 35216255

Fax: 55 19 35216276

E-mail: verinaud@unicamp.br

ABSTRACT

Little is known about the immune consequences of Type 1 diabetes. Since a preserved thymic microenvironment is of critical importance for the T cell development and maturation, we have examined the thymus from alloxan-diabetic mice. An intense thymic atrophy accompanied by changes in histological pattern and in thymocyte subpopulations were observed in diabetic mice. Laminin and fibronectin, which are close associated with thymocytes maturation, were evaluated, but, only laminin presented an altered distribution and density in thymuses from diabetes group. The expression of fibronectin and laminin receptors was found to be decreased in diabetic mice. There was also intense decrease in the expression of two important chemokines for thymus, CCL25 and CXCL12, and in the CCR9 (CCL25 receptor), but the expression of CXCR4 (CXCL12 receptor) did not drop on cells. However, no significant difference was observed in the *in vitro* thymocytes migratory capacity from diabetic mice. The results show significant alterations in thymus microenvironment in diabetes and offer insights for endocrinal influences studies for T cell maturation.

Keywords: thymus; thymic microenvironment; diabetes; alloxan-diabetic mice.

INTRODUCTION

The thymus, a specialized, primary lymphoid organ, is crucial for the development of immature T cells into cells that further in the periphery will be able to carry out immune functions against several pathological conditions. The successful development of mature T cells depends on the constant migration of the immature T cell (or thymocytes while in the thymus) through the thymic microenvironment. Such migration is essential to thymic stromal cells provide signals to thymocytes that lead to proliferation, differentiation and generation of diversity [1-3]. Although the mechanism directing this migration is poorly understood, clear evidence has been obtained showing that thymic microenvironment, collectively, influences the process of T cell development through adhesion molecules and extracellular matrix elements (ECM), and by secreting soluble polypeptides as cytokines and chemokines [3,4]. Besides, it is now well-recognized the hormonal influence upon the thymus. Increased circulating levels of glucocorticoids or reduced leptin concentrations in the serum have been known to yield acute thymic involution due to apoptosis-induced thymocyte depletion [5-7]. Given that plasma glucocorticoid and leptin are expected to be altered under conditions of insulin deficiency, it is reasonable to suppose that diabetes can have a serious impact on the body's immune system.

In fact, it has been demonstrated that diabetes patients have many functional abnormalities which could be responsible for compromised inflammatory immune responses [8-10] and increased susceptibility to bacterial and mycotic infections [10-12]

Decreased immune function is also observed experimentally by using streptozotocin-induced diabetic rats which show markedly reduction of cellularity and impaired response of B and T cells in the peripheral lymphoid organs [13]. In addition, past studies have demonstrated that type-1 diabetes patients and non-obese diabetic (NOD) mice present defective maturation of dendritic cells and macrophages with dysfunctional antigen presentation that leads to a defective T cell maturation in the thymus and impaired activation of regulatory T cells [14-16].

The effect of diabetes on the immune system, particularly affecting the thymus gland, has been investigated by many researchers [5, 17-19]. Recently, we have showed enhanced deposition of fibronectin, laminin, and CXCL12 in the thymus from NOD mouse [20]. These same authors have also observed multiple cell migration abnormalities in NOD thymocytes. Yet, other authors [18] have demonstrated that the thymus is ultra-structurally affected by diabetes and concomitant fasting, and that insulin treatment is able to reverse these pathologic changes.

Considering that a preserved thymic microenvironment is of critical importance for the development and maturation of a functional immune system, we have examined the thymus from alloxan-diabetic mice to address the following questions: (i) Is the thymic atrophy observed in such mice correlated with loss of thymocytes or accelerated thymocyte emigration? (ii) Are the thymic ECM elements and respective receptors, as well as, the chemokines CCL25 and CXCL12 and their ligands, which are essential for intrathymic migration, being modulated in insulin-deficient diabetes?; and (iii) Are the migratory capacity of thymocytes from alloxan-diabetic mice in fact altered?

Data showed here may be useful for understanding the mechanisms that drive acute thymic involution associated with diabetes, and so make easy the development of new therapeutic approaches to prevent atrophy or accelerate thymic recovery aiming the maintenance of a robust and healthy immune system in diabetic patients.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Specific pathogen-free male BALB/c mice, 8 week-old, were purchased from CEMIB/UNICAMP (Campinas, São Paulo, Brazil) and housed in microisolator cages with free access to water and food. To create an animal model of type 1 diabetes, 24h-fasted anaesthetized animals were injected with alloxan (2,4,5,6-tetraoxypyrimidine; 5,6-dioxyuracil) purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). All protocols were performed in accordance with the guidelines of the State University of Campinas' Committee on the Use and Care of Animals.

Diabetes Induction

Ten animals were given a single injection of alloxan (60mg/kg) diluted with sterile saline through the tail vein. A control group of ten animals were given a single dose of sterile saline. On the third day after drug injection, blood glucose levels were assessed and only animals with glucose levels above 200mg/dl were considered diabetic and used in the experiments.

Thymic index

The gross weight of each mouse was recorded 24 hours after glycemia dosage. Then, diabetic and non-diabetic animals were sacrificed under anesthesia (using 100 mg/Kg ketamine hydrochloride and 5 mg/Kg xylazine hydrochloride) and the thymus glands were collected and weighed. The thymic index was calculated as: organ weight (g) / body weight (g) x 100.

Histological analysis

For microscopic histological evaluation, thymuses were collected and fixed in a solution 2% paraformaldehyde for 12 hours at room temperature. The specimens were submitted to diafanization with xylene, dehydrated by graded ethanol, embedded in paraffin and cut in 5- μ m-thick sections. Histologic changes were evaluated on sections stained with hematoxylin and eosin (H&E). Additionally, Gomori's silver impregnation staining was performed for specific assessment of reticulin fibres deposition.

Cytofluorometry

Thymuses were minced, washed and resuspended in PBS-FBS 5% for subsequent cellularity evaluation, which was followed by triple immunofluorescence staining. Appropriate dilutions of the following fluorochrome-labeled monoclonal antibodies (mAbs) were used: FITC/anti-CD4 (clone GK1.5), Alexa Fluor 647/anti-CD8 (clone 53-6.7), PeCy-7/anti-CD3 (clone 145-2C11), PE/anti-CD49d (clone 9C10), PE/anti-CD49e (clone 5H10-27), PE/anti-CD49f (clone GOH3), PE/anti-CXCR4 (clone B11/CXCR4)

and PE/anti-CCR9 (clone 242503). These reagents were purchased from Pharmingen/Becton-Dickinson (South San Francisco, CA, USA) and R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Fluorochrome-labeled isotype-matched negative controls for the specific mAbs were Pharmingen products. Cells were stained for 20 minutes and then washed with PBS, fixed and analyzed by flow cytometry in a FACsCANTO[®] device (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) equipped with Diva software. Analyses were done after recording 10,000 events for each sample using FCS Express V3 software. Lymphocytes were gated based on forward and side scatter parameters, so as to avoid larger leukocytes such as macrophages and granulocytes.

Immunofluorescence

Thymuses were embedded in Tissue-Tek (LEICA Instruments - Germany) and subsequently frozen at -70°C . Cryostat sections (5 μm thick) were settled on silanized glass slides, acetone fixed and blocked with PBS/1% BSA. Samples were submitted to anti-fibronectin or anti-laminin primary antibody incubations (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for 1 h at room temperature, washed three times with PBS and submitted to FITC-coupled secondary antibody incubation (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA, USA) for an additional 30 min. Samples were analyzed by fluorescence microscopy Olympus and the images obtained were subsequently analyzed using the Image J [21].

Quantitative polymerase chain reaction (q-PCR)

The expression of chemokine genes was evaluated by real-time quantitative transcription-PCR (RT-qPCR). Thymus RNA was extracted from tissues using the Illustra RNAspin Mini (GE Healthcare, Amersham, UK). After RNA quantification and analysis of RNA

integrity on a 1.5% agarose gel, reverse transcription was performed with approximately 2 µg of RNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The cDNA was quantified in Nanodrop by determining the absorbance at 260 nm, and the 260/280 nm absorbance ratio was calculated. The polymerase chain reaction was performed with an ABI Prism 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the reactions were carried out in 25 µL volume and in the presence of the TaqMan PCR Master Mix™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and different sets of oligonucleotides and probes for the amplification of the RNA 18s, CXCL12 and CCL25 genes. These corresponded (respectively) to the following reference numbers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA): Rn00667869_ml, Mm00446190_ml and Mm00439616_ml. Expression levels of chemokine genes in control and diabetic mice were represented as a relative copy numbers by using the delta threshold cycle method ($2^{-\Delta C_t}$) [22].

Transmigration experiments

Thymocyte migratory activity was assessed as described before [23,20]. Briefly, 5 µm-pore size inserts of transwell plates (Corning Costar, Cambridge, USA) were coated with 10µg/mL of BSA, fibronectin, laminin (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) or PBS for 1 h at 37°C and then blocked with PBS/ 0,5% BSA for 45 minutes at 37°C. Thymocytes (2.5×10^6 in 100µl RPMI/ 1% BSA) were added in the upper chambers. After 3 h incubation at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere, migration was defined by counting the cells that migrated to the lower chambers containing only migration milieu (RPMI/ 1% BSA) or containing 400 ng/ml of chemokines CXCL12 or CCL25 (R&D Systems, Minneapolis,

MN, USA). It is important to note that the migration medium was always devoid of FCS, thus avoiding any serum-derived stimuli such as fibronectin and other soluble factors. Migrating cells were ultimately counted, labeled with appropriate antibodies and analyzed by flow cytometry. The results were expressed in absolute numbers of migrating cells.

Statistical Analysis

Statistical evaluation of the results between diabetic and non-diabetic mice was carried out by unpaired T test (GraphPad Prism 4.0 software). Results are given as mean values (\pm SE) and *p* values less than 0.05 were considered to be statistically significant.

RESULTS

Thymic atrophy is correlated with loss of thymocytes in type-1 diabetes model

An intense decrease of the thymus relative weight in diabetic group was observed when compared to the control group (fig. 1A). This atrophy was also accompanied by changes in the thymus histological pattern. Cortical and medullar regions remained well delimited in control mice, but this delimitation was not found in diabetic mice like if the cortex, which was populated by double-positive (DP) immature T cell ($CD4^+CD8^+$), had been abrogated (fig. 1B). In fact, when thymocyte subpopulations were evaluated by flow cytometry analyses the absolute and relative numbers of DP cells in diabetic group were lower when compared with controls (fig. 1C and D). It should be pointed out that, the drop in DP absolute numbers was more expressive than that observed in other subpopulations. However, single-positive ($CD4^+CD8^-$ / $CD4^-CD8^+$) and double-negative ($CD4^-CD8^-$ / $CD4^+CD8^-$) subpopulations also had an expressive drop in absolute numbers when compared

with control group (fig. 1D). The relative numbers of such subpopulations increased due to changes in the ratio among subpopulations caused by reduced percentage numbers of DP cells.

We believe that thymic atrophy and histological changes observed here could be associated to loss of thymocyte subpopulations, mainly DP cells.

Enhanced density of thymic ECM elements in type-1 diabetes model

The ECM ligands, laminin and fibronectin, which are close associated with T cell maturation, were evaluated (Fig. 2). The thymuses from control group presented a normal pattern of distribution of ECM molecules being observed in septa, basal membrane of thymic capsule, perivascular spaces and medullary region (Fig. 2A right and left). However, an altered distribution and density of laminin was observed in thymuses from diabetes group. As the thymic regions are not delimited in diabetic thymuses, a strong labeling was found in the entire organ, mainly in the capsule and perivascular spaces (fig. 2A left), as well as the density was increased as compared with controls (fig. 2B left). It is important to note, however, that the increased density of laminin observed in diabetic mice not necessarily represents an increase of the expression, because the control group presents very well delimited regions with different patterns of distribution. No significant alterations between control and diabetes group were found for fibronectin labeling density (fig. 2A and 2B right).

Decreased expression of ECM receptors in type-1 diabetes model

The expression of the VLA4 (CD49d/CD29), an integrin-type fibronectin receptor, parallels with fibronectin density, i.e., with no alterations very well recognized. In diabetes

mice, the relative numbers of VLA4⁺ cells and the membrane density of the molecules, ascertained by the mean fluorescence intensity (MFI), have showed to be down modulated when examining the total thymocytes, CD8⁺ and DN subpopulations (fig. 3A and D).

The expression of the other integrin-type fibronectin receptor, the molecule VLA5 (CD49e/CD29) showed to be lower than VLA4 for both MIF and relative numbers when diabetic and control mice were compared. The subpopulations CD4⁺, DP and DN were the most affected (fig. 3B and 3E).

The expression of the VLA6 laminin receptor (CD49f/CD29) was unexpectedly found to be decreased in thymuses from diabetic mice in spite of the laminin density to be enhanced. The MFI values dropped in all subpopulations and, consequently, in the total thymocyte numbers (fig. 3C). The relative numbers of VLA6⁺ cells was also decreased, mainly in DN thymocytes (fig. 3F).

Taking into account the severe thymocyte depletion found in diabetes group and showed in figure 1D, it is expected that the absolute numbers of cells expressing ECM receptors were reduced in all subpopulations when compared to the controls.

Chemokines and chemokine receptors: modulation target in the thymus

We analyzed two of the most important chemokines of the thymic microenvironment, CCL25 and CXCL12, and their respective receptors, CCR9 and CXCR4. Both pairs have a fundamental role in intrathymic migration and thymocyte maturation. Our results demonstrated intense decrease in the expression of these chemokines in diabetic-mice thymic microenvironment. It was found a decrease of a 9-fold for CCL25 (fig. 4A) and a 4-fold for CXCL12 (fig. 4B).

The relative and absolute numbers of positive cells and the MFI of chemokine receptors in thymocytes were next evaluated. For CCR9 molecules, the diabetic group showed reduction of relative and absolute numbers of positive cells that was accompanied by reduction of membrane density (fig. 4C and D). However, in spite of the decreased expression of CXCL12, the expression of CXCR4 molecules did not drop on cells. The drop of such receptor seen when the absolute numbers of CXCR4⁺ cells are analyzed is only apparent (fig. 4E), because when the relative numbers of positive cells and the MFI are examined one can observe an increase of CXCR4 expression (fig. 4F). We conjecture that other factors could be modulating the expression of such receptor, and not only its ligand.

No significant alteration in thymocyte migration in type-1 diabetes model

Next, we evaluated possible changes upon thymocyte migration toward different stimuli (ECM molecules and chemokines) and the results are shown in Figure 5A. Taking into account the decrease of VLAs⁺ thymocytes observed in diabetic mice, the migration toward fibronectin and laminin was not found to be decreased when compared to control thymocytes. When transwell chambers were coated with CXCL12, no difference was observed between control and diabetes-group, although an increase in the expression of its receptor (CXCR4) has been observed in thymocytes from diabetic mice. Similar results were obtained when CCL25 was applied to the chamber, but the thymocytes migrated less than CXCL12-driven migration. When fibronectin or laminin and CXCL12 were used together, the migration index was higher than that observed when these molecules were used alone. However, the combination of CCL25 and fibronectin or laminin resulted in the

same migration levels that were seen when thymocyte migration was driven by each molecule.

Due to the fact that no statistically significant difference was observed in the *in vitro* migratory capacity of thymocytes from diabetic-mice, we decided to evaluate the T cell subpopulations in the periphery. Except to the CD8⁺ subpopulation, no alteration was observed in the spleen obtained from diabetes group (fig. 5B). We also did not find any difference in weight and cellularity between control and diabetic groups (data not shown). To sum up, thymocyte migration to the periphery is not very affected under diabetic condition, but the possibility that *in vivo* intrathymic migration is altered because of changes in the microenvironment during the disease cannot be discarded.

DISCUSSION

Type1 diabetes is a very complex syndrome and its pathogenesis is clearly understood today. However, its immune consequences still remain unclear. Studies on T cell maturation are essential for the knowledge of immune response in diabetic patients, and in this context, our data have a significant role.

The bulk of results presented herein demonstrated that our diabetes experimental model provokes deep changes in the thymus such as intense thymic atrophy and histological disorganization entailing significant consequences for T cell development. Both the severe thymic atrophy and the massive loss of DP cells have been already seen in other diseases, mainly infectious diseases [24, 25]. In experimental diabetes using different models similar results were also found [17, 18].

As described before, the combined role for extracellular matrix and chemokines in intrathymic migration is essential for appropriate thymocyte maturation [4].

We found many changes in intrathymic microenvironment suggesting strong evidences about T cell abnormal maturation. We have shown alterations in ECM elements and receptors as well as in chemokines and their receptors. In the NOD mice, an useful type1 diabetes model, we found an increase of CXCL12 and fibronectin co-expression, besides an altered migratory activity [20]. The CXCL12 and fibronectin co-expression is due to the binding of these two molecules and an enhanced fibronectin expression favors CXCL12 sequestration and prevents chemokine degradation [23]. Otherwise, in the alloxan-induced diabetes model we showed no alterations in fibronectin density and intense CXCL12 decrease but CXCR4 expression was not down regulated. The presence of CXCL12 secreted by TECs is fundamental for DN thymocyte migration from the cortical-medullar junction to the subcapsular region where these cells become DP and start CCR9 expression enabling them to migrate towards the medulla [1, 26]. In our model, both CCR9 and its ligand (CCL25) decreased and this fact may alter intrathymic migration and T cell maturation, leading as a consequence to a novel histological reorganization of thymus. Interestingly, we showed a decreased VLA-5 expression in alloxan-induced diabetes mice and similar result has been already observed in NOD mouse thymocytes [19, 27]. This

decrease of VLA-5 could alter the fibronectin binding and consequently the intrathymic migration. Furthermore, the other fibronectin receptor, VLA-4, also presented a decrease in relative numbers and fluorescence intensity, although the VLA-5 alterations have been more evident. Despite VLA-6 also had dropped, the laminin density stain had a significant increase in diabetic mice. Laminin plays an important role in thymocyte migration and high levels of this molecule are connected with higher migration rates [28, 29]. However, we did not find significant changes in the *ex-vivo* transmigration assay using laminin or laminin plus CXCL12 for membrane coating, as it has been already seen by other studies in different thymic atrophy models.

In a diabetic condition there are many hormonal alterations that could influence the thymus microenvironment. However, few studies in the literature suggest that the expression of laminin or other ECM elements are controlled by the same hormones [28-30]. Although we have not measured intrathymic migration in this study, our results suggest that changes in ECM do alter intrathymic migration with important consequences for T cell maturation.

DP thymocytes, the most affected subpopulation in our study, are found in the cortical region and its loss in thymus atrophy has been usually connected with a premature cell release to the periphery [23,31]. However, in our model, we did not find significant changes in the subpopulation ratio in spleen or in *ex-vivo* migration pattern. Hence, we believe that the atrophy is due to a cortical loss, but the cause of such loss is much probably linked to a DP massive apoptosis followed by an abnormal maturation than to thymocyte premature release to the periphery.

Here, we did not investigate apoptosis in particular, but there are evidences that such phenomenon was enhanced in our study. Furthermore, CXCL12 and CCR9 are

considered anti-apoptotic molecules [26] and interestingly, both molecules showed intense decrease here. Moreover, it is important to stress the close relation among hormones, diabetes and thymus. Leptin, an adipocyte-derived hormone, is controlled by glucose, insulin, glucocorticoids and cytokines [32]. *In vivo* insulin has a stimulatory effect on human and rodent leptin [5,33]. In diabetes condition, in which insulin is abrogated, the leptin decreases and some studies associate the leptin decrease with thymus atrophy [4-6, 32].

In conclusion, our study characterized the thymus atrophy in alloxan-induced diabetes mice demonstrating that this model presents significant alteration in thymus microenvironment and in thymocyte subpopulations. Our study also offers insights and tools for T cell maturation and endocrinal influences studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

We sincerely thank Ana Leda Longhini from Centro Integrado de Pesquisas Onco-hematológicas na Infância (CIPOI/UNICAMP) and Marcos C. Meneghetti for their

generous assistance. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) according to grant number #04/03599-1. P.R.A.N. was a recipient of a doctoral fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/ #14229/2005-1) and State University of Campinas (UNICAMP).

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

REFERENCES

- [1] H.T. Petrie, J.C. Zúñiga-Pflücker, Zoned out: Functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu. Rev. Immunol.* 25 (2007) 649-679.
- [2] M. Ciofani, J.C. Zúñiga-Pflücker, The thymus as an inductive site for T Lymphopoiesis. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 23 (2007) 463-493.
- [3] Y. Takahama, Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat. Rev. Immunol.* 6 (2006) 127-35.
- [4] W. Savino, D.A. Mendes-Da-Cruz, S. Smaniotto, E. Silva-Monteiro, D.M. Villa-Verde, Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *J. Leukoc. Biol.* 75 (2004) 951-61.
- [5] W. Savino, M. Dardenne, L.A. Velloso, S.D. Silva-Barbosa, The thymus is a common target in malnutrition and infection. *Br. J. Nutr.* 98 (2007) S11-6.
- [6] E. Bernotiene, G. Palmer, C. Gabay, The role of leptin in innate and adaptive immune responses. *Arthritis. Res. Ther.* 8 (2006) 217.
- [7] N. Mito, H. Yoshino, T. Hosoda, K. Sato, Analysis of the effect of leptin on immune function in vivo using diet-induced obese mice. *J. Endocrinol.* 180 (2004) 167-73.
- [8] V.F. Carvalho, E.O. Barreto, B.L. Diaz, M.F. Serra, V. Azevedo, R.S. Cordeiro, M.A. Martins, P.M. Silva, Systemic anaphylaxis is prevented in alloxan-diabetic rats by a mechanism dependent on glucocorticoids. *Eur. J. Pharmacol.* 472 (2003) 221-7.
- [9] T.C. Alba-Loureiro, C.D. Munhoz, J.O. Martins, G.A. Cerchiaro, C. Scavone, R. Curi, P. Sannomiya, Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40 (2007) 1037-44.
- [10] T. Hirsch, M. Spielmann, B. Zuhaili, T. Koehler, M. Fossum, H.U. Steinau, F. Yao, L. Steinstraesser, A.B. Onderdonk, E. Eriksson, Enhanced susceptibility to infections in a diabetic wound healing model. *BMC. Surg.* 8 (2008) 5.

- [11] L.M. Muller, K.J. Gorter, E. Hak, W.L. Goudzwaard, F.G. Schellevis, A.I. Hoepelman, G.E. Rutten, Increased risk of common infections in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Clin. Infect. Dis.* 41 (2005) 281-8.
- [12] T. Benfield, J.S. Jensen, B.G. Nordestgaard, Influence of diabetes and hyperglycaemia on infectious disease hospitalisation and outcome. *Diabetologia.* 50 (2007) 549-54.
- [13] T. Tabata, Y. Okuno, S. Fujii, S. Kimura, Y. Kinoshita, Maturation impairment of thymic lymphocytes in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Cell. Immunol.* 89 (1984) 250-8.
- [14] M. Delamaire, D. Maugendre, M. Moreno, M.C. Le Goff, H. Allannic, B. Genetet, Impaired leucocyte functions in diabetic patients. *Diabet. Med.* 14 (1997) 29-34.
- [15] D.C. Thomas, R.J. Mellanby, J.M. Phillips, A. Cooke, An early age-related increase in the frequency of CD4⁺ Foxp3⁺ cells in BDC2.5NOD mice. *Immunology.* 121 (2007) 565-76.
- [16] X. Chen, L.H. Makala, Y. Jin, D. Hopkins, A. Muir, N. Garge, R.H. Podolsky, J.X. She, Type 1 diabetes patients have significantly lower frequency of plasmacytoid dendritic cells in the peripheral blood. *Clin. Immunol.* 129 (2008) 413-8.
- [17] E.O. Barreto, I. Riederer, A.C. Arantes, V.F. Carvalho, F.A. Farias-Filho, R.S. Cordeiro, M.A. Martins, W. Savino, P.M. e Silva, Thymus involution in alloxan diabetes: analysis of mast cells. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 100 (2005) 127-30.
- [18] C. Elmas, D. Erdogan, G. Take, C. Ozogul, A. Nacar, M. Koksak, Ultrastructure of the thymus in diabetes mellitus and starvation. *Adv. Ther.* 25 (2008) 67-76.
- [19] J.Y. Park, A.Y. Chong, E.K. Cochran, D.E. Kleiner, M.J. Haller, D.A. Schatz, P. Gorden, Type 1 diabetes associated with acquired generalized lipodystrophy and insulin

resistance: the effect of long-term leptin therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93 (2008) 26-31.

[20] D.A. Mendes-da-Cruz, S. Smaniotto, A.C. Keller, M. Dardenne, W. Savino, Multivectorial abnormal cell migration in the NOD mouse thymus. *J. Immunol.* 180 (2008) 4639-47.

[21] T.J. Collins, ImageJ for microscopy. *Biotechniques.* 43 (2007) 25-30.

[22] L. Overbergh, A. Giulietti, D. Valckx, R. Decallonne, R. Bouillon, C. Mathieu, The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J. Biomol. Tech.* 14 (2003) 33-43.

[23] D.A. Mendes-da-Cruz, J.S. Silva, V. Cotta-de-Almeida, W. Savino, Altered thymocyte migration during experimental acute *Trypanosoma cruzi* infection: combined role of fibronectin and the chemokines CXCL12 and CCL4. *Eur. J. Immunol.* 36 (2006) 1486-93.

[24] W. Savino, The thymus is a common target organ in infectious diseases. *PLoS Pathog.* 2 (2006) 62.

[25] C.F. Andrade, J. Gameiro, P.R. Nagib, B.O. Carvalho, R.L. Talaisys, F.T. Costa, L. Verinaud, Thymic alterations in *Plasmodium berghei*-infected mice. *Cell. Immunol.* 253 (2008) 1-4.

[26] S.B. Geutskens, D.A. Mendes-da-Cruz, M. Dardenne, W. Savino, Fibronectin receptor defects in NOD mouse leucocytes: possible consequences for type 1 diabetes. *Scand. J. Immunol.* 60 (2004) 30-38.

[27] W. Kiess, M. Anil, W.F. Blum, P. Englaro, A. Juul, A. Attanasio, J. Dötsch, W. Rascher, Serum leptin levels in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus in relation to metabolic control and body mass index. *Eur. J. Endocrinol.* 138 (1998) 501-509.

- [28] J.S.P. Ocampo, J.M. Brito, E. Corrêa-de-Santana, R. Borojevic, D.M.S. Villa-Verde, W. Savino, Laminin-211 controls thymocyte-thymic epithelial cell interactions. 254 (2008) 1-9.
- [29] S. Smaniotto, V. Melo-Coelho, D.M.S. Villa-Verde, J.-M. Pléau, M.-C. Postel-Vinay, M. Dardenne, W. Savino. Growth hormone modulates thymocyte development *in vivo* through a combined action of laminin and CXC chemokine ligand 12. Endocrinol. 146 (2005) 3005-3017.
- [30] V. Cotta-de-Almeida, A. Bonomo, D.A. Mendes-da-Cruz, I. Riederer, J. De Meis, K.R. Lima-Quaresma, A. Vieira-de-Abreu, D.M. Villa-Verde, W. Savino, Trypanosoma cruzi infection modulates intrathymic contents of extracellular matrix ligands and receptors and alters thymocyte migration. Eur. J. Immunol. 33 (2003) 2439-48.
- [31] A.L. Gruver, G.D. Sempowski, Cytokines, leptin, and stress-induced thymic atrophy. J. Leukoc. Biol. 84 (2008) 915-23.

Figure 1. *A*, Reduction in thymus/body weight ratio in diabetic mice as compared to control ones. *B*, Note that the cortico-medullar delimitation in the thymus from diabetic mice was lost, as compared to control mice (Haematoxylin-eosin staining, x 100). *C*, Change in the relative numbers of thymocyte from diabetic mice, with a more pronounced decrease in double positive subpopulation (DP). *D*, Decrease in the absolute numbers of cells in the thymus from diabetic mice. All thymocyte subpopulations are diminished, mainly DP cells. Results are expressed as mean \pm SE for at least five animals.* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$.

Figure 2. Extracellular matrix density in the thymus from control and diabetic mice. *A*, Immunofluorescence staining shows enhanced density of laminin in the thymus from diabetic mice after 72 hours of diabetes induction. No alteration was observed to fibronectin staining as compared with control (Original magnification, x 100). *B*, The bottom graphics correspond to quantitative analysis of selected microscopic fields of the thymus from control and diabetic mice in terms of laminin (left) and fibronectin (right), with the results expressed in fluorescence intensity. Results are expressed as mean \pm SE for at least five animals. ** $p \leq 0.01$.

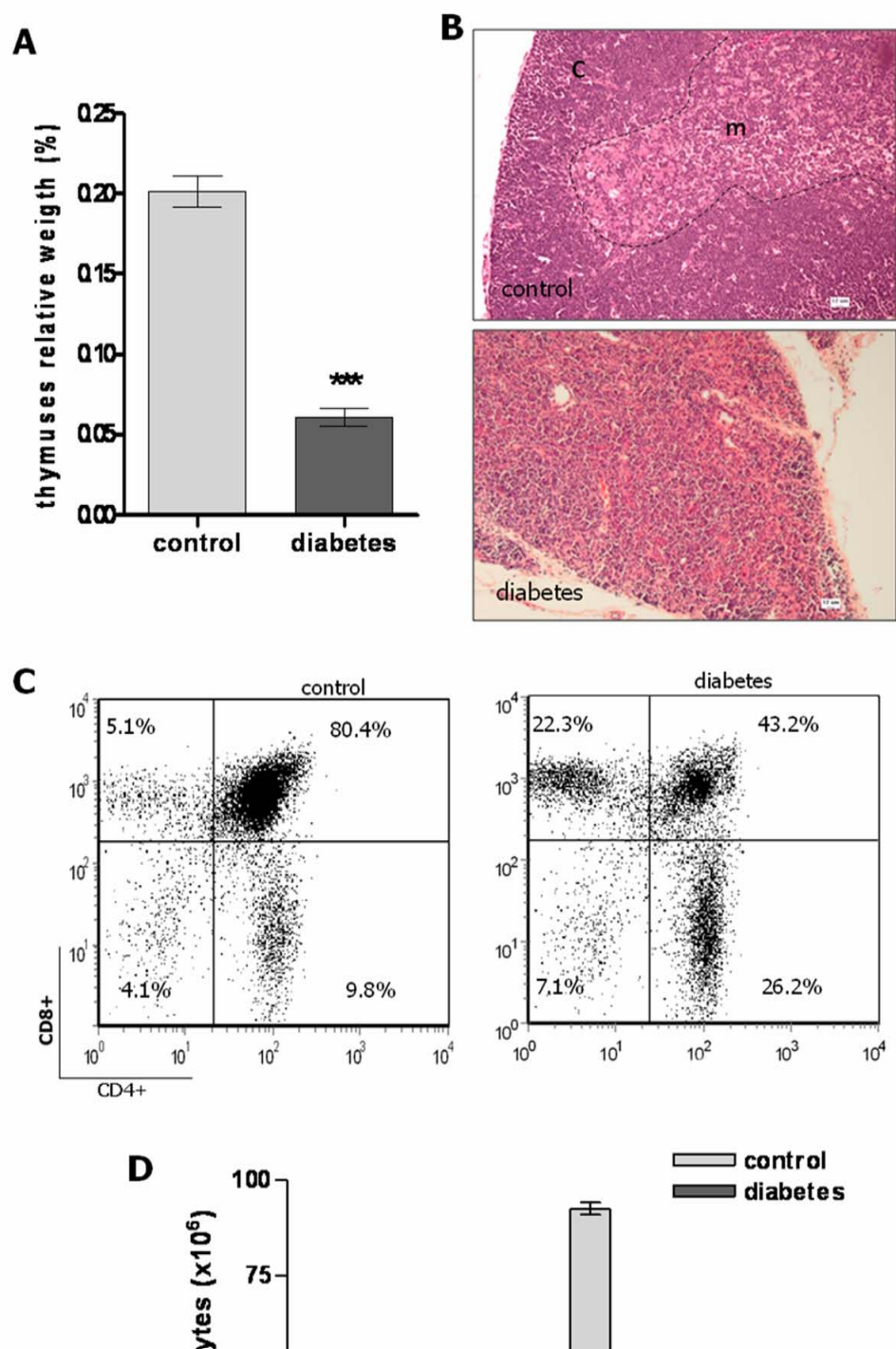
Figure 3. Altered expression of the fibronectin receptors VLA4 and VLA5 (CD49d and CD49e, respectively) and the laminin receptor VLA6 (CD49f) in total thymocytes and in

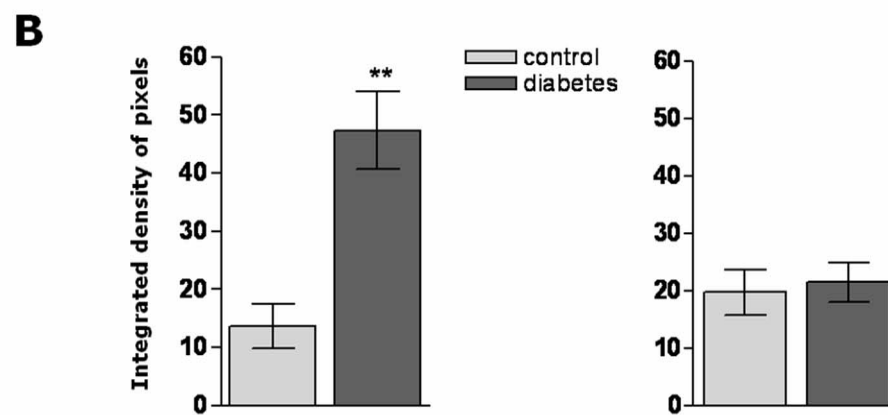
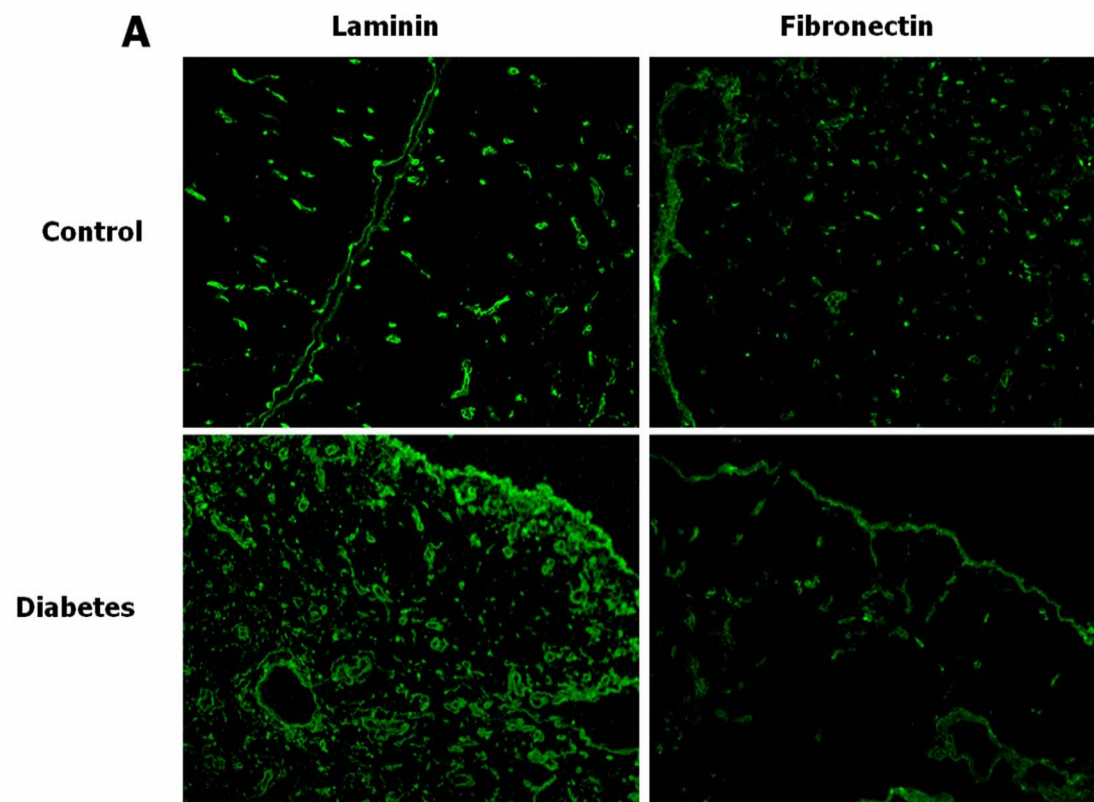
CD4/CD8 defined subpopulations (DN: CD4⁻CD8⁻, DP: CD4⁺CD8⁺, CD4: CD4⁺CD8⁻, CD8: CD4⁻CD8⁺) from control and diabetic mice. Full histograms correspond to unrelated immunoglobulin staining controls of normal and diabetic mice. Open gray and open black histograms correspond to normal and diabetic mice, respectively. *A*, *B*, and *C*, A decrease in the expression of the fibronectin receptors VLA-4 and VLA-5, and the laminin receptor VLA-6 in all subpopulations was seen in diabetic mice. *D*, *E*, and *F*, A decrease in percentages of thymocytes that express VLA4 (CD49d), VLA5 (CD49e) and VLA6 (CD49f) can be observed in diabetic mice, as compared with controls. Results are expressed as mean \pm SE for at least five animals. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$.

Figure 4. Changes in the expression of chemokines CCL25 and CXCL12, and their respective receptors, CCR9 and CXCR4. *A* and *B*, An intense decrease of specific messenger RNA for CCL25 and CXCL12 was observed in the thymus from diabetic mice. *C* and *D*, The absolute numbers of CCR9⁺ and CXCR4⁺ thymocytes was decreased in diabetic mice. *E* and *F*, Interestingly, the percentage of cells that express CCR9 was also diminished in thymocytes from diabetic, but the relative numbers of cells expressing CXCR4 and the expression of these molecules on cells were enhancement in diabetic group (open black *histograms*). Results are expressed as mean \pm SE for at least five animals. * $p \leq 0.05$, and *** $p \leq 0.001$.

Figure 5. Thymocyte migration shows no significant differences in diabetic mice. *A*, The graphic shows the total numbers of migrating cells through fibronectin (FN) or laminin

(LN), or toward CXCL12 or CCL25, as well as the chemokines combined with one given ECM element. *B*, The spleen from diabetic mice only showed an increase in the absolute numbers of TCD8⁺ subpopulation, as compared to controls (**B**). Results are expressed as mean \pm SE derived from five experiments, each one obtained by a pool of at least five control and seven diabetic mice. ** $p \leq 0.01$.





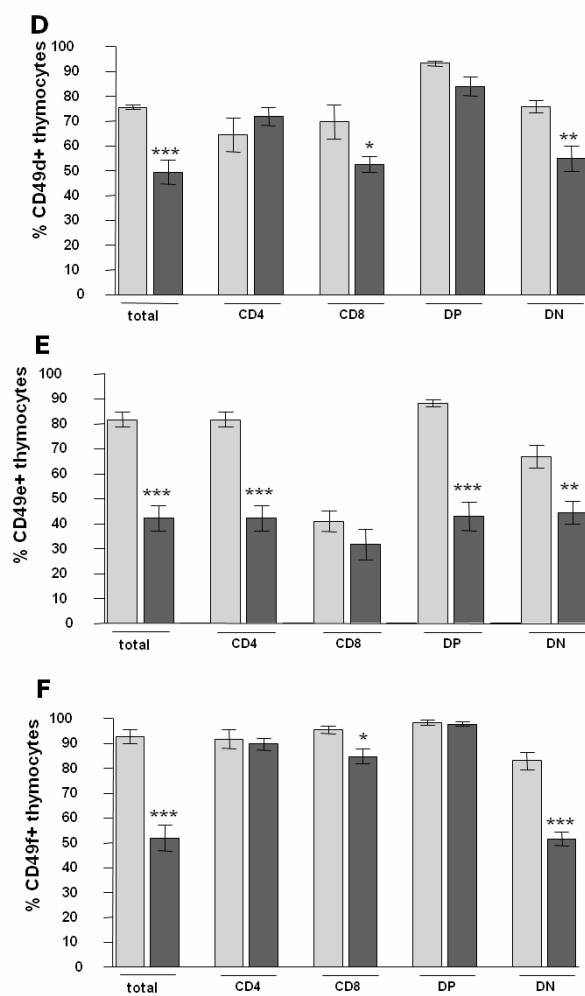
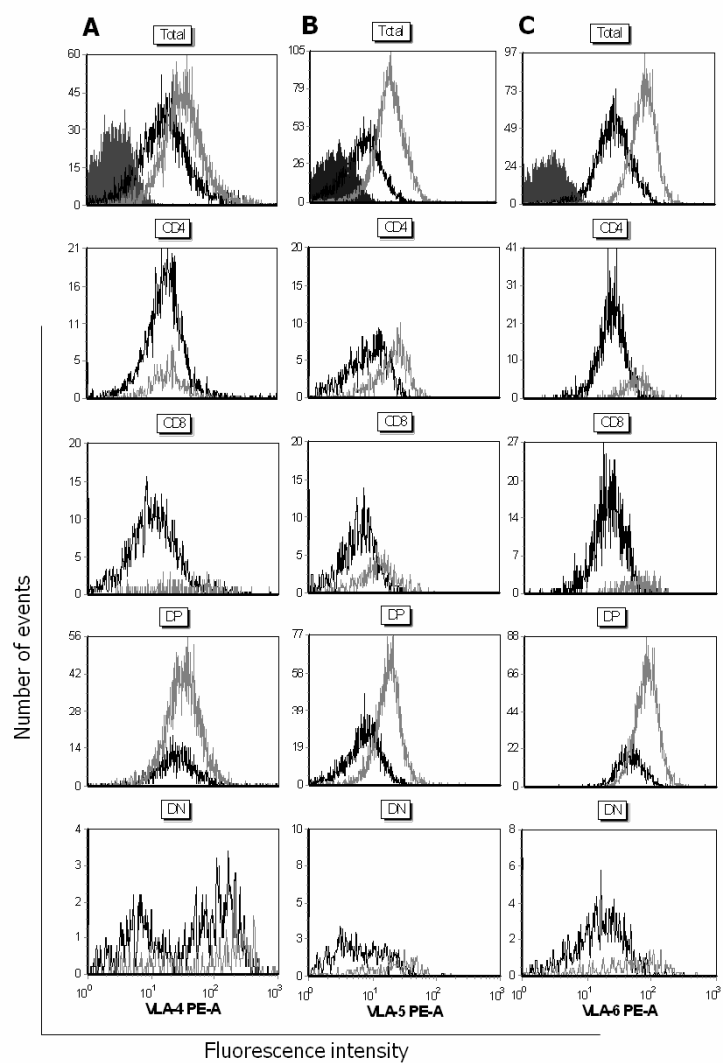
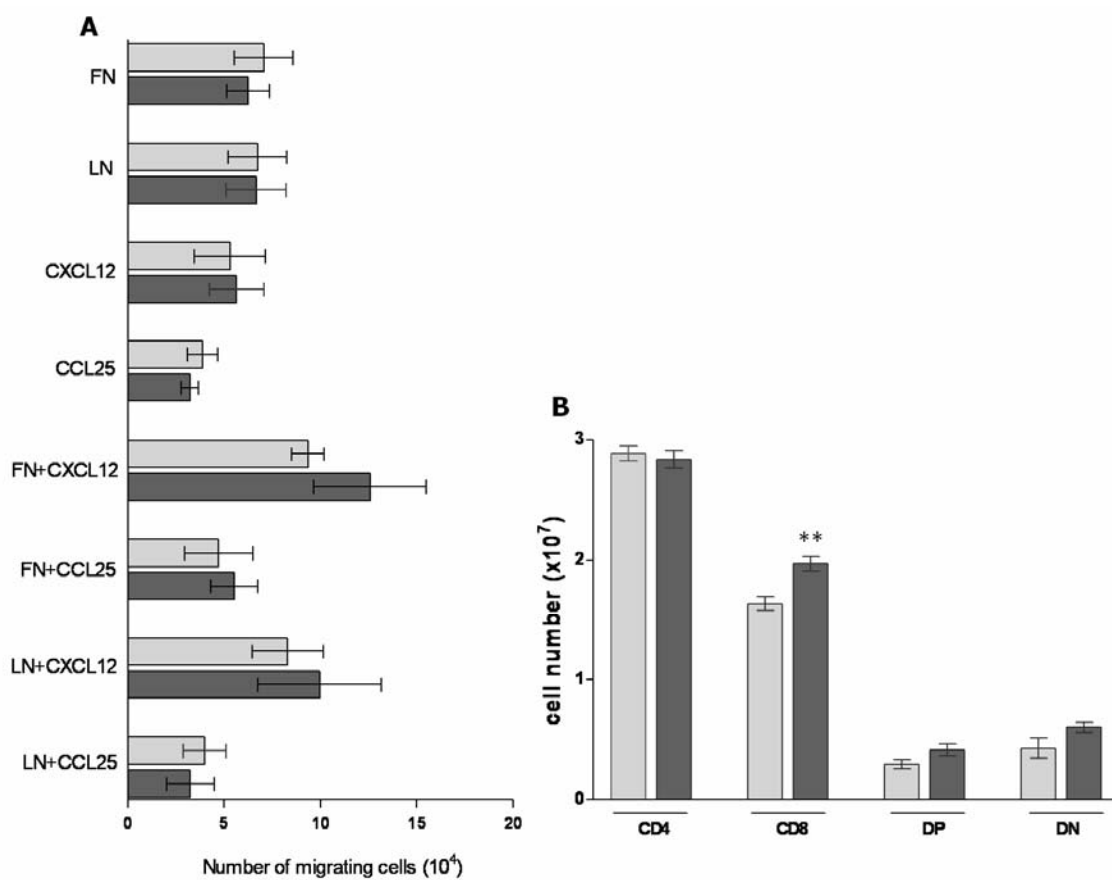
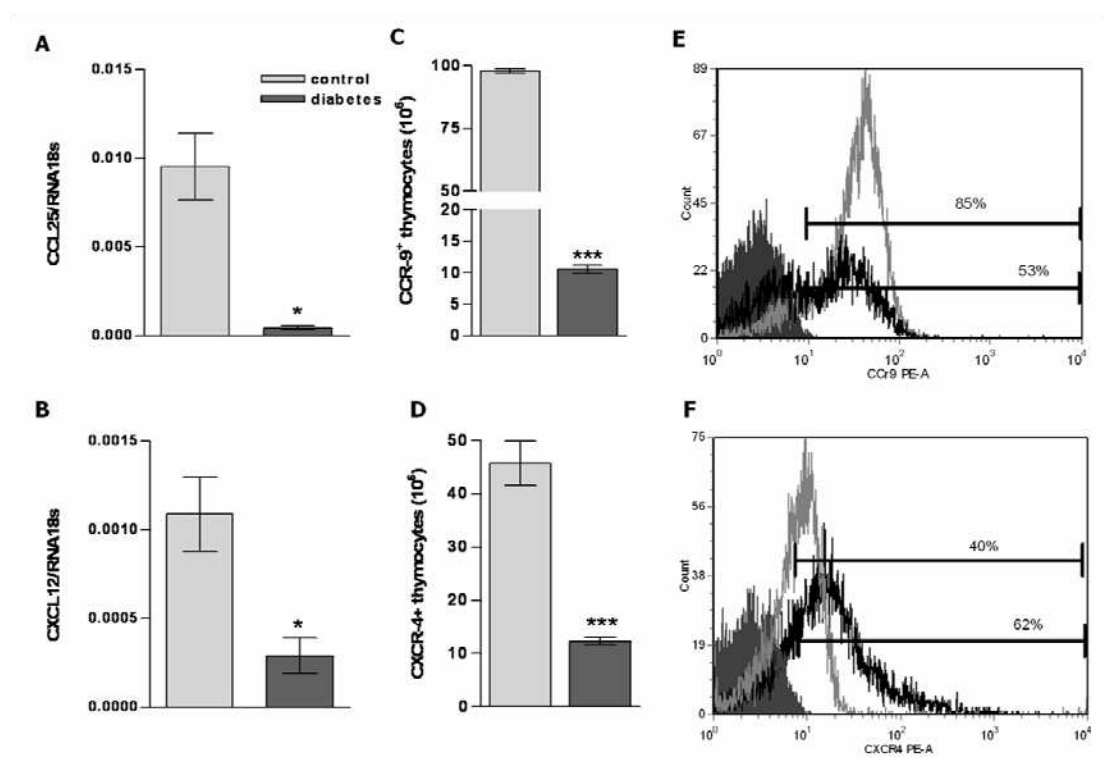


Figure 4



Artigo 4

Effect of Low Intensity Helium–Neon (HeNe) Laser Irradiation on Experimental Paracoccidioidomycotic Wound Healing Dynamics

Maria Carolina Ferreira^{1†}, Jacy Gameiro^{1†}, Patrícia Resende Alo Nagib^{1†}, Vânia Nieto Brito², Elza da Costa Cruz Vasconcellos³ and Liana Verinaud^{*1}

¹Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biology, State University at Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

²Lauro de Souza Lima Institute, Bauru, SP, Brazil

³Quantum Electronics Department, Institute of Physics Gleb Wataghin, State University at Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

Received 25 February 2008, accepted 10 June 2008, DOI: 10.1111/j.1751-1097.2008.00423.x

ABSTRACT

The effect of HeNe laser on the extracellular matrix deposition, chemokine expression and angiogenesis in experimental paracoccidioidomycotic lesions was investigated. At days 7, 8 and 9 postinfection the wound of each animal was treated with a 632.8 nm HeNe laser at a dose of 3 J cm^{-2} . At day 10 postinfection, the wounds were examined by using histologic and immunohistochemical methods. Results revealed that laser-treated lesions were lesser extensive than untreated ones, and composed mainly by macrophages and lymphocytes. High IL-1 β expression was shown in the untreated group whereas in laser-treated animals the expression was scarce. On the other hand, the expression of CXCL-10 was found to be reduced in untreated animals and quite intensive and well distributed in the laser-treated ones. Also, untreated lesions presented vascular endothelial growth factor (VEGF) in a small area near the center of the lesion and high immunoreactivity for hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), whereas laser-treated lesions expressed VEGF surrounding blood vessels and little immunoreactivity for HIF-1. Laser-treated lesions presented much more reticular fibers and collagen deposition when compared with the untreated lesion. Our results show that laser was efficient in minimizing the local effects observed in paracoccidioidomycosis and can be an efficient tool in the treatment of this infection, accelerating the healing process.

INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM), caused by the thermally dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, is the most widespread chronic progressive systemic mycosis in Central and South America. The disease afflicts mainly adult males engaged in agriculture and if not treated, it is almost always fatal. The infection is thought to take place first in the lungs and then may disseminate *via* the bloodstream and/or lymphatic routes to other tissues like the liver, nervous system, lymph nodes and skin (1,2). Cutaneous lesions are important

not only because opportunistic pathogens can pass over them provoking secondary infection but also because these lesions are extremely painful and sensitive, and remain active for months even after the beginning of treatment with antifungal drugs (3,4). Besides, current available treatment with antifungal drugs is lengthy and some of them affect structures common to fungi and humans causing side effects to patients.

These facts have led clinicians and scientists toward alternative therapies to reduce the discomfort evoked by lesions as well as to accelerate the cure of the wounds. In this sense, low level laser therapy, like that provided by the helium/neon (HeNe) laser irradiation, can represent an excellent tool as its ability to nonthermally and nondestructively change cell function is well known.

Wound healing is a complex and dynamic process of regenerating dermal and epidermal tissue that involves a series of events including inflammation, chemotaxis, granulation tissue formation, angiogenesis, epithelialization, collagen synthesis and tissue remodeling (5–7). Several animal experiments, as well as some human clinical studies, have shown the positive effects of HeNe laser therapy on specific indices of healing like acceleration of inflammation, augmentation of collagen synthesis, reduced healing time and diminution of wound size (8,9).

Our group was interested in investigating and understanding the wound healing response in paracoccidioidomycotic lesions after HeNe laser treatment. In an initial exploration, by using an experimental model of PCM, we showed that laser-treated mice presented reduction in footpad edema, faster cutaneous wound healing, confluent granulomas, diffuse and more loosely distributed immunolabeling for tumor necrosis factor- α and enhanced labeling of interferon- γ . Besides, no fungus was detected in treated animals whereas multiple viable fungi were seen in diffuse widespread granulomas obtained from nontreated mice footpads (10). Therefore, HeNe laser irradiation was very efficient in minimizing dermal infection produced by *P. brasiliensis* and in accelerating tissue repair, probably by influencing local cytokine production.

In the present study, we analyzed the action of HeNe laser therapy on the quantity and rate of extracellular matrix deposition as well as its possible stimulatory effect on

[†]M.C.F., J.G. and P.R.A.N. contributed equally to this article.

*Corresponding author email: verinaud@unicamp.br (Liana Verinaud)

© 2008 The Authors. Journal Compilation. The American Society of Photobiology 0031-8655/09

angiogenesis and chemokine production in cutaneous lesions of *P. brasiliensis*-infected mice.

MATERIAL AND METHODS

Animals. Specific pathogen-free BALB/c male mice, 6–8 weeks old, obtained from Centro Multi-Institucional de Bioterismo (CEMIB) were used. Animals were maintained in transparent acrylic plastic isolators under aseptic conditions throughout the study. Sterile water and food were provided *ad libitum*. All procedures were carried out in accordance with the guidelines proposed by the Brazilian Council on Animal Care (COBEA) and approved by the animal care and use committee of the State University of Campinas (UNICAMP).

Fungus. The highly virulent isolate Pb18 of *P. brasiliensis* was used in this study. It was grown in Fava Netto's medium at 36°C (yeast form) for 7 days.

Infection of mice. *Paracoccidioides brasiliensis* yeasts from 7-day-old cultures were collected. The fungal mass was suspended in PBS, mixed twice for 10 s on a Vortex-mixer, centrifuged and double-washed in PBS. The concentration was adjusted to 1×10^8 mL⁻¹ yeast cells based on hemocytometer counts. Viability was determined by Lactophenol cotton blue staining (11) and was higher than 90%. Twelve mice received 5×10^6 viable yeast forms of *P. brasiliensis* contained in 50 μ L buffer into the left back footpad, followed immediately by 50 μ L sterile saline into the opposite one. Animals were monitored daily for the progression of lesions which peaked at 7 days after inoculation.

Laser treatment. Seven days after *P. brasiliensis* infection, the lesions were clinically homogenous and the animals were separated into two groups of six mice each (experimental group and control group). On days 7, 8 and 9 following infection, the lesions of mice from the experimental group were irradiated with laser. The control group underwent the same handling, but was sham-irradiated. The laser used in this study was a HeNe laser with a measured output of 5 mW, which emits light in a collimated beam (diameter 4 mm) with a wavelength of 632.8 nm. The fluence per wound (previously determined by dose-response studies) was 3.0 J cm⁻² with a stimulation time of 75 s and without anesthesia or sedation. The laser beam was applied punctually on the center of the lesion without any screen. On day 10 after infection all animals were killed by CO₂ inhalation and the footpads removed for histologic and immunohistochemical analysis.

Histopathologic analysis. For microscopic histologic evaluation, foots were collected and fixed in 2% paraformaldehyde for 12 h at room temperature. The specimens were submitted to diafanization with xylene, dehydrated by graded ethanol, embedded in paraffin and cut in 5- μ m-thick sections. Histologic changes were evaluated on sections stained with hematoxylin and eosin (H&E). Additionally, Picrosirius red staining and Gomori's silver impregnation staining were performed for specific assessment of collective collagen and reticulin fiber deposition, respectively. One sample from each animal was examined. The analysis was performed blindly by three independent investigators who evaluated two to three slides, each containing three sections.

Immunohistochemistry. Vascular endothelial growth factor (VEGF), hypoxia inducible factor (HIF)-1 α , interferon- γ induced protein (IP)-10 (also known as CXCL-10) and interleukin (IL)-1 β was demonstrated by a standard avidin-biotin complex (ABC). Briefly, footpads were removed, postfixed and cryoprotected overnight in a solution of 30% sucrose in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Tissue was then embedded in optimal cutting temperature (OCT) compound (Tissue-Tek) over liquid nitrogen-cooled isopentane. Endogenous peroxidase activity was suppressed by 0.5% hydrogen peroxide in methanol. Sections were incubated with VEGF, HIF-1 α , IP-10 and IL-1 β specific monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), as primary antibody, overnight at 4°C, followed by biotinylated horse anti-rabbit (for VEGF, HIF-1 α , IL-1 β) or goat (for IP-10) serum as link antibody and the ABC (Vector Laboratories; Burlingame, CA) for 30 min at room temperature. All antibodies were used at dilutions that gave maximal specific reaction and minimal background reaction on frozen tissue specimens. Positive antigen-antibody reactions were observed by incubation with 3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride (DAB-H₂O₂) in 0.1 M imidazole, pH 7.1, for 10 min, followed by slight counterstaining with hematoxylin. Sections were mounted with

Permount. Immunohistochemical controls included sections stained with an irrelevant monoclonal antibody instead of the primary antibody, as well as sections in which either the primary and/or secondary antibodies were omitted from the staining procedure and were negative for any reactivity. The stained sections were semi-quantitatively evaluated in coded slides by three independent observers and registered as light or weak staining (+), strong staining (++), intense staining (+++) and very intense staining covering most of the cellular tissue and matrix (++++). One sample from each animal was examined and each observer evaluated two to three slides with three sections each one.

Statistical analysis. The degree of agreement between observers who evaluated the histopathologic and immunohistochemistry slides was evaluated by using the Fleiss' kappa statistic (12). The analysis was performed with Minitab15 statistical software (Minitab, State College, PA).

RESULTS

Light microscopic examination of the untreated lesions at 10 days of infection revealed very large lesions with intensive infiltration of polymorphonuclear leukocytes and a substantial necrotic center with draining of fibrinous exudate, cellular debris and viable fungi. The epidermic layer presented hyperplasia and a disorganized aspect with extensive loss due to suppuration (Fig. 1A,B). In mice that were exposed to three sessions of HeNe laser irradiation the lesion was less extensive, presenting rare viable fungi, and composed of macrophages and lymphocytes. No fibrinous exudate was noted in the center of the lesion and the epidermis acquired a normal histologic appearance (Fig. 1C,D).

The expression of IL-1 β , an important mediator of the inflammatory response that is involved in a variety of cellular activities, including cell proliferation, differentiation and apoptosis, was analyzed. High IL-1 β expression in the center of lesion and around blood vessels was shown in the untreated group (+++) (Fig. 2A). In laser-treated animals the expression of IL-1 β was scarce (+) (Fig. 2B).

The expression of IP-10/CXCL-10, a potent chemoattractant for activated T and NK cells, was found reduced in untreated animals (+) and quite intensive and well distributed in the laser-treated ones (+++) (Fig. 3A,B, respectively).

We analyzed VEGF, the most widely expressed and critical angiogenic growth factor that has a pivotal role in regulating angiogenesis. Although the untreated lesion showed expression of VEGF, it was predominantly detected in a small area near the center of the injury (+) (Fig. 4A). On the other hand, the laser-treated lesion demonstrated increased VEGF expression (++++) which was present in endothelial cells and uniformly distributed through the tissue (Fig. 4B).

As tissue hypoxia is considered a main signal that initiates and regulates angiogenic processes, we analyzed the expression of HIF-1. We observed that untreated lesions were highly reactive for the hypoxia marker (+++) (Fig. 5A); however, little immunoreactivity was detected in laser-treated lesions (+) (Fig. 5B).

The presence and distribution of collagen and reticulin in lesions obtained from untreated and laser-treated mice were also evaluated. Laser-treated lesions had much more collagen deposition (+++) compared with the untreated ones (+) (Fig. 6A,B). In addition, abundant collagen fibers were distributed in the conjunctive tissue surrounding the center of the laser-treated lesion.

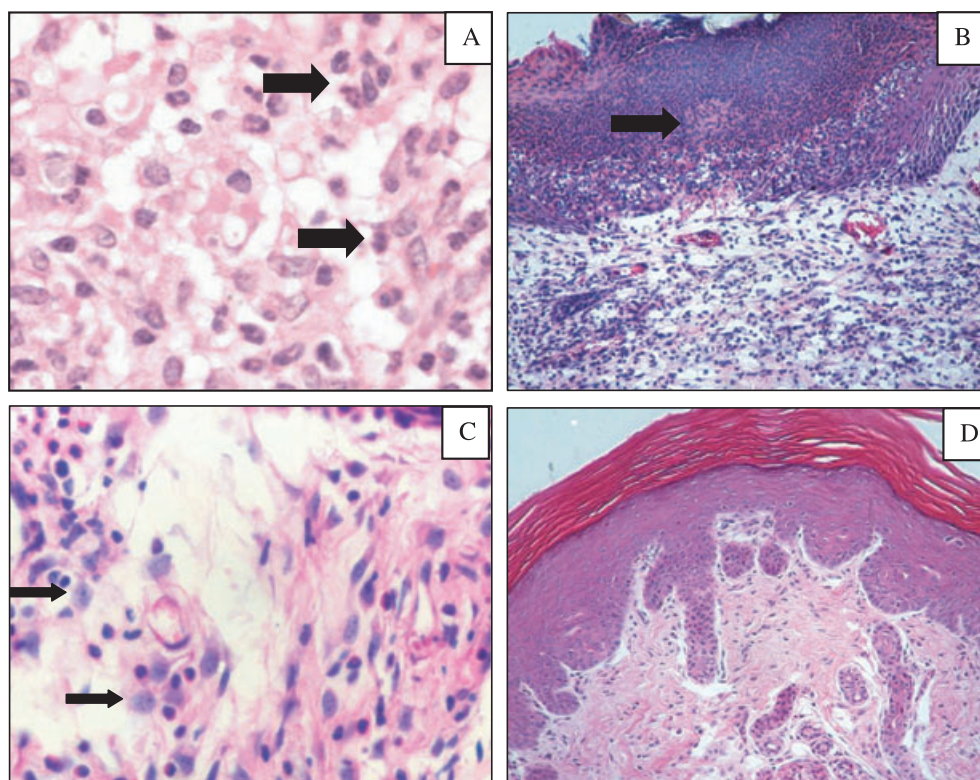


Figure 1. Histologic features of untreated (A, B) and laser-treated footpad lesions from *Paracoccidioides brasiliensis*-infected animals (C, D). Note the infiltration of a large number of neutrophils (arrows) in (A) and the disorganized aspect and suppuration (arrow) in (B). Note the prevalence of macrophages (arrows) in (C) and the epidermis with histologic normal appearance in (D) after three sessions of HeNe laser irradiation. H&E stain. The figures are representative of at least three experiments performed on different experimental days. Original magnification, $\times 400$ (A) and $\times 100$ (B–D).

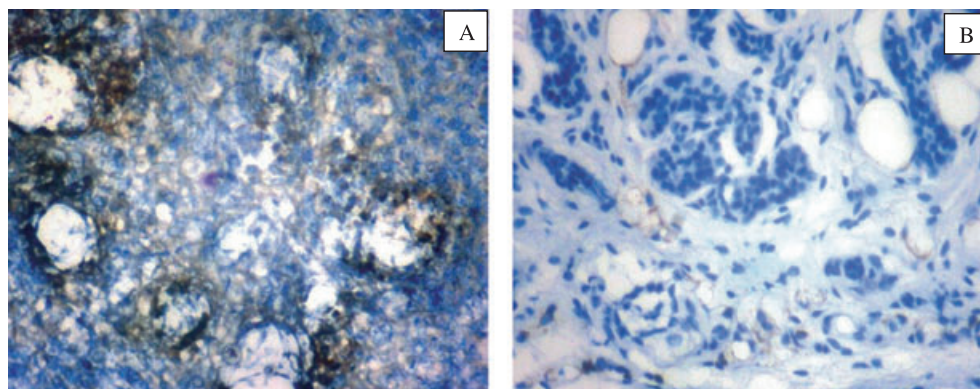


Figure 2. IL-1 β expression in footpad lesions from *Paracoccidioides brasiliensis*-infected animals. (A) Untreated lesions show high expression of this cytokine in the center of the lesion and around blood vessels. (B) Laser-treated lesions show scarce expression of IL-1 β . Original magnification, $\times 200$.

Differences among untreated and laser-treated groups were also observed in relation to reticular fiber deposition. In the laser-treated lesions there was a very obvious and progressive increase (++) in this matrix element along with changes in its pattern of distribution. The reticular fibers presented a regular distribution encircling the lesion and forming a framework. Fungi were only seen in the center of the injury (Fig. 6C). Untreated lesions showed scarce production of reticulin (+)

and the presence of numerous viable fungi widely distributed between the conjunctive tissue and muscular fibers. Also, reticular fibers were thin and present only in the border zone between the normal and wounded tissue (Fig. 6D).

The results of this study are given in summary form in Table 1. A substantial level of overall agreement between raters who evaluated histopathologic and immunohistochemistry slides was observed ($\kappa = 0.6785$).

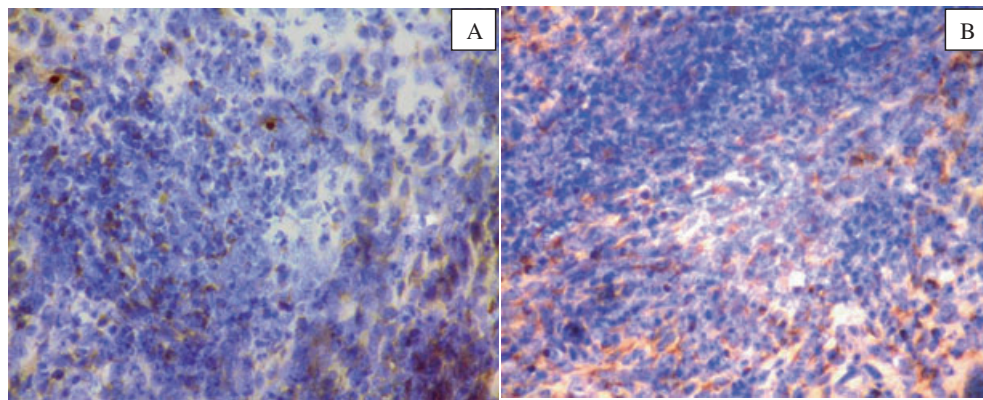


Figure 3. IP-10/CXCL-10 expression in footpad lesions from *Paracoccidioides brasiliensis*-infected animals. (A) Untreated lesions show reduced expression of this chemokine. (B) Laser-treated lesion show intensive and well-distributed expression of IP-10/CXCL-10. Original magnification, $\times 200$.

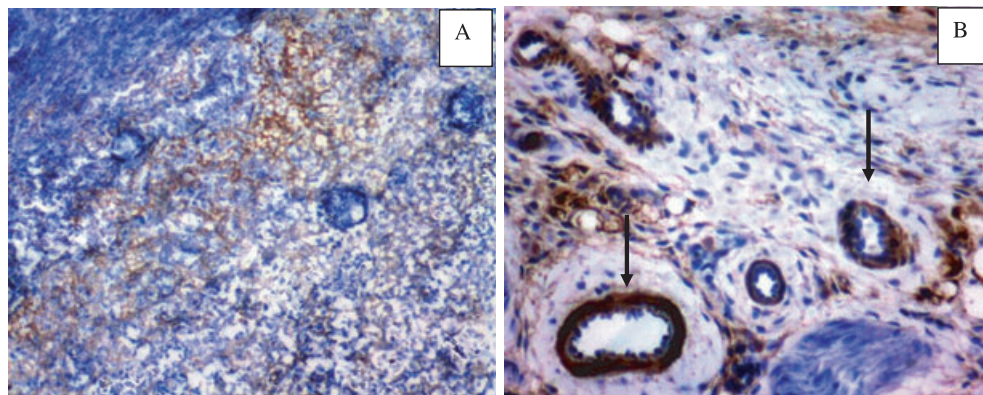


Figure 4. Immunolocalization of vascular endothelial growth factor (VEGF) in footpad lesions from *Paracoccidioides brasiliensis*-infected animals. Note that VEGF is predominantly expressed in a small area near the center of the lesion in untreated lesions (A) and surrounding blood vessels (arrows) in laser-treated lesions (B). Original magnification, $\times 200$.

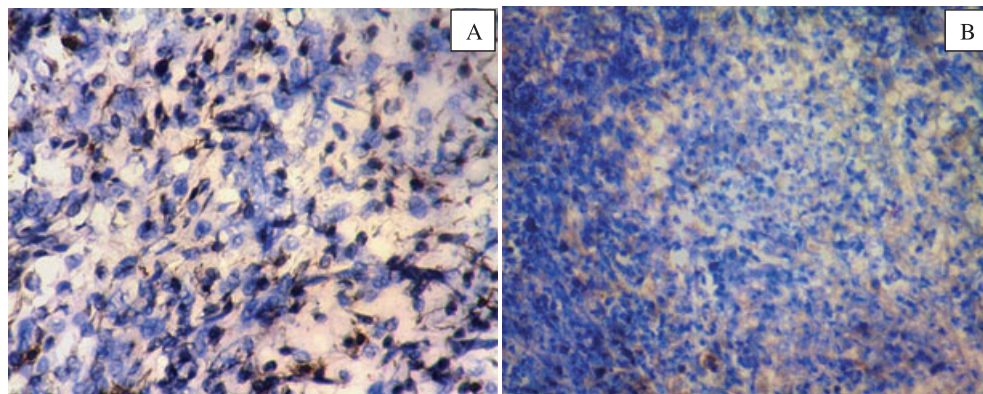


Figure 5. Immunohistochemical evidence of hypoxia in footpad lesions from *Paracoccidioides brasiliensis*-infected animals. (A) Untreated lesions show high immunoreactivity for hypoxia-inducible factor-1, whereas little immunoreactivity can be detected in laser-treated lesions (B). Original magnification, $\times 200$.

DISCUSSION

By using an experimental model of *P. brasiliensis* infection we demonstrated previously that laser irradiation was efficient in minimizing fungal infection dermal effects and in accelerating tissue repair (10). Now, we have extended our investigations

for observing the dynamic changes in paracoccidioidomycotic wound-healing process after HeNe laser treatment.

In our previous paper we observed that laser-treated lesions were less extensive than the untreated ones and presented no viable fungi. Furthermore, TNF- α staining was diffuse and more loosely distributed on tissues from laser-treated animals.

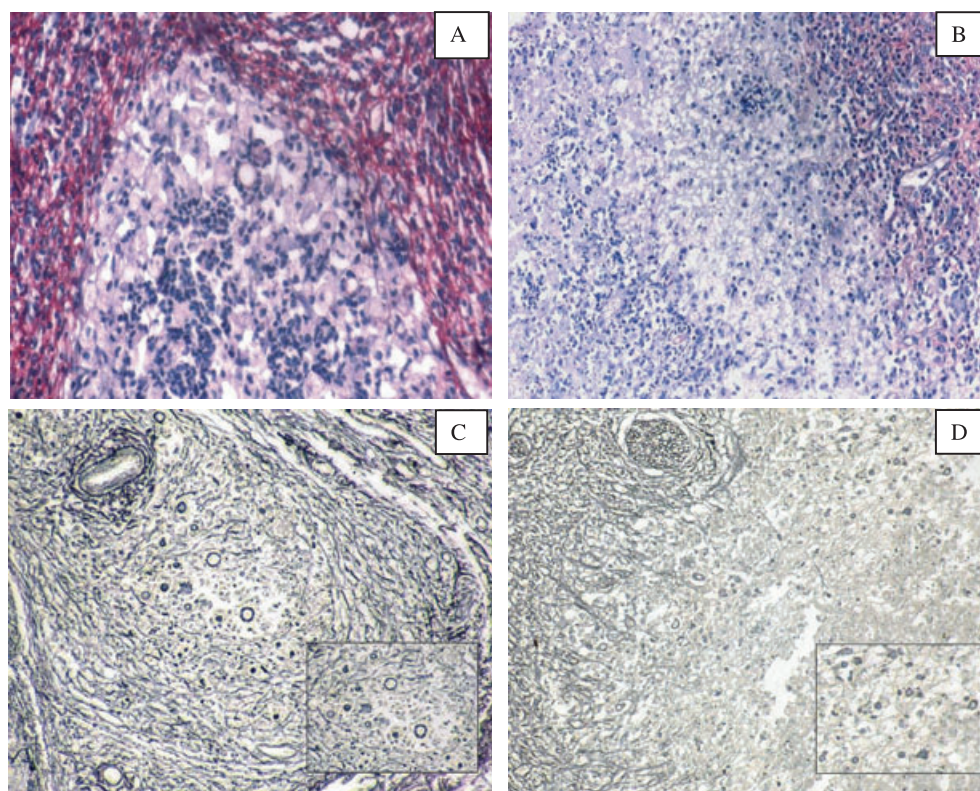


Figure 6. Extracellular matrix deposition in laser-treated (A, C) and untreated (B, D) footpad lesions from *Paracoccidioides brasiliensis*-infected animals. (A) Note that the laser-treated lesion presents much more collagen deposition when compared with the untreated one (B). (C) Compare the black staining framework of reticular fibers presented by a laser-treated lesion with the scarce production of reticulin in the untreated lesion (D). Details in (C) and (D) show the center of lesions with preserved fungal cells. The figures are representative of at least three experiments performed on different experimental days. Original magnification, $\times 200$ (A, B); $\times 100$ (C, D).

Table 1. Summary of the results of this study. Data represent the mean of scores given by three independent observers.

Markers	Groups	
	Untreated	Laser-treated
IL-1 β	+++	+
CXCL10	+	+++
VEGF	+	++++
HIF	+++	+
Collagen	+	+++
Reticulin fibers	+	++

IL-1 β = interleukin-1 β ; CXCL-10 = interferon- γ induced protein (IP)-10; VEGF = vascular endothelial growth factor; HIF = hypoxia inducible factor. (+) light or weak staining; (++) strong staining; (+++) intense staining; and (++++ very intense staining covering most of the cellular tissue and matrix (++++).

In the present study, we demonstrate that laser treatment accelerates wound repair *via* activation of a cascade involving a series of important molecules for the healing process.

First, we showed that laser-treated lesions were less extensive than the untreated ones and presented no viable fungi. Although the mechanism of biologic action by the HeNe laser is still being debated, it is known that, in order to interact with the living cell, light has to be absorbed by intracellular chromophores. According to the literature, superoxide dismutase (SOD), an efficient superoxide scavenging enzyme, is supposed to be one of the photoacceptors of the HeNe laser

radiation (13). The primary function of SODs is the deactivation of extremely toxic superoxide radical (O_2^-) by converting it into oxygen and hydrogen peroxide (potentially less reactive).

In tissues subjected to inflammation the consumption of molecular oxygen is enhanced, and superoxide radicals are overproduced. However, due to the pH of inflammatory exudates that is about 5.9, SOD is inactive. It has been proposed that one of the mechanisms of action of HeNe laser radiation is the photoreactivation of SOD by recovery of its copper and zinc bonds (14). As a result, superoxide concentration decreases in the region and damages caused to cells are minimized. Here, we observed that after three sessions of laser treatment the epidermis had acquired a normal histologic appearance and we suppose that this mechanism could be related to the reactivation of SOD. However, other experiments are still necessary to verify whether SOD is the main photoreceptor in our model.

Here, we also observed that the granuloma obtained from untreated animals presented abundant fibrinous exudate whereas the epidermis from laser-treated animals acquired a normal histologic appearance after three sessions of irradiation. Most probably, at the tissue level the laser accelerates the resolution of acute inflammation, which results in more rapid granulation and re-epithelialization of the tissue.

Fibrin, an insoluble protein formed from fibrinogen during normal clotting of blood, is one of the most important components of inflammatory exudates. It acts as a scaffold on

which tissues may subsequently be repaired and on which new capillaries can be constructed. However, the extent of blood clotting is limited so that it does not progress to undamaged vessels and the literature has shown that HeNe laser is very efficient in removing fibrin present in the lesions (15–17).

We then examined IL-1 β and CXCL-10 (formerly known as IP-10, interferon- γ -inducible protein), important cytokines involved in cellular migration to the injured tissues. IL-1 β , a proinflammatory cytokine secreted by several types of cells in response to inflammatory stimuli, has multiple biologic activities. IL-1 β up-regulates the expression of adhesion molecules on endothelial cells and leukocytes (18,19). Furthermore, IL-1 β induces the production of IL-8, which is a chemotactic and activating factor for neutrophils (20,21). The increased expression of IL-1 β in nonirradiated animals, observed in our study, makes evident the crucial role of this cytokine in neutrophil recruitment and in the composition of the inflammatory infiltrate presented by these animals. The prolonged permanence of these cell types may favor or contribute to the slow resolution of granuloma and scarring time observed in untreated lesions. In laser-treated animals, IL-1 β staining was scarce and lesions presented a small inflammatory infiltrate with other cellular types, mainly macrophages. In these groups, CXCL10 staining was intensive and well distributed in the tissue. CXCL10 is a cytokine belonging to the CXC chemokine family that is secreted by several cell types. Several roles have been attributed to CXCL10, such as chemoattraction for monocytes and T cells, promotion of T cell adhesion to endothelial cells, antitumor activity, inhibition of bone marrow colony formation and angiogenesis (22,23). Laser-treated lesions showed strong staining for CXCL10 compared to lesions of untreated mice and we suppose that this finding could explain the presence of macrophages in the lesion.

Paracoccidioidomycotic lesions—treated or not treated with laser—were also investigated for the expression of both VEGF, an important signaling protein involved in vasculogenesis, and for HIF-1 α , a heterodimeric transcription factor that reacts to hypoxic conditions and influences angiogenesis (24). VEGF expression is normally low in skin (25,26) but, during the first few days after tissue injury, VEGF expression is markedly induced and angiogenesis is initiated (27). Saaristo *et al.* (28) showed that VEGF significantly accelerates diabetic wound healing by inducing persistent angiogenesis and lymphangiogenesis, as well as recruitment of inflammatory cells. We observed that VEGF staining of the lesion was stronger in the irradiated group than that in the control group. Our results also showed that a much greater VEGF expression is localized surrounding blood vessels in laser-treated lesions than in untreated lesions. Interestingly, untreated lesions showed high immunoreactivity for HIF-1 α , whereas little immunoreactivity could be detected in laser-treated lesions. Although hypoxia is identified as an important trigger for transcription of angiogenic factors, it is probable that the severe, prolonged and widespread hypoxia observed in untreated lesions is able to impede the healing process to proceed at a normal rate. On the contrary, the laser radiation by eliminating tissue hypoxia could stimulate aerobic cell metabolism and accelerate tissue repair.

Alternatively, we can suppose that VEGF production in laser-treated lesions may be due to triggering mechanisms other than hypoxia. Frank *et al.* (29), for example, demonstrated that

several cytokines, including TNF- α , present in the wound bed also probably contribute to the induction of VEGF.

Following HeNe laser treatment, paracoccidioidomycotic lesions presented a significant increase in extracellular matrix component synthesis. Similar results were observed by other authors who also showed an accelerated production of collagen with laser photostimulation (30–33). A large body of evidence has suggested that laser radiation of low-power density is able to promote the proliferation and activation of fibroblasts. Recently, Hawkins and Abrahamse (34) showed that laser therapy at the adequate wavelength, intensity and dose had stimulatory effects on wounded fibroblasts with an increase in cell migration and cell proliferation while maintaining cell viability, but without causing additional stress or damage to the cells. The effects of laser irradiation on fibroblasts were also tested by *in vitro* studies and results showed that the treatment not only stimulates cell proliferation but also enhances the release of growth factors from fibroblasts (35,36). Besides the direct effect of laser on fibroblasts, the action of irradiation on cytokine production in the wound could also be implicated in collagen synthesis. In a previous paper we observed that TNF- α staining was diffuse and more loosely distributed on tissues from laser-treated animals. We speculate that the strong presence of TNF- α in untreated lesions can affect collagen synthesis and deposition at the wound-healing site. Evidence that TNF- α down-regulates collagen synthesis has been obtained from *in vivo* as well as *in vitro* studies (37–40). Obviously, much more research will be needed to elucidate the exact mechanisms of action of low-power laser irradiation at the cellular and molecular levels in this and other similar murine models.

In summary, our results collectively show that HeNe laser irradiation was efficient in minimizing the local effects caused by *P. brasiliensis* infection most probably by affecting the wound healing dynamics, producing changes in both inflammatory and proliferative phases of the tissue repair process. Such therapy may be of great benefit in the treatment of paracoccidioidomycotic lesions, accelerating the healing process, thereby reducing the discomfort and the pain to the patient.

Acknowledgements—This project was financially supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (grant numbers 05/55234-0 and 05/55233-3) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (grant number 470436/2007).

REFERENCES

1. Borges-Walmsley, M. I., D. Chen, X. Shu and A. R. Walmsley (2002) The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol.* **10**, 80–87.
2. Restrepo, A. (2000) Morphological aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* in lymph nodes: Implications for the prolonged latency of paracoccidioidomycosis? *Med. Mycol.* **38**, 317–322.
3. Lupi, O., S. K. Tying and M. R. McGinnis (2005) Tropical dermatology: Fungal tropical diseases. *J. Am. Acad. Dermatol.* **53**, 931–951.
4. Trent, J. T. and R. S. Kirsner (2003) Identifying and treating mycotic skin infections. *Adv. Skin Wound Care* **16**, 122–129.
5. Wong, T., J. A. McGrath and H. Navsaria (2007) The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *Br. J. Dermatol.* **156**, 1149–1155.

6. Darby, I. A. and T. D. Hewitson (2007) Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *Int. Rev. Cytol.* **257**, 143–147.
7. Romagnani, P., L. Lasagni, F. Annunziato, M. Serio and S. Romagnani (2004) CXC chemokines: The regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol.* **25**, 201–209.
8. Qadri, T., L. Miranda, J. Tunér and A. Gustafsson (2005) The short-term effects of low-level lasers as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. *J. Clin. Periodontol.* **32**, 714–719.
9. Safavi, S. M., B. Kazemi, M. Esmaili, A. Fallah, A. Modarresi and M. Mir (2007) Effects of low-level He-Ne laser irradiation on the gene expression of IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , TGF- β , bFGF, and PDGF in rat's gingiva. *Lasers Med. Sci.* **23**, 331–335.
10. Ferreira, M. C., V. N. Brito, J. Gameiro, M. R. Costa, E. C. Vasconcellos, M. A. Cruz-Hofling and L. Verinaud (2006) Effects of HeNe laser irradiation on experimental paracoccidioidomycotic lesions. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **84**, 141–149.
11. Sano, A., N. Kurite, K. Iabuki, R. Coelho, K. Takeo, K. Nishimura and M. Miyaji (1993) A comparative study of four different staining methods for estimation of live yeast form cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia* **124**, 157–161.
12. Fleiss, J. L. (1973) *Statistical Methods for Rates and Proportions*. Wiley, New York.
13. Klebanov, G. I. and A. Poltanov (2003) Primary and secondary molecular-cellular mechanisms behind laser therapy. *Laser Phys.* **20**, 1–14.
14. Vladimirov, Y. A., A. N. Osipov and G. I. Klebanov (2004) Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry (Mosc)* **69**, 81–90.
15. Azarova, V. S., M. F. Popova and S. H. G. Il'iasova (1990) Effects of autotransplantation of minced muscle tissue and subsequent laser therapy on recovery of the muscle injured by irradiation. *Biull. Eksp. Biol. Med.* **110**, 313–316.
16. Buliakova, N. V. (1989) Effect of helium-neon laser rays on the processes of postradiation recovery in the skeletal muscles of old rats. *Biull. Eksp. Biol. Med.* **107**, 345–347.
17. Buliakova, N. V., T. A. Telegina, S. H. G. Il'iasova, I. D. Bekhoev and V. S. Azarova (1992) Effects of helium-neon laser on regeneration capacity of skeletal muscles of adult guinea pigs. *Biull. Eksp. Biol. Med.* **113**, 411–414.
18. Pober, J. S., M. P. Bevilacqua, D. L. Mendrick, L. A. Lapierre, W. Fiers and M. A. Gimbrone, Jr (1986) Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, each independently induced biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. *J. Immunol.* **136**, 1680–1687.
19. Pohlman, T. H., K. A. Stanness, P. G. Beatty, H. D. Ochs and J. M. Harlan (1986) An endothelial cell surface factor(s) induced in vitro by lipopolysaccharide, interleukin 1, and tumor necrosis factor- α increases neutrophil adherence by a CDw18-dependent mechanism. *J. Immunol.* **136**, 4548–4553.
20. Matsushima, K., K. Morishita, T. Yoshimura, S. Lavu, Y. Kobayashi, W. Lew, E. Appella, H. F. Kung, E. J. Leonard and J. J. Oppenheim (1988) Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* **167**, 1883–1893.
21. Lindley, I., H. Aschauer, J. M. Siefert, C. Lam, W. Brunowsky, E. Kownatzki, M. Thelen, P. Peveri, B. Dewald, V. von Tscherner, A. Walz and M. Baggiolini (1988) Synthesis and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding monocyte-derived neutrophil-activating factor: Biological equivalence between natural and recombinant neutrophil-activating factor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **85**, 9199–9203.
22. Dufour, J. H., M. Dziejman, M. T. Liu, J. H. Leung, T. E. Lane and A. D. Luster (2002) IFN- γ -inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J. Immunol.* **168**, 3195–3204.
23. Angiolillo, A. L., C. Sgadari, D. D. Taub, F. Liao, J. M. Farber, S. Maheshwari, H. K. Kleinman, G. H. Reaman and G. Tosato (1995) Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis *in vivo*. *J. Exp. Med.* **182**, 155–162.
24. Detmar, M., L. F. Brown, B. Berse, R. W. Jackman, B. M. Elicker, H. F. Dvorak and K. P. Claffey (1997) Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. *J. Invest. Dermatol.* **108**, 263–268.
25. Detmar, M., L. F. Brown, K. P. Claffey, K. T. Yeo, O. Kocher, R. W. Jackman, B. Berse and H. F. Dvorak (1994) Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. *J. Exp. Med.* **180**, 11421–11446.
26. Brown, L. F., S. M. Olbricht, B. Berse, R. W. Jackman, G. Matsueda, K. A. Tognazzi, E. J. Manseau, H. F. Dvorak and L. van de Water (1995) Overexpression of vascular permeability factor (VPF/VEGF) and its endothelial cell receptors in delayed hypersensitivity skin reactions. *J. Immunol.* **154**, 2801–2807.
27. Brown, L. F., K. T. Yeo, B. Berse, T. K. Yeo, D. R. Senger, H. F. Dvorak and L. van de Water (1992) Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J. Exp. Med.* **176**, 1375–1379.
28. Saarto, A., T. Tammela, A. Farkkila, M. Karkkainen, E. Suominen, S. Yla-Herttuala and K. Alitalo (2006) Vascular endothelial growth factor-C accelerates diabetic wound healing. *Am. J. Pathol.* **169**, 1080–1087.
29. Frank, S., G. Hubner, G. Breier, M. T. Longaker, D. G. Greenhalgh and S. Werner (1995) Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes: Implications for normal and impaired wound healing. *J. Biol. Chem.* **270**, 12607–12613.
30. Reddy, G. K., L. Stehno-Bittel and C. S. Enwemeka (1998) Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. *Lasers Surg. Med.* **22**, 281–287.
31. Medrado, A. R., L. S. Pugliese, S. R. Reis and Z. A. Andrade (2003) Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. *Lasers Surg. Med.* **32**, 239–244.
32. Posten, W., D. A. Wrone, J. S. Dover, K. A. Arndt, S. Silapunt and M. Alam (2005) Low-level laser therapy for wound healing: Mechanism and efficacy. *Dermatol. Surg.* **31**, 334–340.
33. De Carvalho, P. T., N. Mazzer, F. A. dos Reis, A. C. Belchior and I. S. Silva (2006) Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. *Acta Cir. Bras.* **21**, 177–183.
34. Hawkins, D. H. and H. Abrahamse (2006) The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. *Lasers Surg. Med.* **38**, 74–83.
35. Yu, W., J. O. Naim and R. J. Lanzafame (1997) Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice. *Lasers Surg. Med.* **20**, 56–63.
36. Pereira, A. N., C. P. Eduardo, E. Matson and M. M. Marques (2002) Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg. Med.* **31**, 263–267.
37. Regan, M. C., S. J. Kirk, M. Hurson, M. Sodeyama, H. L. Wasserkug and A. Barbul (1993) Tumor necrosis factor- α inhibits *in vivo* collagen synthesis. *Surgery* **113**, 173–177.
38. Mori, R., T. Kondo, T. Ohshima, Y. Ishida and N. Mukaida (2002) Accelerated wound healing in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice with reduced leukocyte infiltration. *FASEB J.* **16**, 963–974.
39. Solis-Herruzo, J. A., D. A. Brenner and M. Chojkier (1998) Tumor necrosis factor α inhibits collagen gene transcription and collagen synthesis in cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **263**, 5841–5845.
40. Centrella, M., T. L. McCarthy and E. Canalis (1998) Tumor necrosis factor- α inhibits collagen synthesis and alkaline phosphatase activity independently of its effect on deoxyribonucleic acid synthesis in osteoblast-enriched bone cell cultures. *Endocrinology* **123**, 1442–1448.

Artigo 5

Effects of HeNe laser irradiation on experimental paracoccidioidomycotic lesions

Maria Carolina Ferreira^a, Vânia Nieto Brito^{a,b}, Jacy Gameiro^a,
Maria Renata Salles Nogueira Costa^b, Elza Costa Cruz Vasconcellos^c,
Maria Alice Cruz-Hofling^d, Liana Verinaud^{a,*}

^a Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biology, State University at Campinas (UNICAMP),
Caixa Postal 6109, 13083-970 Campinas, São Paulo, Brazil

^b Lauro de Souza Lima Institute, Bauru, São Paulo, Brazil

^c Quantum Electronic Department, Institute of Physics Gleb Wataghin, State University at Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

^d Department of Histology and Embryology, Institute of Biology, State University at Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

Received 16 December 2005; received in revised form 27 February 2006; accepted 28 February 2006

Available online 18 April 2006

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is the most prevalent human mycosis in Latin America. The infection is thought to take place firstly in the lungs and then may disseminate to other organs and tissues. Treatment by currently available antifungals is lengthy, the drugs may have undesirable side effects, and some are costly. Occasional resistant strains of *Paracoccidioides brasiliensis*, the causative agent of PCM, have been reported. So, the search for more efficient treatments or adjuvant therapies has to be continued. In this work, we evaluated the effects of HeNe laser irradiation on cutaneous inflammatory lesions caused by the inoculation of $5 \times 10^6/0.1$ ml yeasts cells into the back footpad of Balb/c mice. HeNe irradiation ($\lambda = 632.8$ nm, 3 mW, incident energy of 3 J/cm^2) was applied at days 7, 8 and 9 post-infection and histological and immunohistochemical analysis were done. Unirradiated animals were used as controls. The results showed that laser-treated mice presented reduction of footpad edema, faster cutaneous wound healing, confluent granuloma, diffuse- and more loosely distributed immunolabeling for TNF- α , enhanced labeling of IFN- γ and any *P. brasiliensis* form detected, whereas multiple viable fungi were seen in diffuse widespread granulomas obtained from non-treated mice foot-pad. Fungi that were harvested from laser-treated animals presented no capability of growth in vitro as compared to those obtained from non-treated mice. We conclude that HeNe laser irradiation was able to inhibit the progress of inflammatory local reaction produced by *P. brasiliensis* infection and influence local cytokines production. We suggest that this treatment modality can be a useful coadjuvant tool to be combined with antifungal agents in the treatment of PCM ulcerations. The mechanisms involved in laser therapy of PCM lesions need further investigation.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Low level laser therapy; HeNe laser; *Paracoccidioides brasiliensis*; Paracoccidioidomycosis

1. Introduction

The pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is the etiological agent of Paracoccidioidomycosis (PCM) the most prevalent systemic mycosis in Latin America affecting about 10 million individuals [1]. The fungus grows

as filamentous mycelia at 25 °C and as unicellular yeast form at 37 °C. The natural habitat of this pathogen is, apparently, the soil or plants from areas where PCM is endemic. The disease is acquired by inhalation of dust containing the infecting propagules produced by the fungal mycelium. The infection is thought to take place firstly in the lungs and then may disseminate via the bloodstream and/or lymphatic routes to other tissues [1]. Systemic dissemination of the fungus can reach different organs like liver, spleen, adrenal glands, skin and mucosae, among

* Corresponding author. Tel.: +55 19 3788 6255; fax: +55 19 3788 6276.
E-mail address: verinaud@unicamp.br (L. Verinaud).

others, where it induces severe lesions and remains viable even after treatment with antimycotics [2].

Skin lesions are extremely painful and sensitive. The epithelial infection shows wheal and flare aspect that progress to ulcerative lesions resulting, frequently, in a secondary bacterial infection [3]. Current available treatment with antifungal drugs is frequently toxic at therapeutic dosages and some of them affect common structures to fungi and humans causing side effects to patients.

Because of the discomfort evoked by lesions and collateral drugs effects, new non-harmful strategies that can be used as adjuvant and/or alternative therapy to eradicate the pathogen and accelerate the cure of lesions are of utmost importance. In this way, low level laser therapy (LLLT) provided by the helium–neon (HeNe) laser irradiation can represent an excellent tool since its microbicidal effect, wound healing properties and non-invasive characteristics are already well known [4,5].

LLLT is a form of phototherapy that involves the application of low power monochromatic and coherent light upon injuries and lesions to stimulate healing. Although the exact mechanism of LLLT is not fully understood, what is known is that it accelerates the speed, quality and tensile strength of tissue repair, neutralizes inflammation, and provides pain relief at injured tissue areas by biostimulation of cellular events [6]. On leukocytes, the therapeutic effect of HeNe laser begins with photo-chemical reactions that are able to modulate their activity and to alter the synthesis of important molecules such as active forms of oxygen. These molecules induce the synthesis of many proteins and cytokines and stimulate cellular proliferation. Also, an increase on bactericidal substances, like nitric oxide (NO) and peroxide anion, is observed. Besides, NO is able to increase the local blood circulation supporting tissue repair. Furthermore, laser treatment enhances the phagocytic activity of macrophages and neutrophils and cytokine synthesis [7]. Among the cytokines produced is the tumor necrosis factor- α (TNF- α), an important inflammatory mediator involved in the resistance against *P. brasiliensis* [8,9].

The purpose of this study was to analyze changes in paracoccidioidomycotic lesions after HeNe laser treatment in an experimental model of PCM infection in order to verify the action of this therapy. The study serves as basis for further investigations on the mechanisms involved in low power laser irradiation on the response of ulcerative lesions caused by *P. brasiliensis* infection.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Specific pathogen free BALB/c male mice, 6–8 week-old, obtained from Centro Multi-Institucional de Bioterismo (CEMIB) were used. Animals were maintained in plastic isolators under aseptic conditions throughout the study. Sterile water and feed were provided ad libitum. All proce-

dures were carried out in accordance with the guidelines proposed by the Brazilian Council on Animal Care (COBEA) and approved by the animal care and use committee of the State University at Campinas (UNICAMP).

2.2. Fungus

The virulent isolate Pb18 of *P. brasiliensis* was used in this study. It was maintained at 36 °C in its yeast phase in Fava Netto's medium and used at the seventh day of growth culture.

2.3. Infection of mice

P. brasiliensis yeasts from 7 day-old cultures were collected. The fungal mass was suspended in phosphate-buffered saline (PBS), mixed twice for 10 s on a Vortex-mixer, centrifuged and double-washed in PBS. The concentration was adjusted to 5×10^5 yeast cells based on hemocytometer counts. Viability was determined by Lactophenol cotton blue staining [10] and was higher than 90%. Mice received 5×10^6 yeast forms of *P. brasiliensis* contained in 0.1 ml buffer into the left back footpad, followed immediately by 0.1 ml sterile saline into the opposite one. Animals were monitored daily for the progression of lesions which peaked at 7 days after inoculation.

2.4. Laser treatment

The laser used in this study was a helium–neon laser, with a measured output of 50 mW, which emits light in a collimated beam (diameter 4 mm) with a wavelength of 632.8 nm. All treatments were performed with energy dose of 3 J/cm² and without anesthesia or sedation. Seven days post-infection the treatment with laser took place. Animals were treated during three consecutive days with laser (at days 7, 8 and 9 after infection), and three days after the last treatment session (at day 12 after infection) were killed by CO₂ inhalation and the footpads removed for histological and immunohistochemical analysis.

2.5. Clinical analysis

Footpads were macroscopically analyzed every day and soon after sacrifice of the animals in order to evaluate the wound healing process. Footpad thicknesses (as a measure of inflammation) were measured before infection and daily after infection using a digital caliper (Mitutoyo America Corporation, Plymouth, MI, USA). An average of three measures was taken at each stage.

2.6. Histopathological analysis

For microscopic histological evaluation, foots were collected and fixed in a solution 0.1% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde for 24 h at room temperature. The specimens were submitted to diafanization with xylene,

dehydrated by graded ethanol, and embedded in Histosec (Merck SA, São Paulo, Brazil). Tissue sections (5 μ m) were stained with Hematoxylin–Eosin (H&E) and examined by light microscopy.

2.7. Immunohistochemistry

Cytokine evaluation was done by using immunohistochemical method. Footpad sections were deparaffinized with xylene, washed in an ethanol gradient and phosphate buffered saline (PBS) before reaction. Endogenous peroxidase was blocked by incubation for 30 min in PBS containing 3% hydrogen peroxide. After pre-absorption with normal goat serum and heat-mediated antigen retrieval in sodium citrate buffer at pH 6.0, sections were incubated with primary antibodies anti-IFN γ and anti-TNF- α (Peprotech, Rocky Hills, NJ, USA), for 30 min at room temperature and then overnight at 4 °C. After washing, sections were overlaid for 1 h with a secondary antibody biotin-conjugated. This was followed by incubation with CSA kit (Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) to amplification of signal reaction. The reaction was revealed by the substrate 3,3-diaminobenzidine (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) in a solution containing 0.1 M Tris buffer (pH 7.6), 1.0% (v/v) normal goat serum, and 0.1% (v/v) of 30% hydrogen peroxidase. After tap washing, the slides were counterstained by Harris hematoxylin. Negative controls included the reaction with non-immune serum.

2.8. Fungi viability evaluation

Paracoccidioidomycotic lesions were removed from laser-treated and non-treated animals and processed in 0.85% saline solution, Hanks's solution and 30% saline and glycerine solution with vitamin B to obtain *P. brasiliensis* suspensions. Fungal particles were plated onto Brain Heart Infusion (BHI) agar medium and incubated at 37 °C for seven days before colonies were counted. Results were expressed as colony-forming units (CFUs).

2.9. Statistical analysis

The results were analyzed by one-way ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test for multiple comparisons. $P < 0.05$ was considered significant. The figures from histological and immunohistochemical experiments are representative of at least three experiments performed on different experimental days. Each experimental group consisted of four to six mice.

3. Results

3.1. Clinical analysis

Footpad lesions were daily evaluated in laser-treated and non-treated animals. Macroscopic analysis showed that treated animals presented quick reduction of lesions

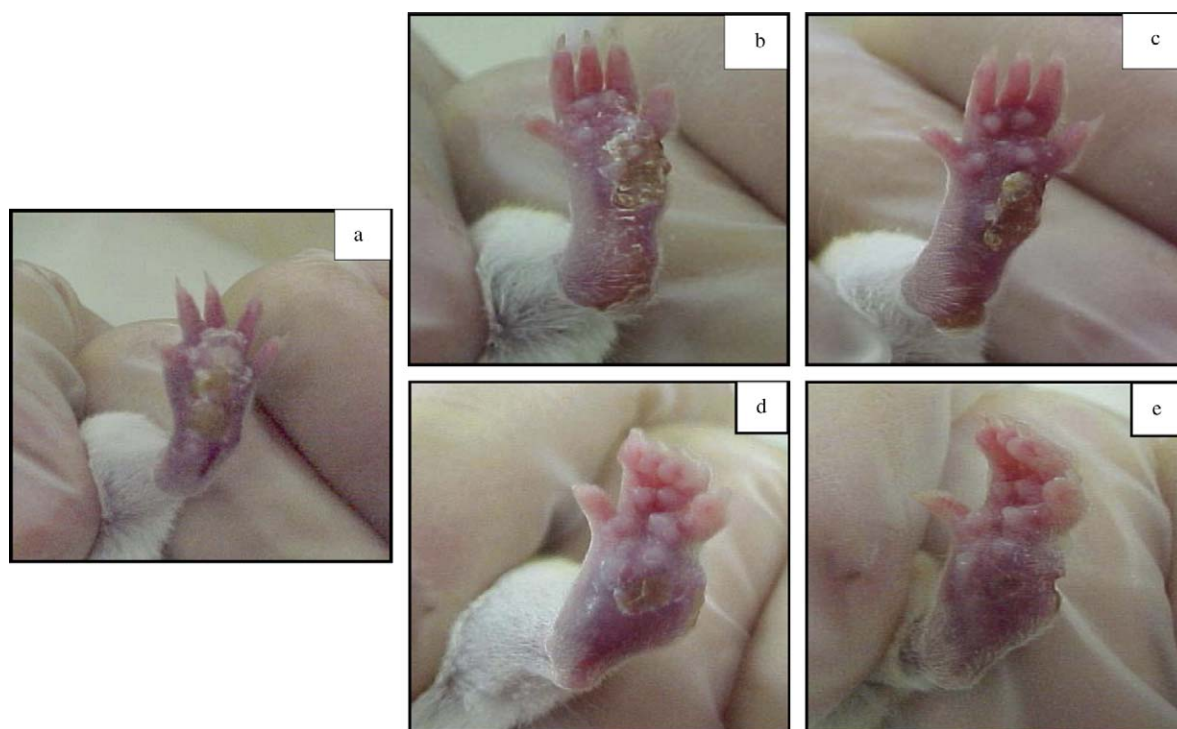


Fig. 1. Footpad lesions from *P. brasiliensis*-inoculated animal that received or not laser treatment. (a) Footpad from animal with seven days of infection and before the first session of laser treatment. Note the edematous aspect of lesion and an extensive lesion area. (b) and (c) Footpad from animal treated with two and three sessions of laser (8 and 9 days post-infection), respectively. Note regression of wounds, the better aspect of lesions and reduction of edema. (d) and (e) Footpad from non-treated animal after eight and nine days of infection, respectively. There is increased edema as compared with laser treated animal as well as increased proportion of lesion area. Photos are representative of one animal from each group.

with intense healing when compared to non-treated animals. In the beginning of laser treatment, after seven days post-infection, the footpads presented an extensive lesion area (Fig. 1(a)). Macroscopically, the lesions had initially an edematous aspect but after three laser treatment sessions they evolved to small nodules (Fig. 1(b) and (c)). Clinically, the healing process could be verified by peeling off, indicating cellular turn over. It could be observed also that *P. brasiliensis*-inoculated footpad had, after three laser irradiation sessions, thickness closer to the opposite one that was injected just with sterile saline. Lesions from non-treated animals presented an invariable edematous/erythematous aspect (Fig. 1(d) and (e)).

Footpad thicknesses were evaluated daily using a caliper and the measurements are shown in Fig. 2. There was significant reduction of footpad thickness in animals that received the laser treatment ($p < 0.05$). Non-treated animals showed persistence of edema during all experimental period.

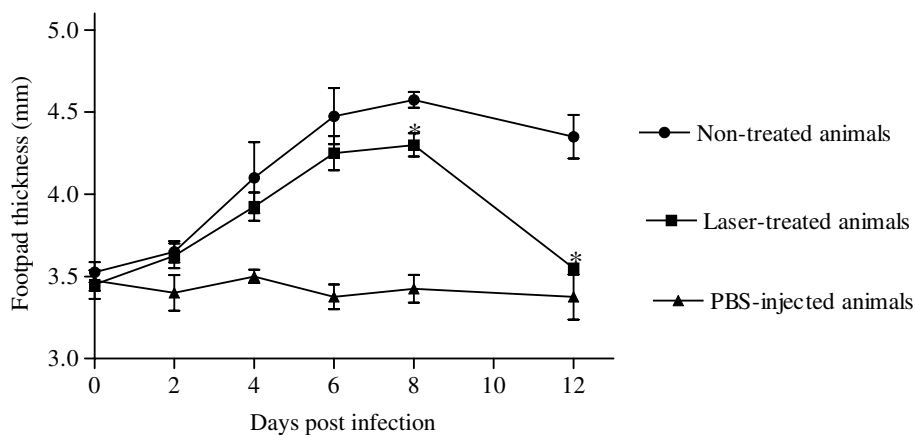


Fig. 2. Footpad thicknesses from *P. brasiliensis*-infected animals that were or not treated with laser. From the beginning of laser treatment (7 dpi) on, differences between laser-treated and non-treated animals were significant ($p < 0.05$).

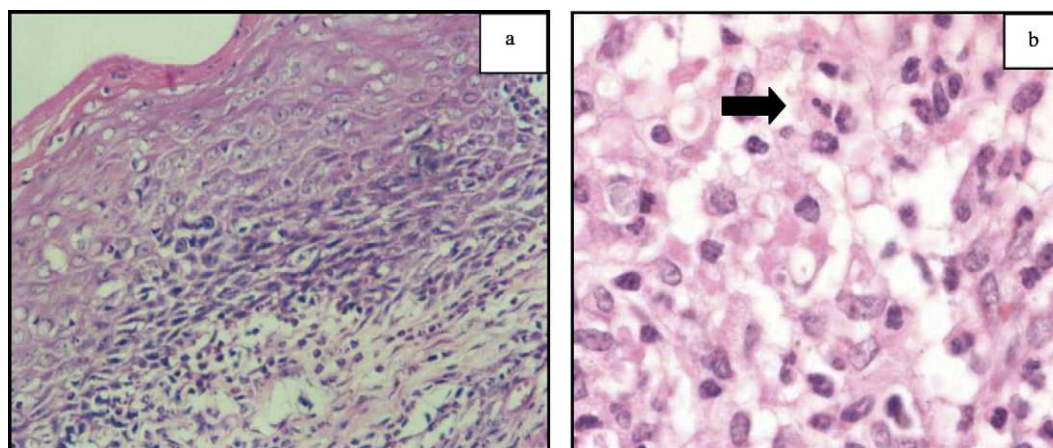


Fig. 3. Histological features of non-treated animal at day 12 after infection. (a) Note that epidermis presents intracellular edema. (b) Region characterized by infiltration of large number of neutrophils (arrow) and vacuolated macrophages. H&E stain. Magnification: 100 \times (a) and 500 \times (b).

3.2. Histopathological analysis

Light microscopy of paracoccidioidomycotic lesions obtained from non-treated animals after 12 days of infection revealed hyperplastic epidermis, suggestive of intensive cellular proliferation and infiltration of polymorphonuclear leucocytes throughout it. The papillary dermis presented intense acute inflammatory infiltrate (Fig. 3(a)) and a poorly visualized extracellular matrix. Foci of vacuolated macrophages and neutrophils could be seen in deeper microscopic segments (Fig. 3(b)).

In mice that were exposed to three sessions of HeNe laser irradiation, both the epidermis and papillary dermis had acquired a normal histological appearance. In addition, numerous active fibroblasts showing euchromatic nuclei and prominent nucleoli were seen underlying the epidermis (Fig. 4(a)). In the reticular dermis the lesion presented mild inflammatory infiltrate and thin bundles of collagen fibrils were disposed around the cells, indicative of fibrogenesis in course (Fig. 4(b)).

In both groups of mice, typical epithelioid granulomas, visualized by elongation of nuclei and enlargement of cytoplasm, developed in the subcutaneous tissue of infected animals' footpads. However, the pattern exhibited by the cell-mediated granulomatous reaction was quite different between laser-treated and non-treated mice. Whereas,

lesions of non-treated mice were very large and presented disorganized aspect (Fig. 5(a)), in laser-treated mice they were lesser extensive and presented confluent morphology (Fig. 5(b)) at day 12 after infection. Furthermore, non-treated animals presented diffuse granulomas with multiple viable fungi (Fig. 5(c)), whereas no *P. brasiliensis*

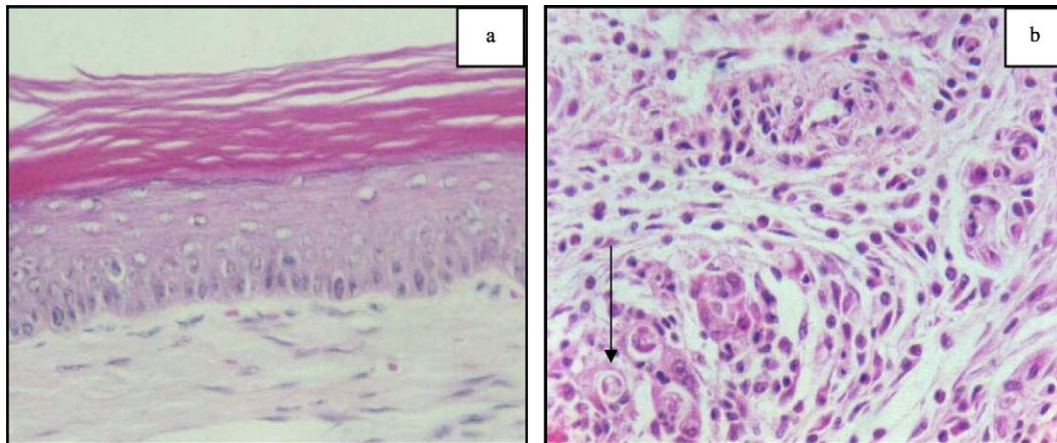


Fig. 4. Histopathological features of laser-treated animal at day 12 after infection. (a) Note the normal organization of epidermis. (b) Note the mild perivascular and granulomatous infiltrate in with emphasis to fungus inside a phagocyte (arrow). H&E stain. Magnification: 100× (a) and 400× (b).

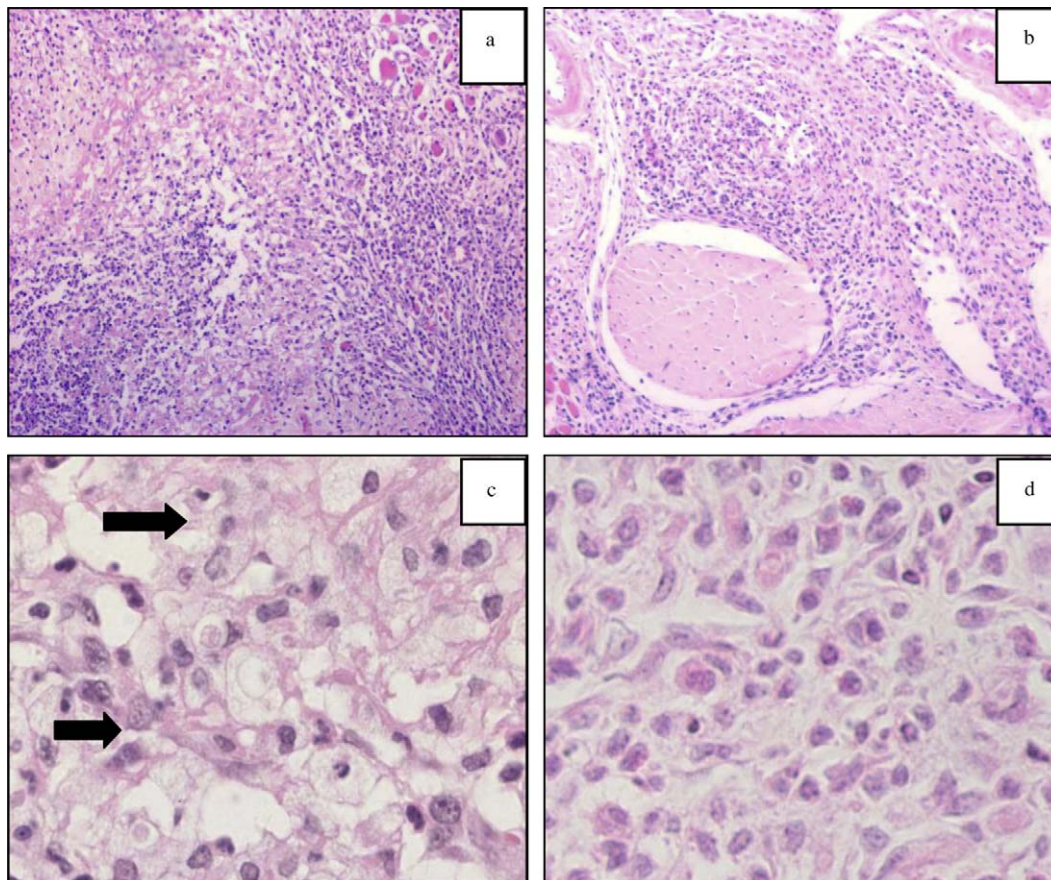


Fig. 5. Appearance of representative granuloma in untreated (a and c) and laser-treated animals (b and d) at day 12 after infection. The granuloma is smaller and well-organized in laser-treated mice (b). Note the presence of so many fungi particles (arrows) in (c) compared with no *P. brasiliensis* observed in (d). H&E stain. Magnification: 100× (a and b) and 500× (c and d).

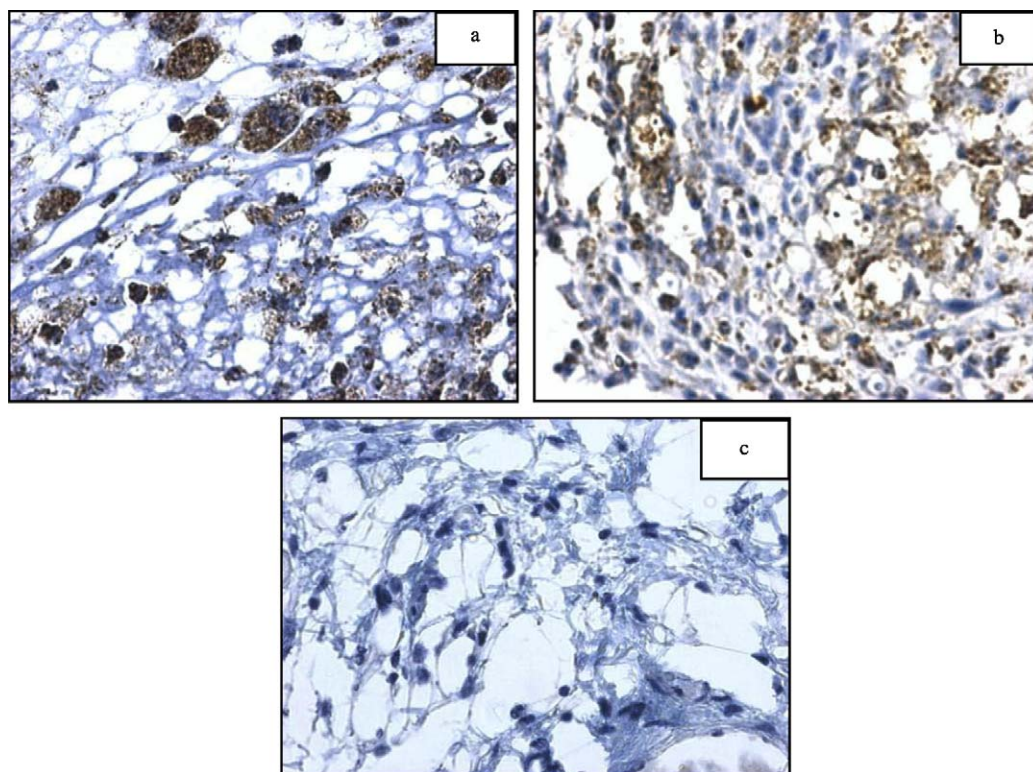


Fig. 6. Immunodetection of tumor necrosis factor- α (TNF- α) protein in reactive cells found in footpad lesions from *P. brasiliensis*-infected animals by immunohistochemistry. (a) Lesion from untreated animal. Note the dense granular appearance exhibited by the cytokine within macrophages. (b) Lesion from laser-treated animal. Note that the protein is scarcely distributed inside the cell cytoplasm. (c) Control staining, incubation with non-immune serum. Magnification: 400 \times .

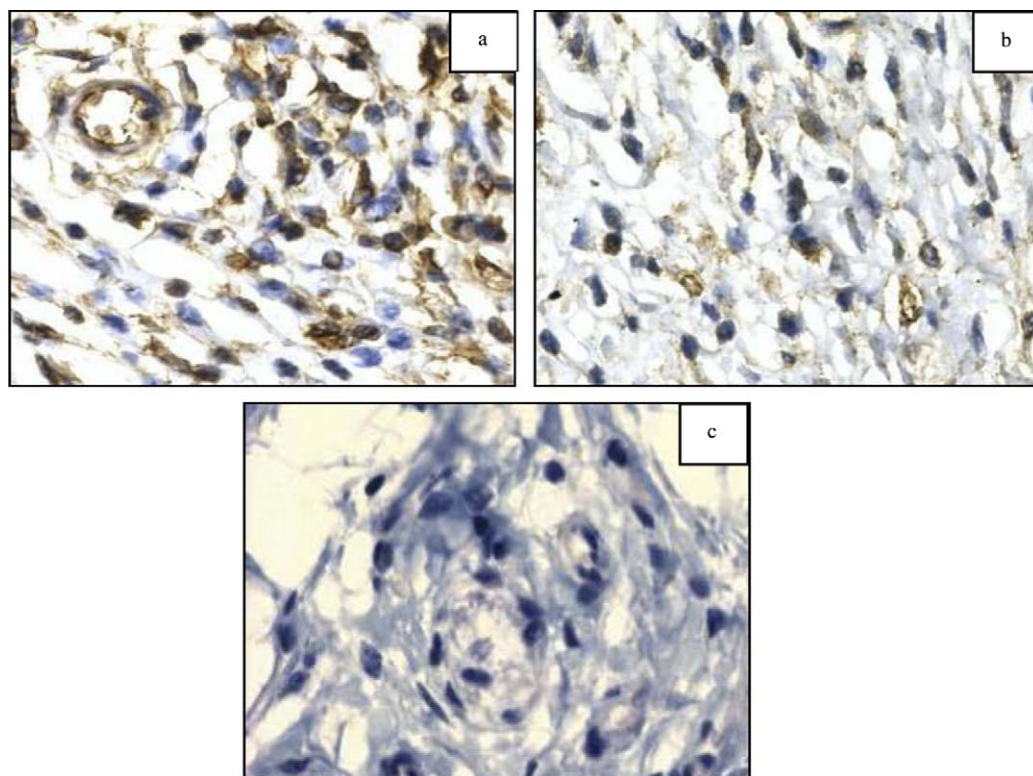


Fig. 7. Immunolocalization of interferon- γ (IFN- γ) protein in footpad lesions from *P. brasiliensis*-infected animals. (a) Lesion from non-treated animal. Note the intensive staining. (b) Lesion from animal treated with three sessions of laser. (c) Control staining, incubation with non-immune serum. Magnification: 400 \times .

Table 1

Results observed in experiment to verify the growth capability of fungi taken from paracoccidioidomycotic lesion of mice treated or not with laser

Experimental groups	Animals	Number of CFUs
Non-treated mice	#1	26
	#2	4
	#3	5
	#4	9
Laser-treated mice	#1	–
	#2	–
	#3	–
	#4	–

CFUs: colony forming units.

were detected in granulomas from laser-treated mice (Fig. 5(d)).

3.3. Immunohistochemical analysis

Tumor necrosis factor- α (TNF- α) and Interferon- γ (IFN- γ) were evaluated in lesions from *P. brasiliensis*-infected animals that were treated or not with laser. Both cytokines were expressed in dermal lesions caused by the fungal infection in laser-treated as well as in untreated animals (Figs. 6 and 7).

It was observed that TNF- α staining was diffuse- and more loosely distributed on tissues from laser-treated animals (Fig. 6(b)) whereas IFN- γ staining was more intense on tissues from non-treated animals (Fig. 7(a)).

3.4. Fungi viability

Footpads from laser-treated and non-treated animals were macerated and fungus particles recovered and cultured in growth medium to gain a quantitative evaluation and better understanding of the laser effects on paracoccidioidomycotic lesions. After two days of incubation, small colonies appeared, and good growth was observed until seven days of incubation. As shown in Table 1, fungi that were harvested from laser-treated animals presented no capability of growth in vitro as compared to those obtained from non-treated animals.

4. Discussion

Lasers have spread into numerous areas of medical and surgical practice including those relevant to wounds. Clinically, it has been used to promote wound healing with varying degrees of success. The current investigation has shown that laser irradiation accelerates cutaneous wound healing and reduces the edema of paracoccidioidomycotic lesions.

Injury to the skin initiates a cascade of events including inflammation, new tissue formation, and tissue remodeling, which finally lead to at least partial reconstruction of the wounded area [11,12]. Within a few hours after injury, inflammatory cells invade the wound tissue. Neutrophils

arrive first within a few minutes, followed later by monocytes and lymphocytes.

In our experimental model of PCM we observed that HeNe laser irradiation is able to promote faster tissue reorganization. While the inflammatory infiltrate in non-treated animals presented presence of neutrophils and the wound drained a greenish-yellow exudate at day 12 post-inoculation (macroscopical observation), laser-treated animals presented a mild inflammatory infiltrate and considerable fibrosis. Besides, in this last group the wound area was smaller and dense granulation tissue was formed. Our results are consonant with those found in literature [13] showing the effects of HeNe laser in burn wounds. The authors also verified that the inflammatory infiltrate obtained from non-irradiated animals was mainly composed by neutrophils and that these cells persisted in the tissue during all experimental period. On the other hand, treated animals presented a small infiltrate with other cellular types.

Inflammatory cells produce a wide variety of proteinases and reactive oxygen species as a defense against contaminating microorganisms, and they are involved in the phagocytosis of cell debris. In addition to these defense functions, inflammatory cells are also an important source of growth factors and cytokines, which initiate the proliferative phase of wound repair characterized by the migration and proliferation of keratinocytes at the wound edge and by proliferation of dermal fibroblasts in the neighborhood of the wound. These cells subsequently migrate into the provisional matrix and deposit large amounts of extracellular matrix [11].

Saperia et al. [14] demonstrated that laser irradiation can act at transcriptional levels and activated the expression of genes that codify to collagen protein. Results from these same authors also shown that HeNe laser is able to stimulate the collagen synthesis in wounds since an extensive production of this fiber could be observed. Recently, Poon et al. [15] have demonstrated that there is no change in cell proliferation and collagen synthesis and delay in collagen remodeling activity when non-pigmented dermal fibroblasts are directly exposed to irradiation. However, Young et al. [16] have already observed that the laser can stimulate macrophages to produce soluble factors that have stimulatory effects on fibroblasts since they promote their proliferation. In our in vivo experimental model, a marked proliferation of fibroblasts and alterations in the density of collagen fibers were observed in the mice footpad after laser treatment.

In addition, we have observed significant differences between treated and non-treated animals in relation to the granuloma formation. Granulomas are localized, protective inflammatory reactions which control the growth and dissemination of pathogens, preventing host inflammation from harming surrounding tissues. They are a hallmark of mycobacterial infections and an essential component of an adequate defense, since it is within granulomas that T-cell-macrophage cooperation can take place [17]. The main change in the characteristic of granulomatous lesion following laser treatment was its organization

and the presence of only few fungus particles. It is probable that laser can also act on T-cell–macrophage interaction, allowing the macrophage to display a more effective microbiostatic or microbicidal activity probable by interfering with cytokine synthesis.

Cytokines are important components during the inflammatory and reparative stages of injury. They are small, secreted proteins that affect the behavior of immune cells but also of other cells. They include the interleukins, lymphokines, and several related signaling molecules such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferons. Funk et al. [18] found that cultured blood mononucleated cells when treated with laser and stimulated by mitogens show a marked increase in the production of cytokines such as IL-1 α , IL-2, IFN- γ and TNF- α . These data indicate that laser is able to modulate immunologic functions.

Originally, TNF- α was considered an antitumor agent, but latter its role in the regulation of inflammation has become obvious. TNF- α has been pointed as an extremely important molecule during paracoccidioidomycotic infection, because it activates macrophages and stimulates its differentiation in epithelioid cells. Immunohistological staining with a specific anti-TNF- α antiserum within the granulomas resulted in a more diffuse expression of this cytokine in laser-treated mice. We believe that the regenerative effect observed in the lesions from laser-treated animals is a consequence of TNF- α synthesis that induces an increased expression of adhesion molecules which in turn might facilitate the migration of defense cells to the local of infection. This fact would allow a more effective elimination of the pathogen and would promote speed up of lesion regeneration.

Of great importance to the infectious process is also the production of the cytokine IFN- γ . In acute inflammation, this seems to represent a physiologic and beneficial host response, because IFN- γ , with their metabolites, plays a key role in the elimination of invading microorganisms. However, there is evidence that chronic release of IFN- γ can result in severe tissue injury at sites of inflammation since chemokines are strongly up-regulated by IFN- γ stimulation. Chemokines are a superfamily of small structurally related proteins that regulate trafficking and effector functions of leukocytes, and thus play a key role in inflammation and host defense against pathogens [19–21].

At 12 days after infection non-treated mice presented increased IFN- γ expression while the laser-treated ones had low quantities of this cytokine. This result can be attributed to the fact that the lesion in laser-treated animals was more accelerated, and so the production of this cytokine had already declined, or to an overexpression of IFN- γ in non-treated animals. IFN- γ has recently been shown to induce macrophage expression of chemoattractant cytokines (chemokines) such as the interferon-inducible protein-10 (IP-10/CXCL10) [22]. The selective attraction of different subsets of leukocytes to the site of tissue injury appears to be mediated to a significant extent

by the expression of specific chemokines. IP10/CXCL10 is a member of the CXC family of chemokines that acts primarily in the recruitment of lymphocytes carrying the receptor CXCR3 and that is detected at high levels in several chronic inflammatory conditions [23]. Luster et al. [24], have demonstrated that overexpression of IP-10/CXCL10 can lead to a more intense inflammatory phase, delayed reepithelialization, and a prolonged, disorganized granulation phase with impaired angiogenesis. Experiments to investigate the presence of this chemokine in lesions from laser-treated and non-treated animals are in course in our laboratory.

In this work we have also observed the inhibition of growth of fungi collected from laser-treated animals. It is possible that HeNe laser modifies, or even destroys, fungic structures that are used by the pathogen as resistance mechanisms. On the other hand, the possibility that laser irradiation is able to activate monocytes to increase intracellular killing of the fungus cannot be ruled out. In vitro studies have demonstrated that nitrogen laser irradiation causes temporary inactivation of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* [25]. More recently, Hemvani et al. [26] have observed an enhanced killing of *Mycobacterium fortuitum* within human monocytes exposed to HeNe and nitrogen laser irradiation. Our laboratory is now investigating a direct action of HeNe laser on *P. brasiliensis* cells conducting some experiments where fungus cultures are treated with different doses of irradiation and then evaluated for viability and structural changes.

From the present study it can be suggested that laser photo-stimulation was efficient in minimizing fungal infection dermal effects caused by a direct or indirect fungistatic/fungicidal light action, and/or is able to accelerating tissue repair.

These insights may be useful in the development of new non-invasive strategies for the treatment of PCM ulcerations by using the HeNe laser as a co adjuvant tool to be combined with antifungal agents or for patients intolerant of or failing medical therapy. However, the mechanisms involved in the phototherapy of PCM cutaneous lesions need further investigation.

Acknowledgements

We appreciate the valuable technical assistance provided by Marcos C. Meneghetti and Rosemeire F. de O. de Paula.

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (#04/00221-8 and # 04/13137-5).

References

- [1] A. Restrepo-Moreno, Paracoccidioidomycosis, in: W.E. Deismukes, P.G. Pappas, J.D. Sobel (Eds.), *Clinical Mycology*, Oxford University Press, New York, 2003, pp. 328–345.

- [2] E. Brummer, E. Castaneda, A. Restrepo, Paracoccidioidomycosis: an update, Clin. Microbiol. Rev. 6 (1993) 89–117.
- [3] G. Del Negro, C.S. Lacaz, A.D. Fiorillo, in: U.S.P. Sarvier (Ed.), Paracoccidioidomycosis, São Paulo University Press, São Paulo, 1982, pp. 97–105.
- [4] L. Jovanovic, B. Mirkovic, B. Zivkovic, Soft laser in the therapy of herpes simplex labialis, The Scientific Journal Facta Universitatis (Series Medicine and Biology) 5 (1998) 61–63.
- [5] H. Yu, K.L. Chang, C.L. Yu, J.W.V. Chen, G.S. Chen, Helium neon laser irradiation stimulates migration and proliferation in melanocytes and induces repigmentation in segmental-type vitiligo, J. Invest. Dermatol. 120 (2003) 56–64.
- [6] T. Karu, Photobiology of low-power laser effects, Health Phys. 56 (1989) 691–704.
- [7] G.I. Klebanov, A. Poltanov, Primary and secondary molecular–cellular mechanisms behind laser therapy, Laser Phys. 20 (2003) 1–14.
- [8] A.S.K. Karhawi, A.L. Colombo, R. Salomão, Production of IFN- γ is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission, Med. Mycol. 38 (2000) 225–229.
- [9] J.T. Souto, F. Figueiredo, A. Furlanetto, K. Pfeffer, M.A. Rossi, J.S. Silva, Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice, Am. J. Pathol. 156 (2000) 1811–1820.
- [10] A. Sano, K. Nobuyuki, K. Iabuki, A comparative study of four different staining methods for estimation of live yeast form cells of *P. brasiliensis*, Mycopathologia 124 (1993) 157–161.
- [11] R.A.F. Clark, Wound repair: Overview and general considerations, in: R.A.F. Clark (Ed.), The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair, Plenum, New York, 1996, pp. 3–50.
- [12] P. Martin, Wound healing aiming for perfect skin regeneration, Science 276 (1997) 75–81.
- [13] M.S. Ribeiro, C.E. De Araujo, S.F. De Oliveira, C.M. Pelegrini, T.M. Zorn, D.M. Zezell, Effects of low intensity polarized visible laser radiation on skin burns. A light microscopy study, J. Clin. Laser Med. Surg. 22 (2004) 59–66.
- [14] D. Saperia, E.G. Lassberg, R.F. Lyons, R.P. Abergel, P.B. Aneux, J.C. Castel, R.M. Dwyer, J. Uitto, Demonstration of elevated type I and type III procollagen mRNA levels in cutaneous wounds treated with He–Ne laser, Biochem. Biophys. Res. Commun. 138 (1986) 1123–1128.
- [15] V.K.M. Poon, L. Huang, A. Burd, Biostimulation of dermal fibroblast by sublethal Q-switched Nd:YAG 532 nm laser: Collagen remodeling and pigmentation, J. Photochem. Photobiol. B. 81 (2005) 1–8.
- [16] S. Young, P. Bolton, M. Dyson, W. Harvey, C. Diamantopoulos, Macrophage responsiveness to light therapy, Laser Med. Surg. 9 (1989) 497–505.
- [17] S.H.E. Kaufmann, Immunity to intracellular bacteria, Annu. Rev. Immunol. 11 (1993) 129–163.
- [18] J.O. Funk, A. Kruse, H. Kirchner, Cytokine production after helium–neon laser irradiation in cultures of human peripheral-blood mononuclear-cells, J. Photochem. Photobiol. B: Biology 16 (1992) 347–355.
- [19] O.M.Z. Howard, A. Ben-Baruch, J.J. Oppenheim, Chemokines: progress toward identifying molecular targets for therapeutic agents, Trends Biotechnol. 14 (1996) 46–51.
- [20] P.M. Murphy, Chemokine receptors: structure, function and role in microbial pathogenesis, Cytokine Growth Factor Rev. 7 (1996) 47–64.
- [21] B.A. Premack, T.J. Schall, Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection, Nat. Med. 2 (1996) 1174–1178.
- [22] P. Vanguri, J.M. Farber, Identification of CRG-2. An interferon-inducible mRNA predicted to encode a murine monokine, J. Biol. Chem. 265 (1990) 15049–15056.
- [23] K. Christopherson II, R. Hromas, Chemokine regulation of normal and pathologic immune responses, Stem Cells 19 (2001) 388–396.
- [24] A.D. Luster, R.D. Cardiff, J.A. Maclean, K. Crowe, R.D. Granstein, Delayed wound healing and disorganized neovascularization in transgenic mice expressing the IP-10 chemokine, Proc. Assoc. Am. Physicians 110 (1988) 183–196.
- [25] A. Dube, K. Jayasankar, L. Prabakaran, V. Kumar, P.K. Gupta, Nitrogen laser irradiation (337 nm) causes temporary inactivation of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*, Lasers Med. Sci. 19 (2004) 52–56.
- [26] N. Hemvani, D.S. Chitnis, N.S. Bhagwanani, Helium–neon and nitrogen laser irradiation accelerates the phagocytic activity of human monocytes, Photomed. Laser Surg. 23 (2005) 571–574.

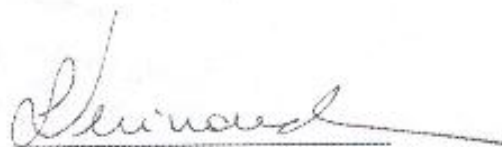
**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 717-1, sobre "ALTERAÇÕES NO MICROAMBIENTE TÍMICO DURANTE A INFECÇÃO PARACOCCIDIOIDOMICÓTICA EXPERIMENTAL" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud / Jacy Gameiro está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 05 de Agosto de 2004.

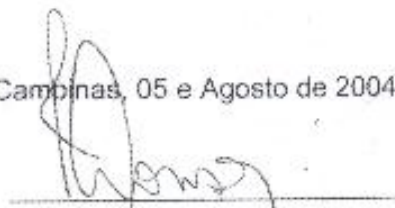
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 717-1, entitled "ALTERATIONS IN THYMIC MICROENVIRONMENT DURING EXPERIMENTAL PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on August 5, 2004.



Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente

Campinas, 05 e Agosto de 2004.



Fátima Alonso
Secretária