

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CAROLINA FRANCELIN ROVAROTTO

**“Efeito da infecção experimental com *Plasmodium berghei* NK65
sobre o timo: níveis elevados de apoptose e saída prematura de
timócitos CD4⁺CD8⁺”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Carolina Francelin Rovarotto
Verinaud
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientadora: Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

R769e

Rovarotto, Carolina Francelin

Efeito da infecção experimental com *Plasmodium berghei* NK65 sobre o timo: níveis elevados de apoptose e saída prematura de timócitos CD4⁺CD8⁺ / Carolina Francelin Rovarotto. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientadora: Liana Maria Cardoso Verinaud.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Malária. 2. *Plasmodium berghei*. 3. Timo. 4. Apoptose. I. Verinaud, Liana Maria Cardoso, 1959-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Effects of *Plasmodium berghei* on thymus: high levels of apoptosis and premature egress of CD4⁺CD8⁺ thymocytes in experimentally infected mice.

Palavras-chave em inglês: Malaria; *Plasmodium berghei*; Thymus; Apoptosis.

Área de concentração: Imunologia.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Liana Maria Cardoso Verinaud, Dagmar Ruth Stach-Machado, Geraldo Aleixo da Silva Passos Júnior.

Data da defesa: 15/03/2011.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 15 de março de 2011

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos

Assinatura

Prof. Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos Júnior


Assinatura

Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach Machado


Assinatura

Profa. Dra. Eva Burger

Assinatura

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunopatologia
do Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia e Biofísica
do Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, São Paulo,
com apoio financeiro da FAPESP (Processo # 08/56496-6 e # 08/58604-04)



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

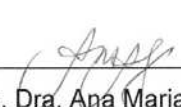
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1604-1, sobre "Avaliação da apoptose na atrofia tímica induzida pela infecção por *Plasmodium berghei* NK65", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Liana Verinaud / Carolina Francelin de Andrade, 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/Unicamp em 15 de setembro de 2008.

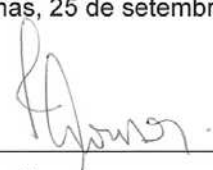
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1604-1, entitled "Programmed cell death in thymus of *Plasmodium berghei* NK65 - infected mice", 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 September 15, 2008.

Campinas, 25 de setembro de 2008.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

“O assunto mais importante do mundo pode ser simplificado até ao ponto em que todos possam apreciá-lo e compreendê-lo
isso é - ou deveria ser – a mais elevada forma de arte.”

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Em todos os momentos até aqui eu tive a honra de ter pessoas queridas ao meu lado. Sou grata pela presença, apoio e companheirismo de cada um. Deixo aqui meu muito obrigada:

Aos meus pais, Adauto e Wanda, e minha irmã Raquel pelo amor incondicional, por serem meu porto seguro e acreditarem que posso sempre mais;

Ao meu esposo, Thiago pelo amor, paciência, orações e apoio em todos os momentos;

À Profa. Dra. Liana Verinaud pelo acolhimento ao longo desses anos, pela orientação, confiança e tudo mais;

À minha avó Zuleika pelos preciosos momentos e ensinamentos;

Às minhas amigas ao longo de 5 anos que suportaram os muitos *e-mails* e raros encontros: Tamy, Livia, Jú e Cá, mesmo longe estamos perto !;

Aos meus sobrinhos Nath e Paulinho por trazerem à minha vida a alegria e inocência das crianças;

À amiga Sileny, que acompanhou de perto o desenvolvimento desta tese, antes mesmo do início do curso de pós-graduação. Agradeço pela companhia durante esses anos, pelas conversas, orações, lanches e opiniões;

Aos amigos do laboratório: Alliny pelo constante otimismo e por ter permitido ajudá-la em seu trabalho, Thiago por tornar o dia divertido através de seus comentários, Rosária pela companhia e aos dois por me fazerem querer que o fungo cresça!, Rodolfo pela recente amizade e companhia e Lu, querida, por suas ajudas técnicas, mas muito mais por sua presença no laboratório;

Ao bioterista Marco César por sua amizade em primeiro lugar! e, por sua imensa ajuda no cuidado com os camundongos;

À Jacy e Paty, por estarem presentes durante a iniciação científica e me fornecerem as bases técnicas e teóricas para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos amigos Elias, Marina, Júlio, Larissa, Aída, Camila B, Camila D, Fernanda, Adriana e Welbe pelas orações, acolhimento e apoio desde a graduação;

À Profa. Dra. Luciana Paulino por todo seu auxílio e disposição;

Aos colegas do departamento Rodolfo, Maristela, Júlia, Luis Peroni, Alessandro, Adriel, Ju, Vânia, Fernando, Alessandro, Henrique, Danilo, Gustavo, Patrícia e Juliete pelas conversas no corredor e auxílios sempre que necessários;

Aos biólogos do departamento Dirce, José Raimundo e Rose pela prontidão em ajudar sempre;

Às professoras Dra.Irene e Dra.Leonilda pelo uso do citômetro e aos alunos Fernanda, Alessandro e Ana Leda pelo auxílio na aquisição dos dados;

Ao laboratório do Prof. Hernandez, principalmente à bióloga Fabiana e ao aluno Danilo pelo auxílio nos experimentos.

À Profa. Dra. Clarice Weins e Prof. Dr.Geraldo Passos pela participação na pré-banca desta dissertação;

À Profa. Dra. Dagmar Stach-Machado e Prof.Dr.Geraldo Passos pela participação como membros da banca examinadoras desta tese;

Aos professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia e do Departamento de Histologia por todos os auxílios técnico e teórico;

Ao programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular pelo suporte e auxílios financeiros, principalmente à Lourdes pela ajuda burocrática;

À FAPESP financeiro que permitiu o desenvolvimento deste trabalho;

A Deus, a quem sou grata acima de todos por me permitir chegar até aqui e por, aos poucos, realizar os desejos de meu coração. "Grandes coisas fez o Senhor por nós, pelas quais estamos alegres" (Sl 126:3).

RESUMO

O timo é um órgão linfóide primário, responsável pela diferenciação, maturação e desenvolvimento dos linfócitos T (ou timócitos, enquanto no timo). Este órgão apresenta complexa arquitetura tímica composta por elementos celulares e solúveis responsáveis pela migração dos precursores de linfócito T do espaço perivascular para a região cortical e subsequente migração para a região medular. A trajetória do timócitos pelos microambientes tímicos permite que estas células recebam estímulos que os tornam linfócitos maduros, simples positivos TCD4⁺ ou TCD8⁺, prontos para migrar para os órgãos linfóides secundários. Durante a maturação, timócitos que são auto-reativos ou anérgicos são eliminados pelo processo de morte celular programada. Entretanto, a desregulação da apoptose nos linfócitos pode acarretar no desenvolvimento de doenças auto-imunes, tumores e imunodeficiências.

Estudos em modelos murinos de atrofia tímica relatam que em diversas infecções parasitárias, virais, helmínticas, bacterianas e fúngicas e até mesmo em distúrbio metabólico como a diabetes experimental o timo é um órgão alvo. Nestes modelos, foi observado intenso acometimento tímico com involução do órgão acompanhada por desarranjo da arquitetura tímica e depleção de todas as subpopulações de timócitos.

Em estudos anteriores, observamos profundas alterações no timo durante a infecção experimental com *Plasmodium berghei* que incluíam severa atrofia no décimo quarto dia após inoculação do parasita, alterações histológicas, perda da delimitação cortico-medular, redução de todas sub-populações de timócitos e a presença intra-tímica do parasita.

No presente trabalho avaliamos se a grande perda de timócitos observada no timo de animais infectados pelo *Plasmodium berghei* NK65 é devido a um aumento da ocorrência de apoptose, e/ou necrose, ou se é devida à saída prematura destas células para a periferia. A

avaliação de morte celular na população de timócitos total revelou aumento no número de células Anexina-V⁺/PI⁻ em animais infectados quando comparados aos controles. Ainda, a análise da apoptose em timos atróficos, no pico da parasitemia, revelou aumento de núcleos apoptóticos nas regiões cortical e medular tímica bem como aumento no número de linfócitos (CD4⁺, DP e DN) Anexina-V positivos. Alteração na expressão de genes pró-apoptóticos no timo de animais infectados quando comparado ao controle, sugerindo a participação de vias de ativação extrínsecas específicas da apoptose, também foram observadas. Embora 90% dos timócitos de animais infectados sejam Anexina-V positivos, as alterações na expressão dos elementos de matriz extracelular, relatadas anteriormente pelo nosso grupo, sugere também a exportação precoce destas células para a periferia do sistema imune. Nossos resultados apontam para um aumento de linfócitos imaturos (DP e DN) nos linfonodos mesentéricos de animais infectados, um indicativo de que parte dos timócitos imaturos sai do timo antes de completarem seu amadurecimento.

Em conjunto, nossos dados mostram que as alterações estruturais e de componentes solúveis do timo durante a infecção com *Plasmodium berghei* NK65 podem favorecer tanto a deleção, por apoptose, de timócitos corticais como também a migração precoce de células imaturas para a periferia do sistema imune. O acometimento tímico na atrofia tímica induzida pelo *Plasmodium berghei* NK65 revela que durante uma infecção o timo sofre influências de diversos fatores que provocam profundas alterações nas subpopulações linfocitárias. Também, é possível que as alterações observadas em nosso modelo prejudique a resposta imune periférica contra o parasita contribuindo para o agravamento da doença e que a presença de timócitos prematuros nos linfonodos favoreça o desenvolvimento de doenças auto-imunes.

ABSTRACT

The thymus is the primary lymphoid organ responsible for the differentiation, maturation and development of T lymphocytes (or thymocytes, as in the thymus). This organ presents a complex architecture composed by soluble and cellular elements that support the migration of lymphocyte precursors from space perivascular to the cortical region, and then their migration toward the medullar area. The trajectory of thymocytes by thymic microenvironments allows these cells to receive stimuli that make them mature into CD4⁺ or CD8⁺ T cells, which leave the thymus to populate peripheral lymphoid organs. Studies using murine models of thymic atrophy have reported that thymus is a target organ in several parasitic, viral, helminthic, bacterial and fungal infections. In these models, one can observe intense thymic involution accompanying by disruption of thymic architecture and depletion of all thymocyte subpopulations.

In a previous study, our laboratory has demonstrated profound changes in the thymus during experimental infection with *Plasmodium berghei*, the causative agent of Malaria. Such alterations comprised severe atrophy, histopathological changes with loss of cortical-medullary delimitation, and reduction of all thymocytes sub-populations. In addition, the presence of parasites inside the thymus was detected for the first time. In another study using the same experimental model, we have demonstrated that *Plasmodium*-infected animals present changes in the expression of extracellular matrix elements and chemokine protein families, which are important molecules for the dynamic thymocyte migration within the thymus.

In this study we evaluate whether the acute thymic atrophy observed in *Plasmodium berghei*-infected animals is correlated with increased apoptotic levels of thymocytes, or with their premature emigration to the periphery. Our data showed profound histological alterations,

which included a very large number of cells showing nuclear condensation and karyorrhectic changes surrounded by histiocytes suggesting increased levels of apoptosis. This was confirmed by immunohistochemistry and flow cytometry techniques. Also, increased expression of pro-apoptotic genes was observed in the thymus of infected animals when compared with controls, suggesting the involvement of the extrinsic, or receptor-initiated, pathway of apoptosis.

Although the rate of apoptosis in the thymus from infected animals is much higher than the controls, the hypothesis that a premature emigration of thymic cells to the peripheral lymphoid organs may also account for the severe atrophy observed during *Plasmodium* infection could not be ruled out.

In fact, we have found a consistent fraction of immature cells, mainly double-negative and double-positive thymocytes, in mesenteric lymph nodes of infected animals. Although this result serves as an evidence of premature emigration of non-mature thymocytes, the precise mechanism by which this process occurs is not clear until now. No significant differences were found in the spleen. Taken together, our data show that thymic alterations observed during *Plasmodium berghei* infection can favour both the deletion of thymocyte subpopulation by apoptosis and the early emigration of immature cells to the periphery of the system immune. As a consequence, an altered peripheral immune response to the parasite can be expected.

Our findings provide relevant information concerning the immune involvement in malaria infection. Moreover, the murine model described here could be useful for mechanist studies of acute thymic atrophy.

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA.....	Albumina bovina sérica
CD4.....	Grupamento de diferenciação 4
CD8.....	Grupamento de diferenciação 8
CD45RA....	Grupamento de diferenciação 45
CD62L.....	Grupamento de diferenciação 62
DAB.....	Cromógeno de diaminobenzidina
DN.....	Duplo-negativos. Denominação aplicada a linfócitos que não expressam co-receptores CD4 e CD8
DNA.....	Ácido desoxirebonucléico
DP.....	Duplo-positivos. Denominação aplicada a linfócitos que expressam co-receptores CD4 e CD8
HE.....	Hematoxilina
IFN- γ	Gama-interferon
IL-2.....	Interleucina 2
MEC.....	Matriz extracelular
MHC.....	Complexo maior de histocompatibilidade
MHC-I.....	Complexo maior de histocompatibilidade de classe I
MHC-II.....	Complexo maior de histocompatibilidade de classe II
MLN.....	Linfonodos mesentéricos, do inglês <i>mesenteric lymph node</i>
OMS.....	Organização Mundial da Saúde
PBS.....	Solução salina tamponada com fosfato

PGRP.....Proteína de reconhecimento de peptideoglicano

RNA..... Ácido ribonucléico

RPMI..... Mistura de sais enriquecida com aminoácidos, vitaminas e outras substâncias necessárias ao crescimento celular desenvolvida pelo Roswell Park Memorial Institute

RT-PCR... Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SEM..... Erro padrão da média

SFB..... Soro fetal bovino

SGPL-1..... *Sphingosine-1-phosphate lyase*

SP..... Simples-positivos. Denominação aplicada a linfócitos que expressam co-receptores CD4 ou CD8

SPF..... Colônias livres de patógenos específicos

TCR..... Receptor de células T

TEC..... Células epiteliais tímicas

Th1..... Linfócitos T helper 1

Th2..... Linfócitos T helper 2

TMB..... Tetrametilbenzidina

TNC..... Complexo linfo-epitelial do inglês *thymic nurse cells*

TNF- α Fator alfa de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

1.1. O timo e a maturação dos linfócitos T	1
1.2. Apoptose e mecanismos de morte celular	3
1.3. Atrofia tímica fisiológica e modelos experimentais	10

2. OBJETIVOS 15

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais	16
3.2. Preparo do inóculo	16
3.3. Parasitemia	17
3.4. Índice tímico	17
3.5. Análise histopatológica do timo e linfonodos mesentéricos	17
3.6. Análise das subpopulações de timócitos	18
3.7. Detecção da apoptose por imunistoquímica –TUNEL	18
3.8. Análise da apoptose por citometria de fluxo	19
3.9. Dosagem sérica IFN- γ e TNF- α por ELISA	19
3.10. Extração de RNA e síntese de cDNA	20
3.11. Expressão de genes pró-apoptóticos através de PCR em tempo real	21
3.12. Análise das subpopulações linfocitárias nos linfonodos mesentéricos	22
3.13. Análise estatística	23

4. RESULTADOS

4.1. Parasitemia e Mortalidade	24
4.2. Índice tímico	24

4.3. Análise histopatológica	25
4.4. Frequência e número absoluto das subpopulações de timócitos	27
4.5. Análise da apoptose pelo método de imunohistoquímica –TUNEL	28
4.6. Análise da apoptose por citometria de fluxo	30
4.7. Dosagem sérica de IFN- γ e TNF- α por ELISA	32
4.8. Análise da influência do IFN- γ e TNF na atrofia tímica	
4.8.1 Índice tímico e análise histológica C57BL/6	34
4.8.2 Índice tímico e análise histológica C57BL/6 <i>knockout</i> para IFN - γ	36
4.8.3 Índice tímico e análise histológica C57BL/6 <i>knockout</i> para TNFR-1	37
4.9. Análise da expressão de genes pró-apoptóticos	38
4.10. Análise histológica dos linfonodos mesentéricos	41
4.11. Análise da expressão de Anexina-V e subpopulações linfocitárias no linfonodo mesentérico	
4.11.1 Análise de células Anexina-V positivas no linfonodo mesentérico	42
4.11.2 Análise das subpopulações linfocitárias no linfonodo mesentérico	43
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÃO	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
8. ANEXO	
MANUSCRITO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 O timo e a maturação dos linfócitos T

O sistema imune é formado por células que têm como precursor comum células tronco hematopoiéticas da medula óssea (HSCs). Estas células se diferenciam em progenitores de diferentes tipos celulares com restrito comprometimento de linhagem, culminando com a produção de cada uma das linhagens de células maduras do sangue. Enquanto que a maioria das linhagens hematopoiéticas se desenvolve na medula óssea, o desenvolvimento das células T ocorre em um órgão especializado, o timo (CIOFANI & ZUNINGA, 2007).

O timo é um órgão linfático primário que está localizado na porção ântero-superior da cavidade torácica. A existência do timo já era de conhecimento grego e seu nome provavelmente derivou do grego “thymos” que denota força da vida ou da alma. Anatomicamente, o timo apresenta-se bilobado e envolto por uma cápsula de tecido conjuntivo de onde partem septos que entram no órgão subdividindo-o em diversos lobos (NISHINO, *et al.*, 2006; VICENTE, *et al.*, 2010). Cada lóbulo é histologicamente dividido em duas regiões principais (i) região cortical, formada principalmente por componentes linfóides (timócitos) e por poucas células mesenquimais e epiteliais; e (ii) região medular, composta principalmente de células epiteliais e por poucos timócitos (BLACKBURN & MANLEY, 2004). Ainda, o microambiente tímico é formado por diversos componentes que formam uma malha tridimensional composta por células epiteliais tímicas (TECs), macrófagos, células dendríticas, fibroblastos e componentes de matriz extracelular (revisado por SAVINO, 2004).

Os precursores de célula T saem da medula óssea e chegam ao timo pelos vasos sanguíneos situados na região cortico-medular do órgão e já iniciam as etapas de diferenciação e maturação. Quando chegam ao timo, os precursores apresentam fenótipo CD3⁺CD4⁺CD8⁺ triplo

negativo (TN) e passam por etapas de maturação que envolve uma interação orquestrada entre os timócitos em desenvolvimento e os complexos solúveis e componentes celulares do microambiente tímico. Então, as células TN adquirem a molécula CD3 e migram pelo córtex até chegar à região subcapsular como timócitos duplo-negativo $CD3^+CD4^-CD8^-$ (DN) (HAYNES & HALE, 1998). Enquanto migram pela região cortical, os timócitos passam a expressar o receptor de células T (TCR) e, em seguida as moléculas de CD4 e CD8, tornando-se timócitos duplo-positivos $CD3^+CD4^+CD8^+$ (HAYDAY & PENNINGTON, 2007). Ainda no córtex, os timócitos sofrem uma triagem, processo conhecido como seleção positiva, durante a qual os timócitos cujos receptores e co-receptores ligam-se às moléculas de MHC próprias expressas nas células epiteliais do córtex tímico recebem sinal de sobrevivência e migram para a região medular. Os timócitos DP que não interagem com o MHC próprio são eliminados por apoptose. A seleção positiva dos timócitos DP resulta na maturação destes em timócitos simples positivos $CD4^+$ e $CD8^+$ (SP) que migram através do córtex em direção à medula, onde os timócitos SP sofrem outra triagem chamada seleção negativa (Figura 1) (PARHAM, *et al.*, 2005).

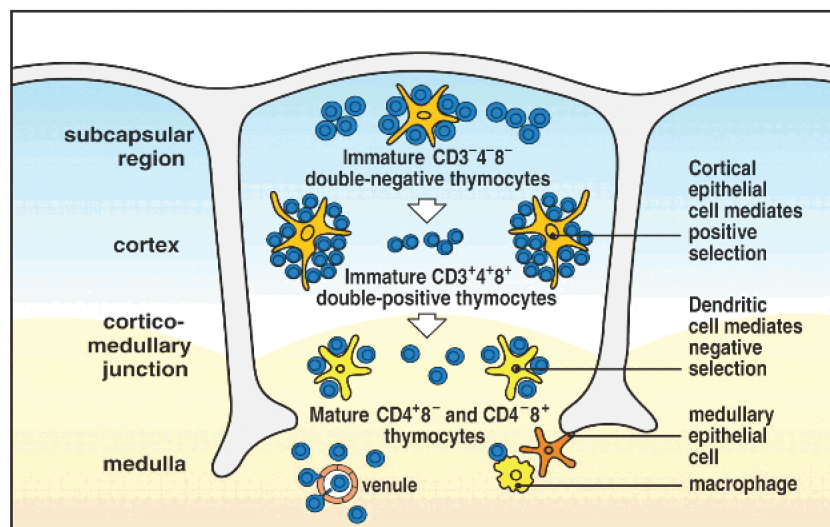


Figure 5-13 The Immune System, 2/e (© Garland Science 2005)

Figura 1. Processos de seleção positiva e negativa dos timócitos em desenvolvimento. No timo, os precursores de linfócitos T provenientes da medula óssea migram pelo estroma tímico de onde recebem estímulos para que se diferenciem em linfócitos T simples positivos CD4 ou CD8 enquanto são triados pelas seleções positiva e negativa.

Agora, os timócitos SP que reconhecem com alta afinidade o complexo peptídeo-MHC próprio, ou seja, timócitos auto-reativos, com alta probabilidade de causar doenças auto-imunes são eliminados por apoptose (WITT & ROBEY, 2005; TAKAHAMA, 2006). Após esta etapa, os timócitos CD4⁺ ou CD8⁺ sobreviventes migram para os órgãos linfóides secundários como linfócitos T auxiliares ou linfócitos T citotóxicos, respectivamente (ANDERSON, *et al.*, 2007; TAKAHAMA, 2006; LYNCH, *et al.*, 2009).

Embora a natureza das interações envolvidas nas etapas do desenvolvimento do timócitos ainda seja parcialmente compreendida, uma série de evidências indica que os timócitos recebem uma variedade de sinais das células estromais que os envolvem e compõem os microambientes tímicos especializados (BOYD, *et al.*, 1993; GODFREY, *et al.*, 1992; VAN EWIJK, 1991). Estas células estromais são fenotipicamente heterogêneas, consistindo numa variedade de células epiteliais como o epitélio cortical e medular, fibroblastos mesenquimais, células dendríticas e macrófagos (VAN EWIJK, 1991). Assim, é provável que os componentes do estroma contribuam individualmente, através de fatores solúveis e moléculas de superfície, para uma variedade de eventos do desenvolvimento dos timócitos.

1.2 Apoptose e os mecanismos de morte celular

No timo, os linfócitos que não são selecionados para seguirem nas etapas de maturação e diferenciação são eliminados pelo processo de morte celular programada.

O termo morte celular programada foi introduzindo em 1964, propondo que a morte celular durante o desenvolvimento não é acidental e sim controlada por uma série de mecanismos que conduzem a morte da célula em determinado tempo e espaço (LOCKSHIN & WILLIAMS, 1964).

Kerr, Wyllie e Currie em 1972 introduziram o termo “apoptose” para descrever os processos morfológicos da autodestruição controlada da célula (KERR, *et al.*,1972). A palavra “apoptose” é de origem grega e significa “cair ou deixar cair fora”, em analogia com a queda das folhas das árvores. Esta analogia ressalta que a morte da matéria viva é uma parte integrante e necessária no ciclo de vida dos organismos. O processo de morte celular por apoptose é ativo e geneticamente controlado, que desempenha a importante função de manter a homeostasia dos tecidos, regulando e mantendo as populações celulares quer seja nas condições fisiológicas ou nas patológicas (NORBURY, 2001). Importante ressaltar que a apoptose é um processo bem definido e a forma mais frequente de morte celular programada, mas que outros tipos não-apoptóticos de morte celular também são de importância biológica (LEIST & JAATTELA, 2001).

Durante o desenvolvimento muitas células que proliferaram em excesso entram em apoptose, contribuindo para modelar órgãos e tecidos (MEIER, *et al.*,2000). O exemplo mais comum da ocorrência da apoptose no desenvolvimento animal é a formação dos dedos através da maciça morte celular das células do tecido mesenquimal interdigital (ZUZARTE-LUIS & Hurle,2002). De uma maneira geral, as células de um indivíduo adulto entram constantemente em apoptose a fim de manter o número de células inalterado. Durante seu desenvolvimento no timo, os timócitos passam pelas etapas de seleção positiva e negativa, nas quais aqueles que não apresentam as características necessárias para se tornarem linfócitos funcionais são eliminados através da apoptose. Contudo, antes mesmo de passarem pelas etapas de seleção positiva e negativa, a maioria dos linfócitos morre durante os eventos de rearranjo gênico necessários para a formação de receptores de antígeno das células T (TCR). Também, muitos linfócitos morrem na periferia do sistema imune durante a fase de contração da resposta imune após a eliminação

do antígeno. Nesta etapa, a apoptose ocorre para controlar a proliferação de células efetoras, mantendo assim, o número de linfócitos constante (RATHMELL, & THOMPSON, 2002).

Em conjunto, os processos de apoptose têm grande importância biológica, estando envolvidas no desenvolvimento, proliferação, diferenciação/homeostase, regulação e função do sistema imunológico e na remoção de células defeituosas. Assim, a disfunção, ou a desregulação, da apoptose está envolvida em uma variedade de condições patológicas. A redução no processo da apoptose em um organismo pode resultar no desenvolvimento de patologias como câncer, doenças auto-imunes e disseminação de infecções virais, enquanto que desordens neurodegenerativas, AIDS e doenças isquêmicas são causadas ou exacerbadas pela excessiva apoptose (FADEEL, *et al.*,1999).

Os mecanismos de apoptose são altamente complexos e sofisticados, envolvendo uma série de eventos em cascata com gasto energético.

O programa de apoptose é iniciado por duas vias principais. Embora as vias funcionem independentemente, há uma ligação essencial entre elas que amplifica o sinal de morte (IGNEY KRAMMER, 2002). A célula entra em apoptose após receber sinais do meio extracelular (via extrínseca ou do receptor de morte) ou após o aparecimento de danos internos (via intrínseca, ou da mitocôndria) (FEIG & PETER, 2007). Ainda, há uma via adicional de morte celular que envolve o mecanismo de citotoxicidade mediado por células T dependente da liberação de grânulos de granzima e perforina (MARTINVALET, *et al.*,2005).

Independentemente da forma que o processo de apoptose é iniciado, o resultado é a ativação de classes específicas de cisteínas proteases, as caspases, que exercem papel central na execução da morte celular programada por clivar inúmeras proteínas celulares culminando na desmontagem estrutural da célula. As caspases estão divididas em dois grupos (i) caspases

iniciadoras, que apresentam longo domínio citoplasmático e fazem a transdução do sinal de morte do meio extracelular para as vias intracelulares de sinalização e (ii) caspases executoras, que são ativadas pela clivagem proteolítica realizada pelas caspases iniciadoras. Assim, o sinal de amplificação da cascata as caspases garante completa ativação do programa de morte. Portanto, é lógico que a ativação das caspases deve ser regulada para proteger a célula contra a morte accidental. Desta forma, as caspases são sintetizadas como zimógenos inativos e, também há numerosos inibidores de casapases que controlam o início da apoptose em todos eventos da cascata (BUDD,*et al.*,2006 e SALVESEN & DUCKETT,2002).

A via extrínseca de ativação da apoptose é ativada quando citocinas indutoras de morte como Fator de Necrose Tumoral-alpha (TNF- α), FasL/CD95-L/Apo1 e/ou o ligante indutor de apoptose relacionado com TNF (TRAIL) se ligam aos seus respectivos receptores (TNF-R1;CD95 (Fas;APO-1),TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5) expressos em células sensíveis à apoptose(CHICHEPORTICHE,*et al.*,1997; ASHKENAZI & DIXIT,1998; PETER & KRAMMER,1998; SULIMAN, *et al.*,2001;RUBIO-MOSCARDO, *et al.*,2005). Estes receptores, membros da família do TNF, são conhecidos como receptores de morte e apresentam domínios extracelulares ricos em cisteínas e cauda citoplasmática com aproximadamente 80 aminoácidos chamados de “domínio de morte” (JIMENEZ, *et al.*,2000).

Os melhores modelos de estudo da ativação de morte pela via extrínseca estão caracterizados nos receptores FasL/FasR e TNF- α /TNFR-1. Nestes modelos, há a ligação do receptor com seu respectivo ligante trimérico. Após a ligação, proteínas citoplasmáticas adaptadoras (FADD,TRADD) correspondentes aos receptores de morte são recrutadas e ligam-se à cauda citoplasmática do receptor. As proteínas adaptadoras então recrutam a pró-caspase 8 e se associam à ela pela dimerização do domínio efetor de morte. Neste ponto, ocorre a formação do

complexo de sinalização indutor de morte (DISC), resultando na ativação catalítica da pró-caspase 8 (KISCHKEL, *et al.*,1995). Uma vez que a caspase 8 tenha sido ativada, a fase de execução da apoptose é iniciada e ocorre a ativação em cascata das caspases 3-6 e 7 que provoca o dano nuclear. A apoptose mediada por receptores de morte pode ser inibida por proteínas c-FLIP que se ligam ao FADD e caspase-8, tornando-as ineficazes (KATAOYA,*et al.*,1998 ;SCAFFIDI,*et al.*,1999).

A via intrínseca é iniciada por produtos tóxicos no citoplasma celular ou stress como ausência de fator de crescimento celular, a Interleucina -2 (IL-2), instabilidade genômica, privação energética, infecção viral, drogas ou irradiação Ultra-Violeta (UV) ou por raios-gama. A via intrínseca é conhecida também por via da mitocôndria, pois vários estudos demonstram que esta organela integra os estímulos de morte celular os quais provocam permeabilização mitocondrial e consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes (DESAGHER & MARTINOU,2000).

O início do processo é quando ocorre a liberação do citocromo c da região intermembrana para o citosol da mitocôndria onde, então, se liga ao fator-1 de ativação da apoptose (Apaf-1). A ligação de dATP induz uma mudança conformacional do Apaf-1 que permite o recrutamento de pró-caspase-9 e sua ativação. O primeiro alvo da caspase 9 é a caspase 3.

Os linfócitos T citotóxicos (TCD8⁺) também são capazes de induzir morte celular em células-alvo através de seus efeitos citotóxicos. Esse mecanismo é utilizado principalmente em células tumorais ou infectadas por vírus e consiste primeiramente na liberação de grânulos de perforina pela célula TCD8⁺. A molécula de perforina é capaz de formar um poro na membrana da célula alvo através do qual passam os grânulos liberados posteriormente pelo linfócito citotóxico (TRAPANI & SMYTH, 2002). Esses grânulos são compostos de serinas proteases

conhecidas como granzima A e granzima B. A granzima B cliva proteínas no resíduo de aspartato, o que culmina com a ativação pro-caspase 10 que através dos eventos de clivagem das caspases culmina na ativação da caspase-3(PARDO, *et al.*, 2004). Portanto, as vias extrínseca, intrínseca e da granzima B convergem na ativação de caspase-3, que por sua vez provoca o dano celular levando à morte celular.

Entretanto, a granzima-A, embora seja um mecanismo de morte também ativado pelo linfócito T citotóxico, é um mecanismo de ativação da apoptose independente da ativação da via das caspases. Uma vez dentro da célula, a granzima A ativa a quebra do DNA via DNase NM23-H1, um produto gênico supressor de tumor (FAN, *et al.*,2003). Este produto gênico apresenta importante função imunológica por prevenir a expansão do tumor através da indução da apoptose na célula tumoral. A presença da proteína SET no nucleossomo celular geralmente inibe o gene NM23-H1. A granzima A cliva o complexo SET, desinibindo a expressão do gene NM23-H, o que resulta na degradação apoptótica do DNA. Em adição as proteínas que fazem parte do complexo SET (SET, Apel, pp32 e HMG2) exercem em conjunto a proteção da cromatina e da estrutura do DNA (LIEBERMAN & FAN,2003).Por consequência, a inativação do complexo SET pela granzima A contribui para a apoptose pelo fato de bloquear os mecanismos de manutenção do DNA e da integridade estrutural cromatina.

Nos timócitos, o processo de apoptose pode também ser induzido pela ação de citocinas como TNF- α . e IFN- γ (GUILLERMO,*et al.*, 2007).

O TNF é uma importante citocina envolvida em processos inflamatórios, promovendo seus efeitos quando ligadas aos seus receptores TNF R1 (p55) e TNF R2 (p75) (CHEN&GOEDDEL, 2002 e ISOGAI, *et al.*, 1996) Durante infecções agudas, os níveis séricos desta citocina aumentam e assim atua como uma potente indutora de apoptose de timócitos

(ASHKENAZI & DIXTT,1998). O mecanismo de indução de apoptose parece envolver o TNF R1. A ativação desse receptor leva a associação do complexo à proteína adaptadora TRADD que, em reposta, liga-se ao FADD. A via apoptótica é desencadeada pela ativação das caspases (BERRIH, *et al.*, 1985).

O IFN- γ produzido por timócitos em diferenciação pode promover aumento da expressão de moléculas de MHC de classe II em culturas de células epiteliais tímicas (LEITE-DE-MORAES, *et al.*, 1991), modular a expressão de proteínas da matriz extracelular e alterar os padrões de adesão e proliferação de células do epitélio tímico (LEITE-DE-MORAES, *et al.*, 1992 e HENRIQUE-PONS, *et al.*, 2004). Ainda, o pré-tratamento de camundongos com IFN- γ provoca aumento da apoptose induzida por LPS de timócitos corticais. Embora o IFN- γ não induza diretamente apoptose, a administração de anticorpos anti- IFN- γ previne a apoptose (MUCCI, *et al.*, 2002). É sugerido que o aumento da apoptose tímica observada quando na administração de IFN- γ ocorra devido ao fato de esta citocina promover a elevação dos níveis séricos de TNF e cortisol (WELLHAUSEN & BOROS, 1982).

Assim como a apoptose participa no desenvolvimento de todas as linhagens celulares, esse processo também apresenta grande importância no desenvolvimento normal e na regulação da resposta imune. Durante a maturação os timócitos passam por diversas etapas de seleção para que os timócitos que expressam um TCR não funcional ou auto-reativo sejam deletados antes de concluírem o desenvolvimento. A deleção por apoptose destes timócitos é o processo pelo qual o sistema imune garante a maturação e o desenvolvimento somente de timócitos que expressam TCR funcional (QUAGLINO & RONCHETTI, 2001).

Logo que entram no timo, os precursores de linfócito T DN2 (CD44⁺CD25⁺) que não recebem o estímulo da citocina IL-7 são eliminados por apoptose através da ativação da via

intrínseca. Na passagem do estágio DN2 para o DN3 (CD44⁺CD25⁺) os precursores são triados e somente os timócitos que completam perfeitamente o rearranjo do gene TCR β seguem o desenvolvimento enquanto que aqueles que não receberam o sinal da seleção β entram em processo de morte. Ainda em estágio DN3, os timócitos são selecionados através da sinalização do pré-TCR. Nesta etapa, os timócitos que não recebem sinal do pré-TCR entram em apoptose através da ativação de via extrínseca (dos receptores de morte). Já no estágio DP (CD4⁺CD8⁺) a maioria dos timócitos que não são capazes de gerar um TCR funcional são deletados por negligência principalmente pela ativação da via intrínseca da apoptose. A morte por negligência contribui para a morte de 90% dos timócitos em desenvolvimento. Na seleção negativa, a morte celular é induzida através da ativação da via intrínseca, na maioria dos casos, e também ativação da via extrínseca. A apoptose de células pela seleção negativa garante a morte de células que expressam TCR auto reativo, minimizando assim o desenvolvimento de resposta autoimune na periferia. Durante todo o processo de maturação e desenvolvimento do timócitos, estima-se que 95% dos precursores de linfócitos T morrem por apoptose. Desta maneira, a apoptose é um processo básico fundamental no desenvolvimento de um repertório de linfócitos T funcionais (ZHANG,*et al.*,2005).

A literatura é vasta em demonstrar que mutações nos genes que codificam proteínas pro e anti-apoptóticas estão correlacionadas com o desenvolvimento de imunodeficiências, autoimunidade e câncer (OPFERMAN & KORSMEYER) revelando a importância da investigação dos mecanismos de apoptose no sistema imune.

1.3 Atrofia tímica fisiológica e os modelos experimentais

O timo e seu microambiente sofrem constantes alterações durante o envelhecimento de um indivíduo. Ao nascimento, o timo apresenta seu maior peso relativo e continua crescendo até

a puberdade. A partir da puberdade, o timo sofre constante redução de tamanho e alterações na arquitetura tímica, que inclui perda da delimitação cortico-medular e redução do número de linfócitos corticais. A redução do tamanho tímico a partir da adolescência está diretamente relacionada com as alterações hormonais (hormônios sexuais e adrenais), que promovem a morte de células tímicas resultando na redução no número de células T *naive* na periferia. Contudo, apesar da alteração no número de células T na periferia e na função tímica, a produção de células T por grama de tecido tímico mantém-se inalterado. Embora a atrofia tímica seja significativa em indivíduos adultos, estudos têm demonstrado que o tecido tímico residual é funcional e capaz de gerar novas células (SHIRAISHI, *et al.*, 2003). Até mesmo em estudos no timo de indivíduo idoso foi relatado manutenção das regiões cortical e medular, mostrando que o timo ainda é capaz de manter a produção de linfócitos T mesmo que em menor número. Ainda, indivíduos que passaram por transplantes de medula óssea, ou após tratamentos imunossupressivos como irradiação, apresentaram a reconstituição de todas as subpopulações que compõe o sistema imune periférico (LEGRAND, *et al.*, 2007, LUM, *et al.*, 1987). A análise histológica do timo destes pacientes (jovens e adultos) revelou uma rede linfoepitelial tímica capaz de promover os eventos de proliferação e exportação de células T para a periferia.

Devido à involução do timo na fase adulta, os estudos da função tímica em humanos são limitados. Os estudos funcionais somente são possíveis a partir do timo obtido em cirurgias cardíacas e na ocorrência de óbito de crianças e fetos. Também, a análise das imagens do timo por tomografia computadorizada e ultra-som não permitem o estudo da celularidade tímica. Desta forma, o estabelecimento de modelos experimentais para o estudo da atrofia tímica é importante para o melhor entendimento dos processos de maturação e migração dos timócitos em

situações de stress, infecções ou mesmo em desordens metabólicas (GRUVER & SEMPOWSKY, 2008).

A atrofia tímica é relatada em modelos murinos de infecções virais, fúngicas, protozoárias ou helmínticas. Nestas infecções, há redução do tamanho relativo do timo e perda de timócitos corticais com fenótipo duplo-positivos (DP). Ainda, no timo atrofico há alteração do fenótipo das células epiteliais tímicas e da concentração de hormônios tímicos, sugerindo que todos os componentes, celulares ou solúveis da arquitetura tímica são alterados.

O timo de animais infectados por *Trypanosoma cruzi*, por exemplo, apresentam atrofia do timo com alterações nos componentes do microambiente tímico como aumento da deposição de elementos de matriz extracelular concomitante com o aumento da expressão de seus receptores pelos timócitos nos diferentes estágios de maturação (SAVINO, *et al.*, 1992 e SAVINO, *et al.*, 2002), o que poderia contribuir com a migração linfocitária anormal caracterizada pela presença de células T imaturas na periferia observadas nesta infecção (COTA-DE-ALMEIDA, *et al.*, 2003).

Nosso laboratório, desde 1999, vem estudando o timo e estabelecendo modelos murinos de atrofia tímica para um melhor entendimento das interações tímicas. Assim, foram desenvolvidos modelos a partir de infecções, como por exemplo, com o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* e com o vírus da Hepatite Murina (MHV), bem como frente às alterações metabólicas através da diabetes experimental induzida por Aloxana. Em todos os estudos foi descrito profundo acometimento tímico e redução da celularidade tímica (VERINAUD, *et al.*, 1998; BRITO, *et al.*, 2003; SOUTO, *et al.*, 2003; NAGIB, *et al.*, 2010).

Em 2007, em colaboração com o Prof. Dr. Fábio Costa, do Departamento de Genética do Instituto de Biologia da Unicamp, foram iniciados os estudos para obtenção de um modelo

experimental de atrofia tímica utilizando o protozoário *Plasmodium berghei* NK65, causador da malária.

A malária é uma importante doença infecciosa 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 & GOOD,1994), sendo as infecções mais freqüentes e graves as que ocorrem após a infecção por protozoários da espécie *Plasmodium falciparum* (GREENWOOD, *et al.*,2005).

Embora existam muitos estudos sobre resposta imune contra 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. 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 inibe indiretamente, através da produção de citocinas, o desenvolvimento do estágio hepático dos parasitas. As células T CD8⁺ são capazes de inibir o desenvolvimento do estágio hepático do *Plasmodium spp*, prevenindo a entrada destes nos eritrócitos (ZAVALA & TSUJI, 2003) Como os linfócitos T representam um importante elemento na imunidade à malária, é possível que as alterações observadas na arquitetura e no microambiente tímico acarretem distúrbios na maturação e diferenciação de timócitos o que pode ter implicações na resposta imune ao *Plasmodium spp*.

Anteriormente, utilizando um modelo murino letal de infecção com *Plasmodium berghei* NK65, demonstramos profundas alterações histológicas e severa atrofia tímica com perda de

células duplo-positivas. Em adição, a presença do parasita dentro do timo foi detectada pela primeira vez. (ANDRADE, *et al.*, 2008). Ainda, em publicação recente demonstramos que a intensa desorganização da arquitetura tímica induz profundas alterações na expressão de elementos de matriz extra-celular e de proteínas da família das quimiocinas em animais infectados pelo *Plasmodium* (GAMEIRO, *et al.*, 2009). Como estas moléculas possuem um papel crítico na maturação das células T, porque estão envolvidas com a dinâmica migração intra-tímica dos timócitos, é razoável se supor que tais eventos possam influenciar o processo de maturação e diferenciação das células T, prejudicando o desenvolvimento normal destas células. Como consequência, uma resposta imune periférica defeituosa contra o parasita pode ser esperada em virtude da severa redução de linfócitos e/ou pela presença de células sem competência funcional completa no sangue e nos órgãos linfóides periféricos.

Neste trabalho, dando continuidade aos estudos anteriores, investigamos se a atrofia tímica observada na infecção pelo *Plasmodium berghei* NK65 ocorre como consequência da depleção de diferentes sub-populações de timócitos, em virtude do aumento da taxa de apoptose, e/ou como resultado da saída precoce destas células para os órgãos linfóides secundários. Com estes dados esperamos contribuir para o melhor entendimento tanto do comprometimento tímico frente a infecções, como das consequências que a involução tímica pode gerar na resposta imune do hospedeiro.

2. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo principal investigar se a atrofia tímica aguda observada durante a infecção por *Plasmodium berghei* NK65 correlaciona-se com o aumento da taxa de morte celular programada (apoptose) em timócitos e/ou com a saída precoce destas células para a periferia.

Para tanto, as seguintes metas foram seguidas:

- ▲ Análise da atrofia tímica durante o curso da infecção, através do estudo cinético do peso e das subpopulações do timo após a infecção;
- ▲ Avaliação dos mecanismos de morte de timócitos em animais infectados: apoptose e/ou necrose, através da análise da presença de corpos apoptóticos no tecido e da expressão de marcadores específicos de apoptose na superfície celular (Anexina-V e Iodeto de propídio (PI));
- ▲ Análise das vias de ativação da apoptose através da expressão de genes pró-apoptóticos;
- ▲ Análise do envolvimento das citocinas Interferon-gama (IFN- γ) e Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) na indução da atrofia tímica durante a infecção por *Plasmodium*, através de dosagem sérica e estudo da infecção em animais *knockout* para estas citocinas e
- ▲ Análise de órgãos linfóides periféricos, através do estudo de alterações histopatológicas e de subpopulações.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos machos das linhagens BALB/c, C57BL/6 e C57BL/6 *knockout* (KO) para IFN γ obtidos do CEMIB-UNICAMP a partir de colônias livres de patógenos específicos (SPF). Camundongos C57BL/6 KO para *TNF-R* foram adquiridos do biotério do Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto. Para os experimentos foram utilizados camundongos de 8 semanas de idade. Os animais foram mantidos, durante todo o período experimental, em mini-isoladores acondicionados em estante ventilada da marca ALESCO (Monte-Mor,SP) com água e ração estéreis, fornecidas *ad libitum*, e com um ciclo de fotoperíodo de 12h/12h. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas propostas pelo Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, do Instituto de Biologia da Unicamp (CEUA/Unicamp) com o protocolo nº1604-1.

3.2. Preparo do Inóculo

Para o preparo do inóculo foi utilizado o isolado virulento de *Plasmodium berghei* cepa NK65, a qual é mantida em nosso laboratório congelada em meio de cultura específico e em nitrogênio líquido. Aproximadamente 14 dias antes da infecção experimental, os animais utilizados para repiques foram infectados com a cepa congelada e quando apresentaram 30% de parasitemia, foi realizada a sangria pelo plexo braquial. O sangue do animal utilizado como repique do parasita foi coletado em tubos com heparina contendo 1 ml de PBS, e em seguida centrifugado por 5 minutos a 380_xg. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* ressuspenso em 1ml de PBS, sendo repetida a centrifugação. O número total de células presente na suspensão foi determinado por contagem em câmara de Neubauer e a suspensão final ajustada para 5x10⁶

hemácias parasitadas/ml para a inoculação. Cada animal foi inoculado intraperitonealmente com 200µl da suspensão final.

3.3. Parasitemia

A parasitemia dos camundongos infectados foi determinada a partir da contagem de hemácias infectadas. Para tanto, foram realizados esfregaços sanguíneos a partir de uma gota de sangue coletado da cauda dos camundongos. Após a secagem do sangue, as lâminas foram tratadas para coloração hematológica estabelecida por Romanowsky através do kit comercial para coloração hematológica “Panótico Rápido” (Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil) e a porcentagem de hemáceas infectadas calculada (parasitemia: hemácias infectadas x 100 / hemácias totais).

3.4. Índice tímico

Animais controle e infectados foram anestesiados com xilazina/quetamina (100 mg/Kg de hidroclorito de quetamina e 5 mg/Kg de cloridrato de xilazina) e em seguida pesados. Em seguida, os timos foram coletados, limpos e pesados. O índice tímico foi calculado a partir da seguinte equação: peso do órgão (g) /peso do animal (g)x100.

3.5. Análise histopatológica

O timo e os linfonodos mesentéricos de animais controle e infectados de todos os grupos experimentais foram coletados e fixados em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M. Após 12 de fixação o órgão foi desidratado em gradiente crescente de etanol (70,80, 85, 90, 95-100%), diafanizado em xilol e incluídos em parafina. Os órgãos foram então submetidos à microtomia para obtenção de cortes histológicos com 5µm de espessura que foram analisados quanto a possíveis alterações estruturais por coloração de hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram montadas e analisadas em microscópio de luz (Olympus, BX50).

3.6. Análise das subpopulações de timócitos

Após o sacrifício dos animais, os timos de todos os grupos experimentais foram retirados e processados para determinação da celularidade por citometria de fluxo. Para tanto, os órgãos foram macerados em 1 ml de PBS-Soro Fetal 10% para obtenção de uma suspensão celular da qual se estimou o número de células presentes por contagem em câmara de Neubauer. Em seguida, as hemácias foram removidas através de lise pela solução de lise de hemácias [(ACK)0.16M NH_3Cl ;0,01M KHCO_3 ;1mM EDTA]. Então, as células foram diluídas em PBS-Soro Fetal Bovino10% e incubadas com anticorpo anti-Fc γ R(Becton Dickinson,San Diego, Califórnia, EUA) para bloqueio da ligação dos anticorpos conjugados via porção Fc. Após lavagens com PBS, as células foram incubadas com os seguintes anticorpos da classe IgG: anti-CD4 conjugado com FITC, anti-CD8 conjugado com PE e anti-CD3 conjugado com PeCy-7 (Pharmingen, San Diego, Califórnia, EUA) por 20 minutos a 4° C seguido por lavagens com PBS e centrifugação por 10 minutos a 380 $\times$ g. As células foram então fixadas com formaldeído 1% e submetidas à leitura no citômetro de fluxo FACsAria (BD Pharmingen, San Diego, Califórnia, EUA).

3.7. Detecção da apoptose por imunohistoquímica - TUNEL

A detecção e quantificação de células em apoptose (morte celular programada) no timo de animais controle e infectados foram determinadas pela técnica do TUNEL (*do inglês, TdT-mediated dUTP nick end labelin*). Do timo incluído em parafina foram obtidos 3 cortes histológicos de 5 μ m em lâmina silanizada. O primeiro corte foi isolado por delimitação de silicone ao seu redor e utilizado como controle negativo, os demais cortes foram utilizados para a marcação experimental. Neste estudo, utilizamos o *kit* comercial *In situ Cell Death Detection Kit, POD* (Roche, Mannheim, Alemanha) a fim de detectar as quebras de DNA simples e dupla

fita que ocorrem nas fases iniciais da apoptose. Os cortes histológicos foram desparafinizados, hidratados, fixados e permeabilizados. Posteriormente, o tecido foi incubado com Proteinase K (10-20 µg/ml em 10 mM Tris/HCl,) por 30 minutos à 37°C seguido por bloqueio da peroxidase endógena (H₂O₂ 3% em metanol) por 30 minutos à temperatura ambiente. Então, o tecido foi incubado com a mistura de reação de TUNEL preparada de acordo com as instruções do fabricante. Durante este período de incubação, a enzima *Terminal deoxynucleotidyl transferase* (Tdt) catalisa a adição de dUTP marcado com fluoresceína em grupos livre 3'-OH do DNA simples e dupla fita. Após a lavagem, a marcação incorporada nos locais danificados do DNA é identificada por um anticorpo anti-fluoresceína conjugado com a enzima peroxidase (POD). Após a lavagem para remoção do conjugado enzimático não ligado, a POD retida no complexo imune é visualizado através de solução contendo o substrato (H₂O₂) e o cromógeno diaminobenzidina (DAB). Controles para o procedimento de TUNEL foram tratados da mesma forma como o experimental, exceto que a enzima TdT foi omitida da mistura de nucleotídeos e foi substituído por dH₂O. As células em apoptose foram identificadas por TUNEL em conjunto com características morfológicas, como contração celular, invaginação de membrana e condensação da cromatina, para a distinção de células apoptóticas e os corpos apoptóticos de células necrosadas. Estes últimos não foram considerados células apoptóticas. De cada corte histológico foi adquirida uma foto digital para contagem das células em apoptose. No total, 500 células foram contadas em cada amostra usando o programa Image J (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, USA) para produzir uma grade e delimitar os campos de contagem. O índice de corpos apoptóticos (ICA) foi realizado por um único observador (C.F.R.) ignorante para o status do animal, e definido como segue: $ICA (\%) = \text{células apoptóticas} / \text{total de células} \times 100$.

3.8. Análise da apoptose por citometria de fluxo

A análise da condição celular (viável ou em processo de apoptose) foi realizada em grupo celular selecionado a partir das seguintes características: (i) tamanho (tamanho e granulose), (ii) integridade da membrana plasmática (coloração por iodeto de propídio, PI) e (iii) redistribuição da fosfatidilserina da membrana plasmática (marcação pela anexina-V). As análises foram realizadas no timo e linfonodos mesentéricos de animais controle e infectados. Após o sacrifício do camundongo, coleta do timo e obtenção da suspensão celular, 1×10^6 timócitos foram incubados com anticorpos monoclonais anti-CD3-PeCy7, anti-CD8-PE, e anti-CD4-FITC (Pharmingen/Becton Dickinson, San Diego, Califórnia, EUA.) por 20 minutos a 4° C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas por 10 minutos a 380_xg. As células foram então ressuspensas em 20ul de Tampão de ligação da Anexina-V (Pharmingen/Becton Dickinson, San Diego, Califórnia, EUA Cat NO 556454) e incubadas com 0,3 mg / ml da anexinaV-APC e 5 mg / ml de iodeto de propídio (PI) por 15 min. Após a incubação, as amostras foram diluídas 4 vezes com o mesmo tampão e analisadas por citometria de fluxo utilizando o equipamento FACsAria (BD Pharmingen, San Diego, Califórnia, EUA). Como controle negativo, para todos os procedimentos de marcação de anexina-V, as células foram lavadas exaustivamente em PBS livre de Ca^{2+} e coradas com anexina-V, na ausência do tampão. A análise dos dados obtidos foi realizada no software FCS Express V3. As células PI positivas foram retiradas da análise dos demais marcadores. As populações celulares CD4⁺ e CD8⁺ foram analisadas no *gate* de células CD3⁺.

3.9. ELISA para detecção de IFN- γ e TNF- α sérico

Para determinação dos níveis séricos de IFN- γ e TNF- α , animais controle e infectados foram anestesiados e o sangue coletado através do plexo braquial. Após centrifugação, o soro foi separado e armazenado à -20°C até análise. A concentração de IFN- γ (pg/ml) e TNF- α (pg/ml) foi determinada através do método de ELISA (*do inglês, Enzyme-linked immunosorbent assay*) de acordo com as instruções do fabricante (*BD Biosciences, San Diego, USA Cat. NO:551866 ; eBioscience, San Diego, USA Cat NO:88-7324-88, respectivamente*).

3.10. Extração de RNA e síntese de cDNA

Após o sacrifício dos animais, os timos foram retirados e submetidos à 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 e em seguida foi adicionado etanol 70%. A solução foi centrifugada 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 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, USA), 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, USA) para posterior utilização em experimentos de quantificação por PCR em tempo real.

3.11. Expressão de genes pró-apoptóticos através de PCR em tempo real

A expressão dos genes relacionados ao processo de morte celular foi avaliada através PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Para cada gene analisado, foi montada uma placa de 96 *wells* compreendendo todos os grupos experimentais em uma única reação. As reações

foram preparadas com o kit comercial *TaqMan PCR Master Mix*TM (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e realizadas no aparelho *ABI Prism 7300* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Diferentes oligonucleotídeos e sondas para a amplificação do controle endógeno RNA 18S (*Hs99999901_s1*) e dos alvos, a saber: caspase7(*Mm00432322_m1*); caspase9 (*Mm03053887_s1*); TNFRSF1a(*Mm01182929_m1*); GzmA(*Mm00439191_m1*); GzmB (*Mm00442834_m1*) ; PGRP (*Mm00437150_m1*); TNFRSF5 (*Mm00441891_m1*); Sgpl-1(*Mm00486079_m1*); GADD45(*Mm00432802_m1*), foram utilizados nos ensaios. A expressão gênica dos genes pró-apoptóticos nos grupos controle e infectados foram representadas como número relativo de cópias através do método do ciclo delta *threshold* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

3.12. Análise por citometria de fluxo das subpopulações de linfócitos nos linfonodos mesentéricos.

Após o sacrifício dos animais, os linfonodos mesentéricos de todos os grupos experimentais foram retirados e processados para análise das subpopulações de células T por citometria de fluxo. Para tanto, os órgãos foram macerados em 1ml de PBS-Soro Fetal 10% para obtenção de uma suspensão celular da qual se estimou o número de células presentes por contagem em câmara de Neubauer. Em seguida, as hemácias foram removidas através do uso de solução de lise de hemácias [(ACK)0.16M NH₃Cl;0,01M KHCO₃;1mM EDTA. Após lavagens com PBS, as células foram incubadas com anticorpo anti-FcγR (Becton Dickinson, San Diego, Califórnia, EUA) para bloqueio da ligação dos anticorpos conjugados via porção Fc. Logo após, as células foram incubadas com os seguintes anticorpos da classe IgG: anti-CD4 conjugado com FITC, anti-CD8 conjugado com PE e anti-CD3 conjugado com PeCy-7 (Pharmingen, San Diego, Califórnia, EUA) por 20 minutos a 4°C seguido por lavagens com PBS e centrifugação por 10 minutos a 380_xg, e em seguida as células foram fixadas em formaldeído 1% e submetidas

à leitura no citômetro de fluxo FACsAria (BD Pharmingen, San Diego, Califórnia, EUA). A análise dos dados adquiridos foi realizada no software FCS Express V3. As populações de timócitos foram analisadas com base em *gate* de células CD3⁺.

3.13. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à Análise de Variância de 1 Via (ANOVA), seguida pelo Teste de Comparações Múltiplas de Dunn, quando ocorreram vários grupos de comparação. Os resultados de índice tímico obtidos dos animais *knockout* para IFN- γ bem como seu respectivo *background* foram submetidos à Análise do teste T para o cálculo do valor de p , ambos através do software *GraphPad Prism* 5.0 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). As amostras foram consideradas estatisticamente diferentes quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$).

4. RESULTADOS

O timo é um órgão alvo de infecções virais, bacterianas e fúngicas. Recentemente, nosso grupo demonstrou que a infecção malárica também é capaz de provocar atrofia tímica após 14 dias de infecção. Diante deste dado o estudo cinético da atrofia tímica e alterações histológicas do órgão em relação ao aumento da parasitemia foram conduzidos para melhor entendimento do efeito da infecção pelo *Plasmodium* no timo.

4.1 Parasitemia

A cepa virulenta de *P. berghei* NK65, caracterizada por ser letal e não induzir a forma cerebral da doença, quando inoculada em camundongos BALB/c apresenta parasitemia com pico aos 14 dias de infecção e 100% de mortalidade no 15º dia pós-infecção (pi) (Figura 2).

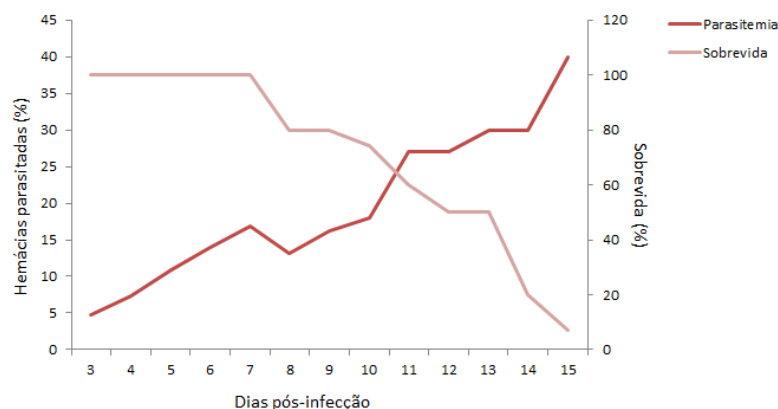


Figura 2. Curva parasitêmica e sobrevivência da infecção malárica pelo *Plasmodium berghei* NK65. Camundongos BALB/c infectados pelo *P.berghei* apresentam hemácias infectadas pelo *Plasmodium* aos três dias de infecção e maior número de hemácias parasitadas após quatorze dias de infecção. No décimo quinto dia pós infecção todos os animais infectados morreram em decorrência da infecção.

4.2 Índice tímico

No decorrer da infecção pelo *Plasmodium berghei* NK65 foi possível observar que o peso relativo do timo de animais infectados sofreu redução gradativa em relação ao peso do timo de animais controle (Figura 3). Neste modelo observa-se que após 5 e 7 dias de infecção

ocorre o início da atrofia tímica com redução do peso relativo do órgão, ainda que não significativa quando comparada ao grupo controle. No décimo dia de infecção a atrofia é maior e significativa em relação ao grupo controle. Já no décimo quarto dia pós-infecção nota-se o menor tamanho do timo, com peso quatro vezes menor que o timo de animais controle. Estes resultados validam dados anteriores do nosso grupo.

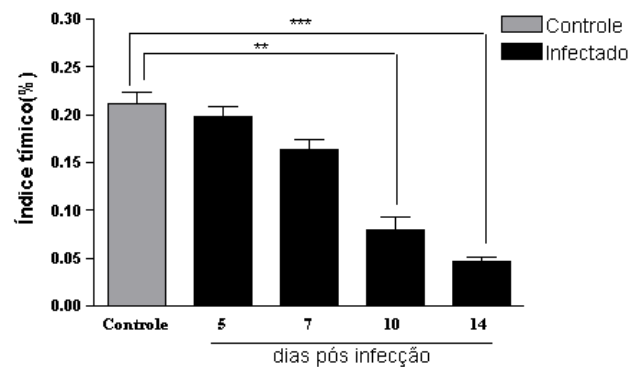


Figura 3. Peso relativo do timo de animais BALB/c controle e inoculados com *P. berghei* NK65, e sacrificados após 5, 7, 10 e 14 dias de infecção. Observa-se gradual perda de peso tímico em animais infectados pelo parasita quando comparado ao grupo controle. Maior atrofia tímica observada ao décimo quarto dia de infecção. Resultados expressos em média $\pm$ SEM de cinco animais diferentes por grupo. ** $p \leq 0.01$ e *** $p \leq 0.001$.

4.3. Análise histopatológica

A integridade do microambiente tímico, caracterizado pelas regiões subcapsular, cortical, junção cortico-medular e medular, está diretamente relacionada com o correto desenvolvimento dos linfócitos T. Em nosso modelo de infecção é possível observar que, embora ocorra redução do peso relativo do timo até o sétimo dia de infecção, este fenômeno não altera a estrutura do órgão, que se apresenta semelhante à estrutura histológica observada nos animais do grupo controle (Figura 4A). Assim, até o sétimo dia de infecção, nota-se as regiões cortical e medular bem definidas, bem como a presença dos septos característicos dos lobos por todo o órgão (Figuras 4B e 4C).

Com a progressão da infecção, após 10 dias da inoculação do parasita, o timo tem seu tamanho reduzido pela metade e sua estrutura apresenta modificações, tais como perda da delimitação cortico-medular e aparente início da redução da porção cortical do órgão (Figura 4D). Já no décimo quarto dia de infecção, quando a atrofia do órgão é mais significativa, observa-se profunda desorganização do microambiente tímico, caracterizada principalmente pela perda da região cortical (Figura 4E).

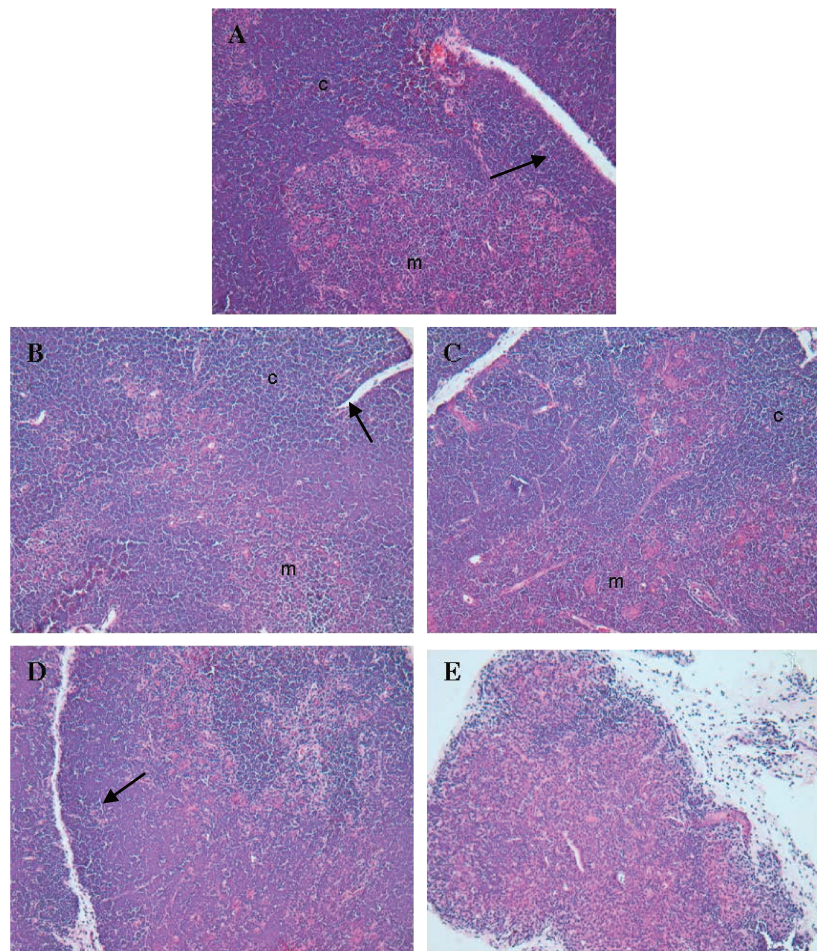


Figura 4. Análise histopatológica do timo de animais BALB/c controle e infectados com *Plasmodium berghei* NK65 corados com HE. Magnitude 200X. **(A)**: Timo de animal controle **(B)** e **(C)**: Timos de animais com 5 e 7 dias de infecção, respectivamente. Notar ausência de alterações histológicas: septos característicos (setas) e delimitação entre as porções cortical e medular. **(D)**: Timo de animal com 10 dias de infecção. Período de início da desorganização estrutural tímica. **(E)**: Timo de animal com 14 dias de infecção o qual apresenta total perda da delimitação cortico-medular. m: região medular; c: região cortical. As fotografias são referentes a um único experimento, porém representativas de todos.

As alterações histológicas caracterizadas pela redução da porção cortical tímica e também a involução tímica observadas no timo de camundongos infectados pelo *Plasmodium* sugeriram que durante a infecção malárica o timo é um órgão alvo e tem sua celularidade alterada. Além disso, um grande número de células apresentando condensação nuclear e fragmentação nuclear (cariorréxis), circundadas por histiócitos e constituindo um padrão de “céu estrelado”, foi observado. A frequência e o número absoluto de timócitos em camundongos infectados e controle foram determinados por citometria de fluxo.

4.4. Frequência e número absoluto das subpopulações de timócitos

Durante a infecção pelo *P. berghei* foram observadas profundas alterações nas subpopulações de timócitos. Em camundongos infectados pelo *Plasmodium berghei* NK65, as frequências de todas as subpopulações linfocitárias foram alteradas em relação ao grupo controle (Figura 5A). No gráfico da figura 4 A é possível observar grande redução na porcentagem de células DP de 76 para 12% enquanto que a porcentagem de timócitos DN, CD4⁺ e CD8⁺ foram aumentadas consideravelmente.

Como a análise histológica do timo atrófico revelou intensa queda na celularidade, foi analisado também o número absoluto das subpopulações dos timócitos. No timo de animais infectados, houve redução no número de timócitos DP, CD4⁺ e CD8⁺ enquanto que foi observado aumento no número de timócitos DN (Figura 5B). Importante destacar que o número de timócitos DP nos animais infectados foi 13 vezes menor que no timo de animais controle. Este dado sugere que a atrofia tímica está relacionada com a grande depleção de timócitos corticais DP.

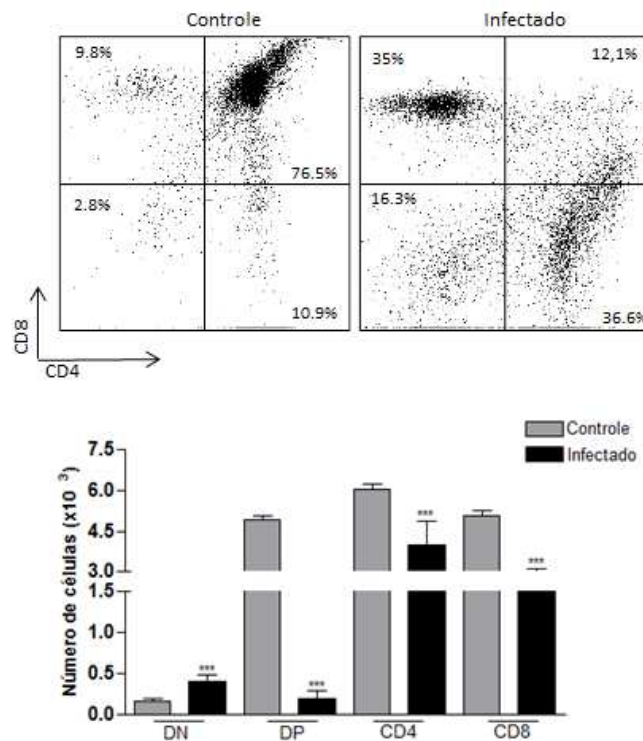


Figura 5: Citometria de fluxo das subpopulações de timócitos. (A) Gráfico tipo “dot plot” representativo das porcentagens das subpopulações de timócitos de animais infectados pelo *Plasmodium* e controles. Nota-se grande redução na porcentagem de timócitos duplo-positivos CD4⁺CD8⁺ em animais infectados. (B) Subpopulações de timócitos de animais controle e infectados em número absoluto. Na infecção malárica ocorre aumento no número absoluto de timócitos duplo-negativos CD4⁻CD8⁻, enquanto que nas demais subpopulações apresentam grande redução no número de timócitos. (DN: CD4⁻CD8⁻, DP: CD4⁺CD8⁺, CD4: CD4⁺CD8⁻, CD8: CD4⁻CD8⁺). Resultados expressos em média ± SEM. ***p<0,001.

Em conjunto, os dados acima apresentados apontam que na atrofia tímica induzida pela infecção pelo *Plasmodium* ocorre intensa perda celular, principalmente de timócitos DP. Uma vez que estas alterações sugerem a ocorrência de apoptose, este tipo de morte celular foi investigado por técnica imunohistoquímica e citometria de fluxo.

4.5. Análise da apoptose pelo método de imunohistoquímica – TUNEL

A análise imunohistoquímica, pela técnica do TUNEL, revelou um padrão difuso de marcação positiva por todo o estroma tímico de animais infectados, indicando aumento da taxa

de morte celular por apoptose durante a infecção malárica, que, se inicia aproximadamente aos 10 dias pós-infecção e apresenta elevado número de células apoptóticas após 14 dias. A distribuição de células TUNEL-positivas nas zonas cortical e medular do timo apresentou-se diferente no timo de animais infectados quando comparado aos controles. Enquanto que, no timo de animais controle as células TUNEL positivas apresentavam-se predominantemente na região cortical, no timo de animais infectados houve aumento de células apoptóticas na porção mais interna do órgão, que corresponde à porção medular no timo de animais controle (Figura 6A).

Para determinação da quantidade de células apoptóticas, as células marcadas foram contadas e o índice de corpos apoptóticos (ICA) foi obtido como porcentagem de células em apoptose em relação ao número total de células do timo. Esta análise mostrou alterações significativas em animais com 14 dias de infecção, quando comparados com os controles (Figura 6B).

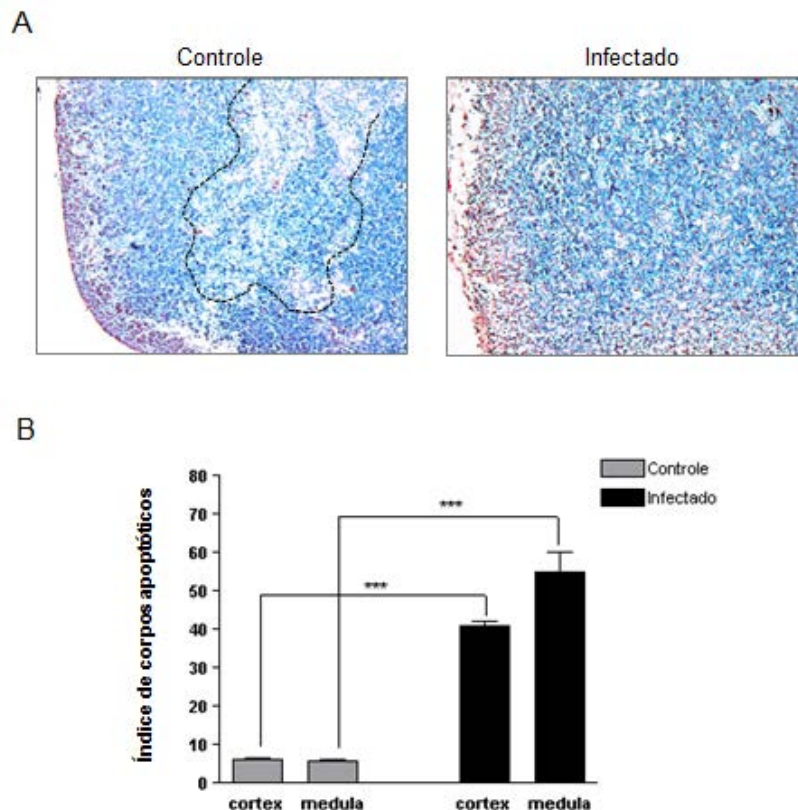


Figura 6. Análise da apoptose pela técnica do TUNEL. (A) Detecção de núcleos apoptóticos nas regiões cortical e medular no timo de animais controle e infectados pelo *Plasmodium* após 14 dias de infecção. No timo de animais

infectados observa-se aumento de células com núcleo apoptóticos, concentradas principalmente na região medular. Magnitude 100X. As fotografias são referentes a um único experimento, porém representativas de todos. (B) O gráfico representa a porcentagem de núcleos apoptóticos nas regiões cortical e medular no timo de animais controle e infectado pelo *P. berghei*. O grupo infectado apresenta aumento significativo de núcleos apoptóticos em relação ao grupo controle. Resultados expressos em média $\pm$ SEM de cinco animais diferentes por grupo. *** $p \leq 0.001$.

4.6 Análise da apoptose por citometria de fluxo

Como a detecção de apoptose pelo método imunoistoquímico pode, potencialmente, detectar células não apoptóticas, a análise da presença de resíduos de fosfatidilserina (PS) na membrana plasmática da célula, que ocorrem nos estágios iniciais de apoptose, foi realizada por citometria de fluxo. Uma vez que alterações na membrana plasmática também ocorrem em células necróticas, a marcação dupla das células para anexina-V e iodeto de propídio (PI), marcador de ácido nucléico impermeável à membrana, é essencial.

Na infecção malárica, o timo de animais infectados apresentou aumento no número de células anexina-V positivas, bem como aumento no número de células anexina-V/PI positivas (Figura 7A). Estes dados revelam que na infecção malárica ocorre apoptose de timócitos durante todo o curso da infecção uma vez que, a marcação dupla (anexina-V/IP) caracteriza células em processo de apoptose tardio.

A análise fenotípica das diferentes subpopulações de timócitos revelou que os linfócitos $CD4^+CD8^+$ (DP, duplo positivos), $CD4^-CD8^-$ (DN, duplo negativo) e $CD8^+$ ($CD8^+$ simples positivos) de camundongos infectados apresentam elevado número de células Anexina-V positivas quando comparado ao grupo controle. O aumento de células Anexina-V positivas justifica, parcialmente, a hipótese de que a redução do número absoluto destes subtipos linfocitários no timo de animais infectados é devido a apoptose. Não foi observada alteração no percentual de células $CD4^+$ -AnexinaV positivas (Figura 7B).

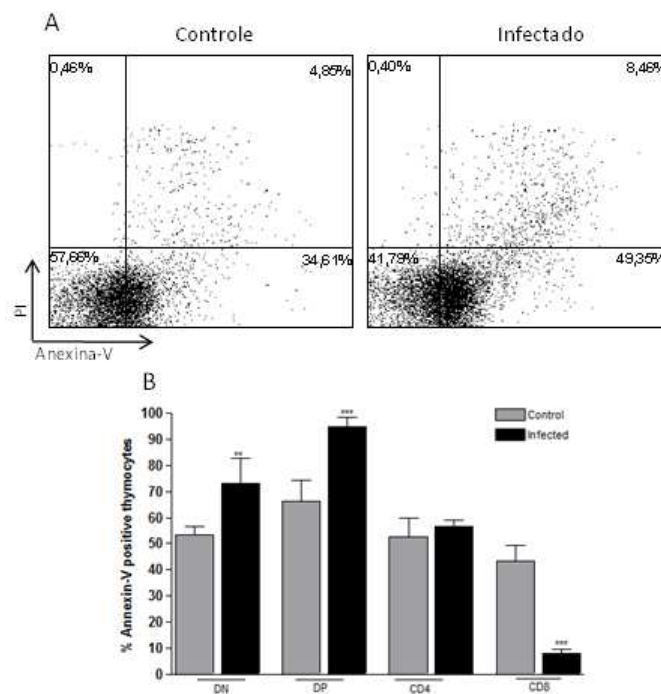


Figura 7: Análise da expressão de Anexina-V nas subpopulações de timócitos por citometria de fluxo. (A) Porcentagem de células que expressam Anexina-V/PI. (B) Subpopulações de timócitos de animais controle e infectados relativo de timócitos que expressam Anexina-V. (**DN:** CD4⁻CD8⁻, **DP:** CD4⁺CD8⁺, **CD4:** CD4⁺CD8⁻, **CD8:** CD4⁻CD8⁺). Resultados expressos em média $\pm$ SEM de cinco animais diferentes por grupo. ** $p \leq 0.01$ e *** $p \leq 0.001$.

O processo de apoptose envolve a ativação de caspases que iniciam uma cascata de eventos que culminam no estímulo final para a morte da célula. A via das caspases é ativada por receptores como TNF e Fas além de elementos como perforina e granzima, liberados pelos linfócitos citotóxicos. Citocinas inflamatórias como o IFN- γ também são capazes de provocar a morte de timócitos quando em concentrações aumentadas.

Para análise do papel das citocinas IFN- γ e TNF α no processo de apoptose observado em nosso modelo experimental, camundongos *knockout* para estas citocinas foram infectados e tiveram seus timos retirados para determinação do índice tímico e análise histopatológica. Como estes animais eram da linhagem C57BL/6, as análises também foram realizadas em

camundongos com o mesmo arcabouço genético, porém sem alterações para estas citocinas (“Wild Type”), para fins de comparação com a linhagem Balb/c.

4.7. Dosagem sérica de IFN- γ e TNF- α - ELISA

As vias de apoptose podem ser ativadas, direta ou indiretamente, por diferentes citocinas. Assim, embora o Interferon gama (IFN- γ) não seja capaz de estimular diretamente a apoptose, esta citocina é capaz de estimular determinados tipos celulares, como, por exemplo, macrófagos, a produzirem TNF- α que por sua vez provoca a morte celular, através da ativação da via das caspases.

Na infecção por *Plasmodium* é possível observar que a concentração de IFN- γ no soro de animais infectados é maior em todos os grupos de infecção quando comparados ao grupo controle. Interessante notar que a concentração desta citocina obedece a uma cinética, onde os maiores níveis são observados no início da infecção (após 5 e 7 dias de infecção).

No grupo de animais com 10 dias de infecção houve redução significativa quando comparado ao grupo de 5 dias pós infecção (dpi). Os níveis séricos de animais infectados 14 dpi não apresentou alterações, mostrando-se semelhantes aos observados no grupo de animais controle (Figura 8).

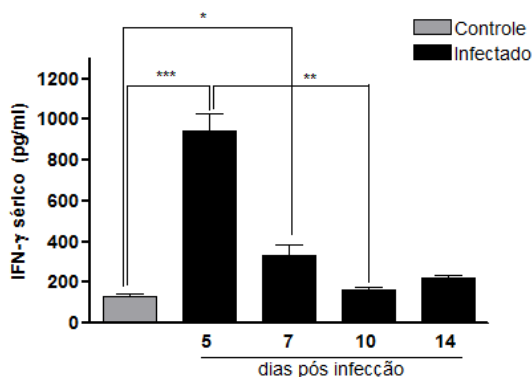


Figura 8. Dosagem sérica de IFN- γ nos grupos de animais controle e infectados pelo *Plasmodium berghei* pelo método de Elisa (do inglês: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Animais sacrificados 5 e 7 dias após a infecção apresentaram aumento significativo na concentração de IFN- γ no soro quando comparado ao grupo controle. O aumento da concentração de IFN- γ no soro de animais sacrificados após 10 e 14 dias de infecção não foi

significativo em relação ao grupo controle. No decorrer da infecção observa-se queda significativa na concentração sérica de IFN- γ quando comparados animais infectados e sacrificados após 10 dias de infecção com o grupo controle. Resultado expressos em média $\pm$ SEM de cinco animais diferentes por grupo. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

O receptor de TNF- α (TNFR) é expresso na superfície da membrana celular, e quando ligado à citocina inicia uma cascata de sinais que ativam a via das caspases iniciadora da apoptose. Na infecção malárica, os dados da dosagem sérica de TNF- α demonstram elevação gradativa do nível de TNF- α conforme o desenvolvimento da doença. Embora ocorra redução significativa aos 5 dias de infecção, nota-se que nos animais em estágio mais avançado da doença (10 e 14 dpi) o valor médio chega a 80pg/ml, dez vezes maior que o grupo controle (Figura 9).

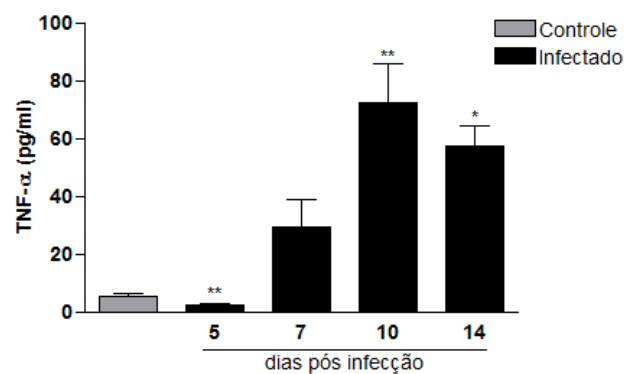


Figura 9. Dosagem sérica de TNF- α nos grupos de animais controle e inoculados com *Plasmodium berghei* pelo método de Elisa (do inglês: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Após 5 dias de infecção nota-se redução estatisticamente significativa da concentração de TNF- α em relação ao controle. Animais infectados após 7, 10 e 14 dias de infecção, entretanto, apresentaram aumento significativo na concentração de TNF- α no soro quando comparado ao grupo controle. Resultados expressos em média $\pm$ SEM de cinco animais diferentes por grupo. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

No início da infecção malárica, ainda quando a parasitemia é baixa, ocorre aumento dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-15.

Neste estudo, demonstrou-se que há aumento dos níveis séricos de IFN- γ após 5 dias de infecção pelo *Plasmodium*. É provável que a secreção de IFN- γ aumentada no timo de

camundongos infectados logo no início da infecção promova a morte de timócitos corticais colaborando para a atrofia tímica observada no décimo quarto dia de infecção. Entretanto, a concentração sérica de TNF- α elevou-se paralelamente com o aumento da parasitemia. O TNF- α liga-se ao seu receptor TNFR-1, expresso na superfície celular, ativando uma cascata de sinalização que culmina na morte celular. Interessantemente, a maior concentração de TNF- α foi observada após dez dias de infecção malárica, data a partir da qual houve início da atrofia tímica significativa e alterações histológicas no timo de animais infectados pelo *Plasmodium*. Estes dados sugeriram fortemente a participação das citocinas IFN- γ e TNF- α na apoptose dos timócitos durante a infecção malárica.

A fim de avaliar o papel destas citocinas na patologia tímica, analisamos o timo de camundongos *knockout* para IFN- γ e TNFR1. Uma vez que os camundongos geneticamente modificados foram estabelecidos na linhagem C57BL/6, e nosso modelo de infecção está estabelecido em camundongos BALB/c, o estudo da infecção pelo *Plasmodium berghei* NK65 no camundongo C57BL/6 “wild type” também foi realizado com o objetivo de validar os dados encontrados nos camundongos *knockout*.

4.8. Análise da influência do IFN- γ e TNF na atrofia tímica

4.8.1 Índice tímico e análise histológica C57BL/6

Camundongos C57BL/6 “wild type” foram inoculados com 10^6 hemácias parasitadas e sacrificados após 14 dias de infecção seguindo mesmo protocolo utilizado na infecção de camundongos BALB/c. Como pode ser observado na figura 10A o timo de camundongos controle apresentou peso relativo dentro do esperado, enquanto que o timo de animais infectados pelo parasita apresentou profunda atrofia tímica.

A análise histopatológica do timo de animais C57BL/6 controle revelou que o órgão apresenta as características padrão descritas na literatura: região cortical e medular preservadas com a delimitação cortico-medular bem definidas, cápsula e septos conservados. Em timo de animais infectados houve profunda desorganização do microambiente tímico caracterizada pela perda da delimitação cortico-medular, ausência de cápsula e septos e presença de corpos apoptóticos (Figura 10B). Estes resultados nos permitiram avaliar os camundongos *knockout* comparativamente com os dados achados nas infecções da linhagem BALB/c.

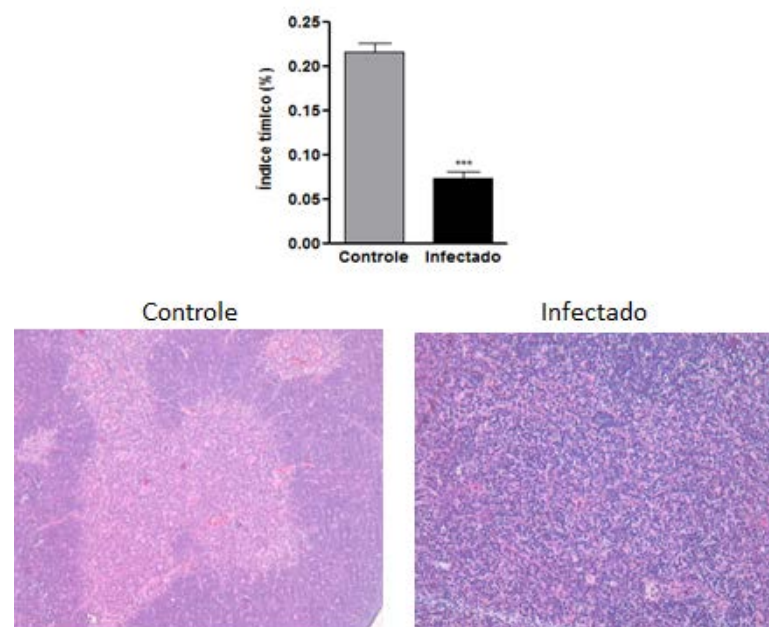


Figura 10. (A) Índice tímico de animais C57BL/6 controle e infectados com *P. berghei*. Nota-se redução do peso relativo do timo em animais infectados quando comparado ao grupo controle. Resultados expressos em média $\pm$ SEM de cinco animais diferentes por grupo. *** $p \leq 0,001$. (B) Análise histopatológica de timo de animais controle (100x) e infectados (200x) corados com HE. Em timo de animais controle observa-se as regiões cortical (c) e medular (m) com delimitação cortico-medular preservada, enquanto que no timo de animal infectado há desestruturação do microambiente tímico caracterizada pela perda da delimitação cortico-medular. As fotografias são referentes a um único experimento, porém representativas de todos.

4.8.2 Índice tímico e análise histológica C57BL/6 *knockout* para IFN- γ

O grupo de animais *knockout* (KO) para IFN- γ e infectados com o *Plasmodium* apresentou significativa atrofia tímica quando comparado ao grupo controle (Figura 11A), indicando que o IFN- γ não exerce influência direta sobre o processo da atrofia tímica.

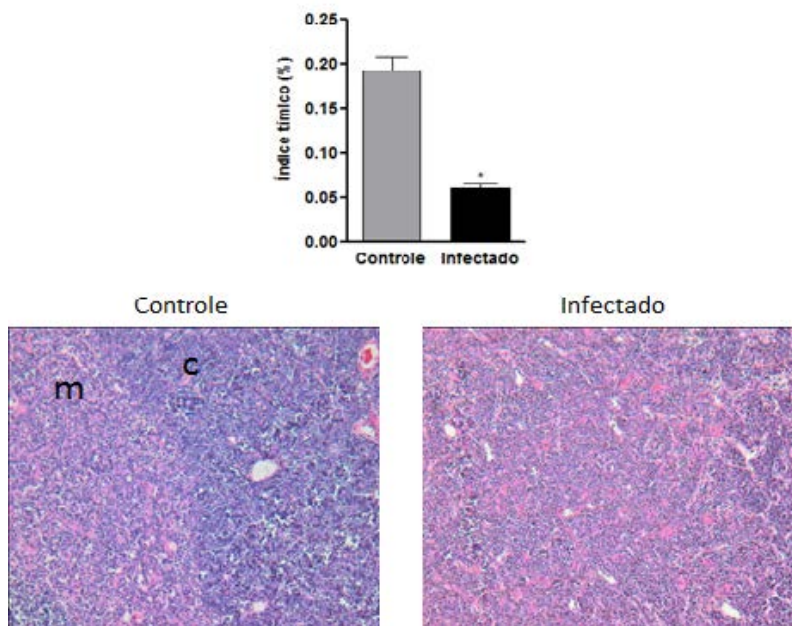


Figura 11. (A) Índice tímico de animais C57BL/6 KO para IFN- γ controle e infectados com *P. berghei*. Nota-se redução do peso relativo do timo em animais infectados quando comparado ao grupo controle. Resultados expressos em média $\pm$ SEM de cinco animais diferentes por grupo. $*p \leq 0,05$. (B) Análise histopatológica de timo de animais controle e infectados corados com HE. Em timo de animais controle observa-se as regiões cortical (c) e medular (m) com delimitação cortico-medular preservadas, enquanto que no timo de animal infectado há desestruturação do microambiente tímico caracterizada pela perda da delimitação cortico-medular. Magnitude 200X. As fotografias são referentes a um único experimento, porém representativas de todos.

4.8.3 Índice tímico e análise histológica C57BL/6 *knockout* para TNFR-1

Na ausência do receptor de TNF, o camundongo apresenta redução do índice tímico quando comparado ao grupo controle C57BL/6 “wild type”. Contudo, quando infectados pelo *Plasmodium* o grupo KO para TNFR1 apresentou redução do peso tímico relativo e estatisticamente significativo quando comparado ao seu grupo controle (Figura 12A).

A análise histopatológica do timo de animais KO para TNFR1 revelou que fisiologicamente o timo destes animais apresenta redução da região medular, com precária delimitação cortico-medular. Em timo de camundongos KO para TNFR1 infectados com o parasita houve manutenção do microambiente tímico com delimitação cortico-medular mesmo apresentando índice tímico reduzido. Ainda, foi possível observar que, em timo de animais infectados há formação de granulomas e corpos apoptóticos (Figura 12B).

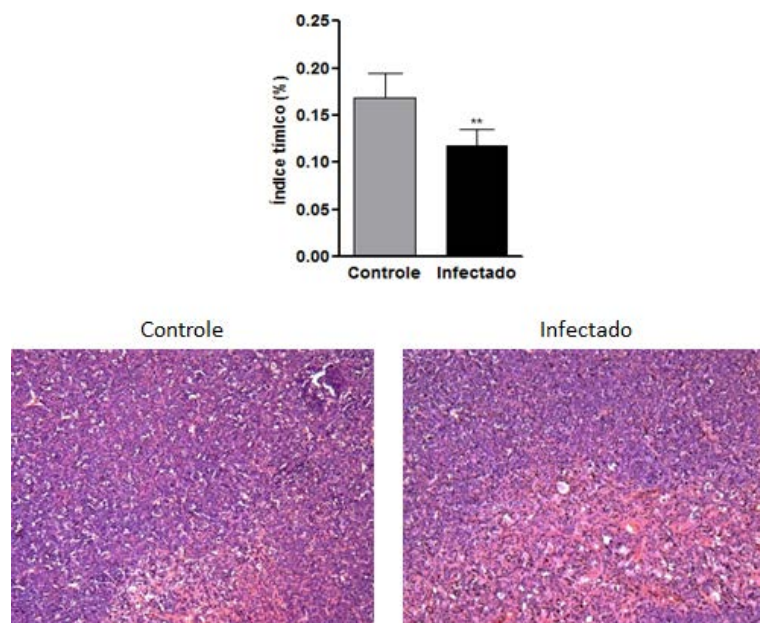


Figura 12. (A) Índice tímico de animais C57BL/6 KO para TNFR controle e infectados com *P.berghei*. Nota-se redução do peso relativo do timo em animais infectados quando comparado ao grupo controle. Resultados expressos em média $\pm$ SEM de cinco animais diferentes por grupo. ** $p < 0,01$. (B) Análise histopatológica de timo de animais controle e infectados corados com HE. Nota-se manutenção das regiões cortical (c) e medular (m) no timo de animais controle e infectados, contudo o timo de animais infectados apresentam corpos apoptóticos no estroma. Magnitude 200X. As fotografias são referentes a um único experimento, porém representativas de todos.

Os mecanismos que compreendem o processo da apoptose são extremamente complexos e sofisticados, envolvendo eventos moleculares em cascata com gasto energético. Existem duas vias principais: a extrínseca, ou via dos receptores de morte, e a intrínseca, ou via mitocondrial. Existe outra via adicional que envolve a citotoxicidade de linfócitos T dependente da liberação de

grânulos de granzima e perforina que provocam a morte da célula. As vias extrínseca, intrínseca e da granzima-B convergem na mesma molécula terminal ou via de execução. Esta via é iniciada pela clivagem da caspase-3 que resulta, dentre outros eventos, na (i) fragmentação do DNA, (ii) degradação do citoesqueleto e proteínas nucleares, (iii) *cross-linking* de proteínas e (iiii) formação de corpos apoptóticos. A via da granzima A ativa em paralelo, uma via caspase-independente de morte através da clivagem de DNA simples fita. Diante dos dados que comprovam a morte prematura dos timócitos no modelo experimental de atrofia tímica na infecção malárica, foi investigada a expressão de genes pró-apoptóticos neste modelo.

4.9. Análise da expressão de genes pró-apoptóticos

Para avaliar a(s) via(s) de ativação relacionada(s) ao processo de morte celular dos timócitos no modelo de infecção pelo *Plasmodium*, foi analisada, por PCR em tempo real (RT-qPCR), a expressão de nove genes pró-apoptóticos, a saber: PGRP, TNFR1 e TNFR5 (reguladores da via extrínseca) e Casp7, Casp9, Gzma, Gzmb, SGPL-1 e GADD45 (reguladores da via intrínseca).

A expressão de genes pró-apoptóticos no timo de animais infectados pela malária apresentou-se relacionado ao desenvolvimento da atrofia tímica. Foi observado que após 14 dias de infecção a expressão de todos os genes está muito reduzida em relação ao grupo controle e aos demais períodos de infecção (Figura 13).

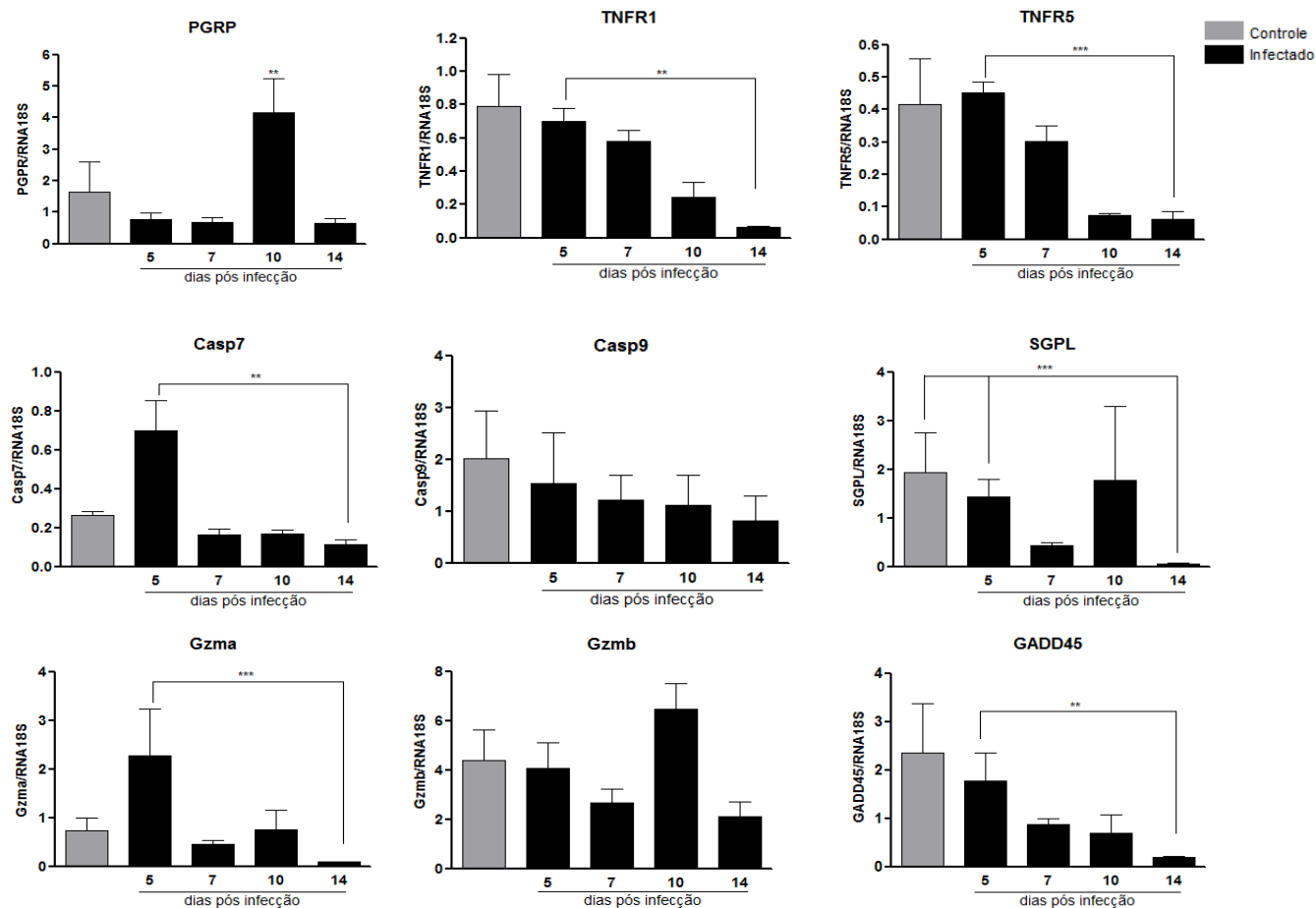


Figura 13. Expressão de genes pró-apoptóticos no timo de camundongos infectados pelo *Plasmodium berghei* NK65 por meio de PCR em tempo real. PGRP indica proteína de reconhecimento de peptidioglicanos, TNFR1: membro da superfamília de receptor do fator de necrose tumoral 1A; TNFR5: membro da superfamília de receptor do fator de necrose tumoral 5, Gzma: granzima A; Gzmb: granzima B; SGPL: sfingosina fosfato liase 1; Gadd45: indutor de dano ao DNA 45 gamma; Casp9: caspase 9 e Casp 7: caspase 7. Resultados expressos em média $\pm$ SEM de cinco animais diferentes por grupo. ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

Nos genes da via extrínseca houve aumento da expressão do gene TNFR5 após 5 dias de infecção, enquanto que o gene PGRP apresentou aumento da expressão somente no décimo dia pós-infecção. O gene TNFR1 não apresentou aumento de expressão quando comparado ao grupo controle e, ainda, sua expressão foi reduzida drasticamente até o décimo quarto dia de infecção.

A expressão do gene para Gzma e para Casp7 apresentou aumento no início da infecção. Os genes para Casp9, GADD45, SGPL não apresentaram aumento de expressão no timo de

camundongos infectados quando comparados ao grupo controle. Já a expressão de SGPL foi reduzida significativamente no timo de animais infectados em comparação ao grupo controle.

Em nosso modelo experimental, os timócitos apresentaram alta taxa de apoptose. Entretanto, o número relativo e absoluto de timócitos ausentes no timo de animais infectados não é justificado pelo valor total de timócitos Anexina-V positivos. Diante deste dado, a hipótese de que uma emigração precoce das células do timo para órgãos linfóides secundários também poderia ser responsável pela severa atrofia observada durante a infecção pelo *Plasmodium* não pôde ser descartada. Levando-se em consideração que neste tipo de infecção o parasita se aloja inicialmente no fígado, que a inoculação experimental do parasita se dá pela via intraperitoneal e ainda que, resultados anteriores de nosso laboratório não demonstraram a presença do parasita no baço, possíveis alterações nos linfonodos mesentéricos foram avaliadas.

4.10 Análise histológica dos linfonodos mesentéricos (MLNs)

Linfonodos mesentéricos de camundongos controle apresentaram estrutura histológica conforme o esperado. É possível observar que o linfonodo do animal controle apresenta seu parênquima com grande número de células, com as regiões cortical, para cortical (ou cortical profunda) e medular bem definidas, além da presença de folículos linfáticos (centro de linfócitos B) inalterados. Em contrapartida, no linfonodo de animais infectados pelo *Plasmodium* foi observado um parênquima esparso, com presença de granulomas e corpos apoptóticos, além de região cortical superficial difusa com presença de regiões claras no interior do nódulo. As regiões claras no interior do nódulo (ocupadas por macrófago) são somente observadas em linfonodos previamente ativados por antígeno, indicando que o linfonodo desenvolveu uma resposta imune contra o *Plasmodium* (Figura 14).

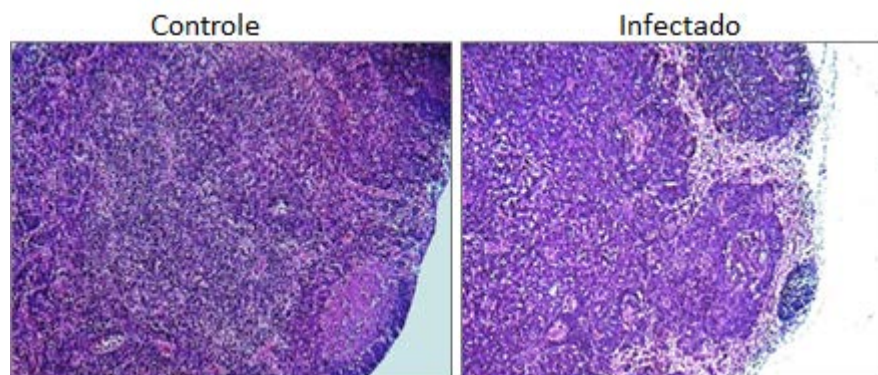


Figura 14. Análise histopatológica do linfonodo mesentérico de animais BALB/c controle e infectados com *Plasmodium berghei* NK65 corados com HE. Magnitude 100X. No linfonodo mesentérico de animais infectados há perda celular bem como formação de estruturas de resposta antigênica nos folículos linfóides (seta) e granulomas, enquanto que o linfonodo de animais controle apresentou histologia sem alterações. As fotografias são referentes a um único experimento, porém representativas de todos.

A celularidade reduzida no MLN de animais infectados observada na análise histológica é sugestiva da presença de apoptose durante a infecção malárica e, também, que as subpopulações linfocitárias sofrem alterações em sua frequência no órgão. Assim, sabendo que alterações tímicas modificam o padrão de migração dos timócitos e que os órgãos linfóides secundários

refletem essas alterações, avaliamos os linfonodos mesentéricos de animais controle e infectados pela malária.

4.11. Análise da expressão de Anexina-V e subpopulações linfocitárias no linfonodo mesentérico

4.11.1 Análise de células Anexina-V positivas no linfonodo mesentérico

A análise por citometria de fluxo de linfócitos totais presentes no linfonodo mesentérico (MLN), e caracterizados pelo marcador $CD3^+$ revelou que animais infectados apresentam redução significativa de linfócitos quando comparados ao grupo controle (Figura 15A), e que esta redução é justificada pelo aumento de linfócitos Anexina-V positivos (Figura 15B).

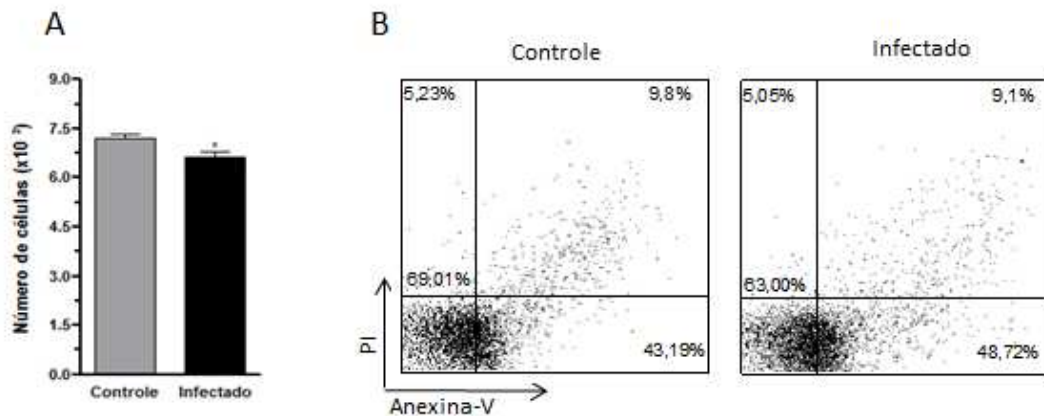


Figura 15: Análise da expressão de Anexina-V em linfócitos T por citometria de fluxo. (A) Número absoluto de linfócitos $CD3^+$. Houve redução no número de linfócitos no linfonodo mesentérico de animais infectados em relação ao grupo controle. Resultados expressos em média $\pm$ SEM de cinco animais diferentes por grupo. $*p \leq 0,05$. (B) Porcentagem de linfócitos $CD3^+$ que expressam Anexina-V e Iodeto de Propídio (PI). No linfonodo de animais infectados observa-se aumento de 5% de células Anexina-V positivas em relação ao grupo controle, indicando aumento de morte celular por apoptose em timo de animais infectados pelo *Plasmodium berghei*.

4.11.2 Análise das subpopulações linfocitárias no linfonodo mesentérico

A frequência das subpopulações linfocitárias no MLN foi analisada por citometria de fluxo. No MLN de animais infectados, as frequências de linfócitos apresentaram significativas alterações quando comparadas ao grupo controle. Em camundongos infectados houve aumento significativo na frequência de DP de DN (Figura 16A). Ainda, foi observada redução significativa do número de linfócitos TCD4⁺ seguido pelo aumento de TCD8⁺ (Figura 16B).

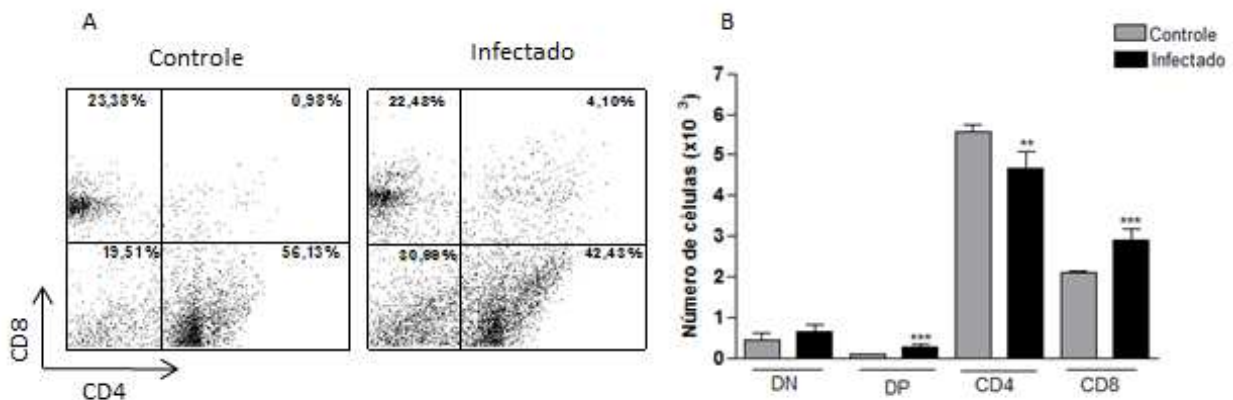


Figura 16: Análise das subpopulações linfocitárias no linfonodo mesentérico de animais controle e infectados por citometria de fluxo. (A) Porcentagem de células. É possível observar aumento na porcentagem de linfócitos DN e DP, acompanhados pela redução na porcentagem de linfócitos simples positivos CD4⁺ e CD8⁺ no linfonodos mesentéricos de animais infectados em relação aos controles. (B) Subpopulações de timócitos de animais controle e infectados em número absoluto. Nota-se em animais infectados pelo *Plasmodium* aumento significativo no número de linfócitos DN, DP e CD8⁺, enquanto que não houve alteração no número de linfócitos CD4⁺ (DN: CD4⁺CD8⁻, DP: CD4⁺CD8⁺, CD4: CD4⁺CD8⁺, CD8: CD4⁻CD8⁺). Resultados expressos em média $\pm$ SEM de cinco animais diferentes por grupo. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0.001$.

5. DISCUSSÃO

A manutenção do microambiente tímico é essencial para o desenvolvimento dos linfócitos T. Para que os precursores provenientes da medula óssea amadureçam em linfócitos T simples positivos (SP), CD4⁺ ou CD8⁺, é necessário que as células imaturas transitem pelas regiões cortical e medular recebendo estímulos e sinais que promovem sua diferenciação. Também, a manutenção da arquitetura tímica é crucial para que ocorram os eventos de seleção positiva e seleção negativa que garantem a exportação de linfócitos T funcionais e tolerantes aos antígenos próprios para a periferia do sistema imune (ANDERSON, 2007; TAKAHAMA, 2006; CIOFANI & ZUNINGA, 2007; PETRIE & ZUNINGA, 2007; VICENTE *et al.*, 2010).

Embora o timo seja o único órgão responsável pela geração de células T, ele não é um órgão protegido de distúrbios do sistema fisiológico. A literatura apresenta diferentes trabalhos relatando que o timo é um órgão alvo em infecções virais, bacterianas, fúngicas, helmínticas e por protozoários, bem como frente a alterações metabólicas através da diabetes experimental induzida por Aloxana. (VERINAUD, *et al.* ; 1998; BRITO, *et al.* , 2003; SOUTO, *et al.*, 2003; NAGIB, *et al.*, 2010; SEIXAS & OSTLER, 2005; SAVINO, 2006). Durante estas infecções é observado profundo acometimento tímico caracterizado pela redução do peso relativo (atrofia) do órgão acompanhada pela perda da delimitação cortico-medular e aparente perda da porção cortical do timo (revisado por SAVINO, 2006; SAVINO, *et al.* , 1986; SODORA, *et al.* , 2002; BRITO, *et al.* , 2003; SOUTO, *et al.* , 2003; SEIXAS & OSTLER, *et al.* , 2005; COTA-DE-ALMEIDA, *et al.* , 2003)

Anteriormente, nosso grupo demonstrou que na infecção letal pelo *Plasmodium berghei* NK 65 o timo também é um órgão alvo. Após quatorze dias de infecção, que coincide com o pico

de parasitemia, é observada profunda atrofia tímica acompanhada pela intensa desorganização estrutural caracterizada pela perda da delimitação cortico-medular. Ainda, o parasita foi encontrado no estroma tímico. (ANDRADE, *et al.*, 2008).

No presente trabalho, o estudo cinético do comprometimento tímico durante a infecção malárica revelou que ocorre redução progressiva do peso relativo do órgão. A partir do quinto dia pós-infecção, e em paralelo ao aumento da parasitemia, o timo tem seu tamanho reduzido gradualmente. O menor tamanho relativo do timo foi observado no pico da parasitemia (40% de hemácias parasitadas, no décimo quarto dia pós-infecção). Contudo, houve comprometimento da arquitetura tímica somente a partir do décimo dia pós-infecção, quando houve início da redução da porção cortical dos lobos tímicos.

A atrofia tímica está diretamente relacionada ao aumento da parasitemia também na infecção por *T. cruzi*. Nesta infecção a redução do peso relativo do timo ocorre em paralelo com a progressão da doença sugerindo que as alterações tímicas ocorrem em decorrência da ação do parasita no órgão (PEREZ, *et al.*, 2007). Na infecção malárica, o parasita é encontrado no estroma tímico após 14 dias de infecção, entretanto, os mecanismos pelos quais o *Plasmodium* chega ao timo e provoca as alterações tímicas observadas nesta infecção ainda não são conhecidos.

Em face da natureza dinâmica do timo, é provável que a presença do *Plasmodium* no órgão interfira nos processos de seleção positiva e/ou negativa, resultando na morte prematura e excessiva dos timócitos. De fato, observamos aumento no número de células apoptóticas no timo de camundongos infectados pelo *Plasmodium*. Este resultado é bem plausível uma vez que os timócitos passam pelos processos de seleção positiva e negativa constantemente e ambos os

processos envolvem a apoptose. Desta maneira, é possível que o aumento da apoptose seja a causa da depleção de linfócitos no timo de camundongos infectados.

Na infecção malárica não letal pelo *Plasmodium chabaudi chabaudi* (AS), foi observado depleção das subpopulações simples positivas CD4⁺ e CD8⁺ (SEIXAS & OSTLER, 2005). Enquanto que, em nosso modelo experimental letal, observamos também a profunda perda de células imaturas DP, sugerindo que o comprometimento das subpopulações imaturas está relacionado à severidade da doença. Como a infecção pelo *Plasmodium berghei* NK65 é letal, o camundongo não consegue eliminar a infecção e morre em decorrência da alta parasitemia. Não é claro se, em um modelo não letal de infecção, o timo é capaz de reverter à atrofia após a eliminação do parasita. Para tanto, estão sendo conduzidos experimentos em nosso laboratório utilizando doses menores de inóculo e também desenvolvendo outra patologia concomitantemente à infecção malárica a fim de desenvolver uma infecção não letal.

Em diversas infecções, como por exemplo, doenças virais como a AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida) (SAVINO, *et al.*, 1986; SODORA, *et al.*, 2002; DOUEK, *et al.*, 2001; NAPOLITANO, *et al.*, 2002) e a raiva (MARKOVISTZ, *et al.*, 1994; CARDENAS-PALOMO, *et al.*, 1995; LAFON, *et al.*, 1994) infecções bacterianas experimentais, como turalemia (ITO, *et al.*, 1985; CHEN, *et al.*, 2005; WATSON, *et al.*, 1984) e listeriose (WATSON, *et al.*, 1984), doenças causadas por parasitas, incluindo o *T. cruzi* (SAVINO, *et al.*, 1989; LEITE DE MORAES, *et al.*, 1995; LEITE DE MORAES, *et al.*, 1992; HENRIQUE PONS *et al.*, 2004; MUCCI, *et al.*, 2002), *Plasmodium chabaudi* (SEIXAS & OSTLER, 2005), *Schistosoma mansoni* (WELLHAUSEN & BOROS, 1982; SAVINO, *et al.*, 1982; SAVINO, *et al.*, 1990) e *Trichinella spiralis* (LJUNGSTROM & HULDT, 1977) e infecções fúngicas experimentais, como *Paracoccidioides brasiliensis* (BRITO, *et al.*, 2002; SOUTO, *et al.*, 2003) e *Histoplasma*

capsulatum(WATSON, *et al.*,1983), a redução da região cortical corresponde à numerosa apoptose de timócitos corticais. Em alguns casos, a perda de timócitos é tão grande que a região cortical dos lóbulos tímicos praticamente desaparece em consequência da depleção de timócitos duplo positivo, CD4⁺ e CD8⁺ (revisado por SAVINO, 2006).

Em nosso modelo experimental, o aumento de células apoptóticas não se limitou somente à região cortical. Corpos apoptóticos na região medular também foram observados, indicando aumento no processo de apoptose independente da subpopulação linfocitária.

Os mecanismos patológicos pelos quais a infecção malárica aumenta a apoptose no timo requerem mais investigações. Entretanto, é provável que o aumento de estímulos apoptóticos esteja associado à “condição geral de estresse” das infecções agudas (OYA, *et al.*, 2000; SRICHAIKUL, *et al.*, 1967), que pode contribuir para a imunodeficiência e desregulação da resposta imune, e ainda à anemia característica da malária (McDEVITT, *et al.*, 2004; SALMON, *et al.*, 1997; WICKRAMASINGHE, *et al.*, 1989).

Durante a infecção pelo *Plasmodium* ocorre secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias pelas células do hospedeiro a fim de controlar a parasitemia e também, eliminar o parasita (TAYLOR-ROBINSON,1995; WINKLER,S, *et al.*, 1998). Todavia, as citocinas pró-inflamatórias estão fortemente relacionadas ao desenvolvimento das patologias que caracterizam a infecção malárica (ELLOSO, *et al.*, 1994;GOODIER, *et al.*, 1995;SEIXAS & LANGHORNE, 1999;VAN DER HEYDE, *et al.*, 1995).

As citocinas também estão envolvidas na atrofia tímica. Citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF e IFN) são sabidamente produzidas em resposta a uma infecção sistêmica ou injúria e contribuem para a involução tímica na patologia. No timo, o TNF apresenta função indutora de apoptose dos timócitos (HERNANDEZ-CASELLES & STUTMAN, 1993). No presente estudo,

o aumento gradativo da concentração de TNF-alfa, concomitante com o desenvolvimento da infecção malárica e atrofia tímica, aponta a participação desta citocina na morte dos timócitos. Ainda, quando infectados pelo *Plasmodium berghei*, embora tenham apresentado timo atrófico, os animais TNFR1^{-/-} não apresentaram alterações na estrutura tímica, mantendo as regiões cortical e medular, indicando que a apoptose nos timócitos pode ser ativada pelo receptor de morte TNFR1 e seu ligante TNF-alfa. A este respeito, a literatura relata que o TNF-alfa é secretado na atrofia tímica induzida por bactérias Gram positivas e Gram negativas, podendo ser o fator indutor da morte de timócitos (WANG, *et al.*, 1994;ZHANG, *et al.*, 1993). O TNF-alfa desempenha um papel muito importante e, provavelmente crítico, ao mediar a apoptose de timócitos CD4⁺/CD8⁺ via AMP cíclico (GUEVARA, *et al.*, 2000). Também foi demonstrado que a administração de anticorpos anti-TNF é capaz de inibir, quase que completamente, a atrofia tímica induzida por micobactérias (OSEKI, *et al.*, 1997). Ainda, a linfotoxina (anteriormente conhecida como Fator de Necrose Tumoral-beta) inibe a diferenciação intratímica de células T, a atrofia tímica e a morte de timócitos CD4⁺/CD8⁺ (KUSUMI, *et al.*, 1992). Contudo, é provável que a atrofia tímica seja dependente de outros fatores além do TNF uma vez que, na infecção por *T.cruzi* foi observada a involução do timo em camundongos KO para TNFR1 (PEREZ,*et al.*,2007) e também após a administração de anticorpos anti-TNF (ROGGERO, *et al.*,2004).

Em conjunto, os dados da análise de animais TNFR1^{-/-} infectados pelo *P.berghei* sugerem que a apoptose observada no timo é ativada principalmente pela via TNF-alfa/TNFR, mas que a redução no peso relativo do timo é dependente também de outra(s) via(s).

Aparentemente, a atrofia tímica bem como a desorganização da estrutura do timo na infecção malárica não é provocada por INF-gama. Nossos resultados mostram que a concentração sérica de INF-gama aumenta somente no início da infecção pelo *Plasmodium*. O

aumento na concentração das citocinas durante a infecção por *Plasmodium sp* ocorre sempre no início da infecção a fim de eliminar o parasita rapidamente, antes mesmo do início da resposta imune adaptativa (STEVENSON & URBAN, 2006). Outra evidencia que isenta esta citocina na indução da atrofia tímica foi o resultado obtido com os animais KO (do inglês, *knockout*) para o receptor de IFN-gama. Estes animais apresentaram atrofia tímica, bem como comprometimento das regiões cortical e medular, semelhante ao camundongo “selvagem”. Todavia, a literatura demonstra que a participação do IFN-gama na apoptose dos timócitos pode ocorrer de forma indireta, através da regulação dos níveis de TNF-alfa (HUANG,*et al.*,2009). Desta maneira, é possível sugerir que o aumento da concentração de IFN-gama no início da infecção ocorra para eliminar o parasita. Mas, com o agravamento da infecção e envolvimento de macrófagos que produzem o TNF-alfa, os níveis séricos de IFN-gama são reduzidos e mantidos assim para estimular os macrófagos e não mais para a eliminação do parasita.

No timo, o IFN-gama apresenta importante papel regulador do microambiente tímico. O IFN-gama produzido no timo pelas células TCD4⁺ estimula a expressão de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade classe 1 e 2 (DEFRESNE,*et al.*,1990) além de interferir na síntese de elementos de matriz extracelular no timo.

O IFN-gama apresenta efeito inversamente proporcional sobre a expressão de elementos de matriz extracelular no timo. Quando em baixas concentrações, o IFN-gama aumenta a expressão de MEC enquanto que em altos níveis, a expressão de MEC é reduzida (LANNES-VIEIRA *et al.*,1990). Também, Lagrota-Candido e colaboradores observaram que em baixas concentrações de IFN-gama ocorre aumento de expressão de fibronectina, laminina e colágeno IV bem como de seus receptores expressos nas células epiteliais tímicas e também nas TNCs. O aumento na expressão dos MEC nos TNCs (do inglês *Thymic nurse cells*) promovem a liberação

espontânea de timócitos (VILLA-VERDE,*et al.*, 1995;LAGROTA-CANDIDO,*et al.*, 1996).Cotta-de-Almeida e colaboradores, 1997 relataram que quando quando isoladas de camundongos infectados com *T.cruzi*, as TNCs apresentam aumento da expressão de colágeno tipo IV, laminina e fibronectina, e na liberação de timócitos do complexo TNC, sugerindo uma aceleração na migração dos timócitos. Em conjunto, estes dados sugerem que o aumento da concentração de IFN-gama no início da infecção malárica promove a maior expressão de elementos de matriz extracelular no timo e, consequente alteração na migração dos timócitos.

O processo de apoptose pode ser ativado pelas vias intrínseca e extrínseca. A ativação da via extrínseca é dependente da sinalização de receptores de morte, Fas-L e TNF-R, após o contato de seus ligantes Fas e TNF-alfa respectivamente. Já a via intrínseca, é ativada através de danos celulares que estimulam a liberação do citocromo c pela mitocôndria (FEIG & PETER, 2007).

No timo de camundongos infectados com o *Plasmodium*, houve aumento na expressão gênica de proteínas associadas à via extrínseca como proteína de reconhecimento de peptidioglicano (PGRP) que não apresenta efeito citotóxico *per si*, mas quando forma um complexo estável com proteínas *heat shock* 70 (Hsp 70) são capazes de induzir a morte celular em linhagens tumorais (SASHCHENKO,*et al.*,2004). Ainda, a expressão de genes relacionados ao TNFR também é aumentada. Os receptores de TNF fazem parte da via extrínseca de ativação da apoptose, e são também conhecidos como receptores de morte uma vez que após a ligação do TNF-alfa uma via de sinalização, que ativa as caspases, é iniciada.

A expressão de genes que codificam para dois componentes da via intrínseca de indução de apoptose, a granzima A e a granzima B, também foi aumentada na infecção pelo *Plasmodium berghei*. A ação combinada destas moléculas ativa a apoptose em células alvos. A granzima-A

medeia a apoptose induzida através da ativação da caspase 3, e talvez aumento na sinalização de Bcl-2 (YAMADA,*et al.*,2003). Já a granzima B parece ativar a apoptose através do direcionamento de molécula pró-apoptótica Bid, para a membrana mitocondrial favorecendo a liberação do citocromo c (IDA,*et al.*,2003).

Os dados apresentados neste trabalho apontam que a apoptose dos timócitos durante a infecção malária é um processo multifatorial envolvendo as cascatas de sinalização das vias extrínseca e intrínseca para a ativação da morte celular programada.

Há evidências de que a emigração tímica ocorre como resultado de um processo de várias etapas começando com a localização de células T imaturas na medula tímica e terminando com a saída dos timócitos da medula para o sangue através das vênulas endoteliais (Petrie, 2003).

A interação dos timócitos em desenvolvimento com os elementos de matriz extracelular promove a adesão dos timócitos ao estroma tímico. Esta adesão é necessária para que sejam ativadas cascatas de sinalização essenciais para a maturação dos linfócitos T (SAVINO, *et al.*, 2004). Os precursores de linfócitos T entram no timo pela delimitação cortico-medular e migram para a região subcapsular guiados pelo gradiente de concentração de quimiocinas (quimiotaxia) e pela interação timócito-células estromais. Neste estágio, os timócitos apresentam fenótipo DP e migram através do córtex, onde adquirem fenótipo SP, em direção à região medular. Na medula são encontrados timócitos SP maduros capazes de reconhecer antígenos na periferia do sistema imune. O linfócito SP volta então para a delimitação cortico-medular e emigram para a periferia do sistema imune pelas veias de endotélio alto. Desta maneira, a conservação dos microambientes tímicos é estritamente necessária para que os timócitos se diferenciem corretamente.

Anteriormente, Gameiro e colaboradores (2009) demonstraram que a atrofia tímica observada na infecção pelo *Plasmodium berghei* é acompanhada por severas alterações no microambiente tímico. Estas alterações incluem aumento na deposição de elementos de matriz extracelular (fibronectina e laminina), redução na expressão de receptores de integrinas e aumento na concentração das quimiocinas CXCL12 e CXCR4 acompanhada por redução na expressão de seus receptores CCL25 e CCR9, respectivamente. Portanto, é altamente plausível se supor que estas alterações, associadas à profunda desorganização estrutural do timo comprometam o padrão de migração intra-tímico de timócitos, com consequente efeito sobre o processo de emigração de células tímicas.

Diante destes dados questionamos se a profunda atrofia tímica observada na infecção malárica é também em decorrência da modificação no mecanismo de emigração de linfócitos, que pode culminar na exportação de células imaturas para a periferia.

Em estudo anterior nosso grupo relatou que no baço de animais infectados pelo *Plasmodium berghei* ocorre aumento no número de células DN, CD4⁺ e CD8⁺, mas não foram encontradas alterações na quantidade de linfócitos DP (GAMEIRO, *et al.*, 2009). Já a análise, neste trabalho, dos linfonodos mesentéricos de camundongos infectados pelo *Plasmodium* revelou intenso aumento de timócitos imaturos DP e DN. Embora este dado revele a emigração prematura dos linfócitos não são claros os mecanismos que envolvem este processo.

Alterações no padrão de migração dos timócitos também foi observada na infecção por *T. cruzi*. Na fase aguda desta infecção, foi observado grande aumento de linfócitos DP no baço dos animais infectados. Ainda, os linfócitos DP aparentaram entrar mais rápido na circulação que as demais subpopulações, alterando assim a sua frequência na periferia do sistema imune (COTTA-DE-ALMEIDA, *et al.*, 2003).

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 (URBAN,*et al.*,2005). As células T CD4⁺ agem diretamente sobre os linfócitos B estimulando a resposta imune humoral e induzem a ação citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ de forma indireta, através da produção de citocinas, inibindo o desenvolvimento do estágio hepático dos parasitas. As células T CD8⁺ são capazes de inibir o desenvolvimento do estágio hepático do *Plasmodium spp*, prevenindo a entrada destes nos eritrócitos (ZAVALA,*et al.*,2003).

Nos linfonodos mesentéricos de camundongos infectados pelo *Plasmodium berghei* houve redução no número de linfócitos CD4⁺. Este dado pode ser explicado pela morte e/ou redução da produção de células CD4⁺ e, certamente, comprometimento da resposta imune do hospedeiro contra o parasita. Quanto aos linfócitos CD8⁺, principais células na resposta imune adquirida contra a malária, o aumento no baço e no MLN sugere que devido à infecção parasitária ocorre aumento da atividade mitótica local e da migração destas células de outros órgãos para os linfonodos a fim de eliminar o parasita e controlar a parasitemia. Outra possibilidade é o aumento da produção e exportação de células citotóxicas pelo timo.

Embora tenha ocorrido aumento das populações DN, DP e CD8⁺ observamos redução no número de linfócitos totais no linfonodo mesentérico de camundongos infectados. Esta queda da população linfocitária é justificada pelo aumento na apoptose dos linfonodos, que provavelmente corresponde à morte de linfócitos CD4⁺.

Na infecção experimental por *T.cruzi*, os linfonodos mesentéricos apresentam profunda atrofia em consequência do aumento de células apoptóticas no órgão através da sinalização dos receptores de morte TNFR1 e Fas-L (DE MEIS,*et al.*,2006). Ainda, a literatura relata que os

MLNs contêm uma população diferente de células apresentadoras de antígenos e que as citocinas secretadas no órgão exibem um padrão diferenciado em relação aos demais órgãos secundários, o que favorece o desenvolvimento de uma resposta imune específica no linfonodo mesentérico (TONKONOGY & SWAINT, 1993). Na periferia do sistema imune, a apoptose é controlada pela abundância de antígenos e citocinas como IL-2, em contraste, a ausência do parasita e privação de citocinas ativam a apoptose através da via de ativação da mitocôndria. Na infecção por *T.cruzi*, a atrofia do MLN e apoptose dos linfócitos deste órgão está associada à falha na resposta imune contra o parasita (DE MEIS, *et al.*, 2006). Desta forma, acreditamos que a severidade da infecção malárica é também devido aos distúrbios celulares encontrados nos linfonodos mesentéricos.

A análise de linfócitos recém-emigrantes do timo no modelo de infecção pelo *Plasmodium berghei* poderá fornecer informações importantes a respeito dos achados neste trabalho. Para tanto, a avaliação da saída de células do timo através da determinação de células CD4⁺ e CD8⁺ na periferia com fenótipo *naive* (co-expressão das moléculas CD45RA e CD62L) e da presença de TRECs (do inglês, *T-cell receptor excision circles* (TRECs), está sendo conduzida em nosso laboratório.

As alterações nas subpopulações linfocitárias em consequência da atrofia tímica induzida pelo *Plasmodium* podem alterar a eficiência da resposta imune periférica, e, eventualmente promover o desenvolvimento de doenças autoimunes. Nosso modelo de atrofia tímica contribui não só para o melhor entendimento da resposta imune contra a malária como também para a exploração dos mecanismos envolvidos na atrofia tímica aguda.

6.CONCLUSÃO

A involução tímica observada na infecção pelo *Plasmodium berghei* NK65 é consequência do aumento da morte celular induzida (apoptose) ativada pelas vias extrínseca e intrínseca no timo e também da migração prematura dos timócitos imaturos para os linfonodos mesentéricos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, G., Lane, P.J., Jenkinson, E.J. (2007) Generating intrathymic microenvironments to establish T-cell tolerance. *Nat Rev Immunol* 7: 954-63.
- Andrade, C.F., Gameiro, J., Nagib, P.R.A., Carvalho, B.O., Talaisys, R.L., Costa, F.T.M., Verinaud, L. (2008) Thymic Alterations in *Plasmodium berghei*-infected mice. *Cellular Immunology* 253:1-4.
- Ashkenazi, A. & Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281: 1305–8.
- Barthlott, T., Keller, M.P., Krenger, W., Hollander, G.A. (2006) A short primer on early molecular and cellular events in thymus organogenesis and replacement. *Swiss Med Wkly* 136:365-369.
- Berrih, S., Arenzana-Seisdedos, F., Cohen, S., Devos, R., Charron, D., Virelizier, J.L. (1985) Interferon-gamma modulates HLA class II antigen expression on cultured human thymic epithelial cells. *Journal Immunology*. 135 (2):1165-1171.
- Blackburn, C.C. & Manley, N.R. (2004) Developing a new paradigm for thymus organogenesis *Nature Reviews Immunology* 4: 278-289.
- Boyd, R.L., Tucek, C.L., Godfrey, D.I., Izon, D.J., Wilson, T.J., Davidson, N.J., Bean, A.G.D., Ladyman, H.M., Ritter, M.A., Hugo, P. (1993) The thymic microenvironment. *Immunology Today* 14:445–59.
- Brito, V.N., Souto, P.C.S., Cruz-Höfling, M.A., Ricci, L.C., Verinaud, L. (2003) Thymus invasion and atrophy induced by *Paracoccidioides brasiliensis* in BALB/c mice, *Medical Mycology* 41:83-87.
- Budd, R. C., Yeh, W. C. & Tschopp, J. (2006) cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 196–204.
- Cardenas-Palomo LF, de Souza-Matos DC, Chaves-Leal E, Bertho AL, Marcovistz R (1995) Lymphocyte subsets and cell proliferation analysis in rabies-infected mice. *J Clin Lab Immunol* 46: 49–61.
- Ciofani, M & Zúñiga-Pflücker, J.C. (2007) The Thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 23: 463-493.
- Chen, G & Goeddel, D.V. (2002) TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway *Science*. 296:1634-1635.

Chen W, Kuolee R, Austin JW, Shen H, Che Y, et al. (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: 189–196.

Chicheportiche, Y., Bourdon, P. R., Xu, H., Hsu, Y. M., Scott, H., Hession, C., Garcia, I., and Browning, J. L. (1997). TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem* 272: 32401–10.

Cotta-de-Ameida, V.; Bertho, A.L.; Villa-Verde, D.M. et al.(1997) Phenotypic and functional alterations of thymic nurse cells following acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, v. 82, n. 2, p. 125-132.

Cotta de Almeida, V., Bonomo, A., Mendes-da-Cruz, D.A., Riederer, I., De Meis, J., Ferreira 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. Immunology* 33:2439-2448.

de Meis J, Mendes-da-Cruz DA, Farias-de-Oliveira DA, Corrêa-de-Santana E, Pinto-Mariz F, Cotta-de-Almeida V, Bonomo A, Savino W.(2006) Atrophy of mesenteric lymph nodes in experimental Chagas' disease: differential role of Fas/Fas-L and TNFRI/TNF pathways. *Microbes Infect.*8(1):221-31.

Desagher, S. & Martinou, J.C. (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* Sep;10(9):369-77. Revisão.

Douek D, Betts MR, Hill BJ, Little SJ, Lempicki R, et al. (2001) Evidence for increased T cell turnover and decreased thymic output in HIV infection. *J Immunol* 167: 6663–6668.

Elloso, M.M., van der Heyde, H.C., vande Waa, J.A., Manning, D.D., Weidanz, W.P., (1994) Inhibition of *Plasmodium falciparum* in vitro by human gamma delta T cells. *Journal of Immunology* 153:1187–1194.

Fadeel, B., Gleiss, B., Hogstrand, K., Chandra, J., Wiedmer, T., Sims, P.J., Henter, J.I., Orrenius, S. e Samali, A. (1999) Phosphatidylserine exposure during apoptosis is a cell-type-specific event and does not correlate with plasma membrane phospholipid scramblase expression. *Biochem Biophys Res Commun* 266(2): 504-11.

Fan, Z., Beresford, P. J., Oh, D. Y., Zhang, D., and Lieberman, J. (2003). Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* 112:659–72.

Feig, C. & Peter, M.E. (2007) How apoptosis got the immune system in shape. *Eur. J. Immunol.* 37: S61-70.

Guevara Patino JA, Ivanov VN, Lacy E, Elkon KB, Marino MW, Nikolic - Zugic J. (2000) TNF- α is the critical mediator of the cyclic AMP-induced apoptosis of CD8⁺CD4⁺ double-positive thymocytes. *J Immunol* 164:1689–94.

Guillermo,L.V.C., Silva, E.M., Ribeiro-Gomes,F.L., De Meis,J., Pereira, W.F. , Yagita, H., DosReis,G.A.,Lopes, M.F. (2007)The Fas death pathway controls coordinated expansions of type 1 CD8 and type 2 CD4 T cells in *Trypanosoma cruzi* infection *Journal of Leukocyte Biology* 81:942-951.

GodfreyDI,ZlotnikA, SudaT. 1992. Phenotypic and functional characterization of c-kit expression during intrathymic T-cell development. *J. Immunology* 149:2281–85.

Goodier, M.R., Lundqvist, C., Hammarstrom, M.L., Troye-Blomberg,M., Langhorne, J., 1995. Cytokine profiles for human V gamma 9+ T cells stimulated by *Plasmodium falciparum*. *Parasite Immunology*17: 413–423.

Greenwood, B.M.,Bojang, K., Whitty,C.J.,Targett, G.A.(2005) *Malaria Lancet* 365 (9469):1487-98.

Gruver,A.L. & Sempowski,G.D (2008) Cytokines, leptin, and stress-induced thymic atrophy. *Journal of Leukocyte Biology* 84:915-923.

Haeryfar,S.M.M. & Berczi,I (2001) The thymus and the acute phase response. *Cellular and Molecular Biology* 47 (1):145-156.

Hayday, A.C. & Pennington, D.J.(2007)Key factors in the organized chaos of early T cell development. *Nat Immunol* 8: 137-44.

Haynes, B.F. & Hale,L.P.(1998)The human thymus. A chimeric organ comprised of central and peripheral lymphoid components. *Immunol. Res.* 18, 61–78.

Henriques-Pons,A., De Meis,J., Cotta-de-Almeida,V., Savino, W., Araújo-Jorge,T.C. (2004) Fas and perforin are not required for thymus atrophy induced by *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitology*.107:1–4.

Huang ,Y., Walstrom, A., Zhang, L., Zhao, Y., Cui, M., Ye, L., Zheng, J.C.(2009)Type I interferons and interferon regulatory factors regulate TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in HIV-1-infected macrophages. *PLoS One*(4):e5397.

Ida H, Nakashima T, Kedersha NL, Yamasaki S, Huang M, Izumi Y,Miyashita T, Origuchi T, Kawakami A, Migita K, Bird PI, AndersonP, Eguchi K.(2003) Granzyme B leakage-induced cell death: a new type ofactivation induced natural killer cell death. *Eur J Immunol.* 33:3284–3292.

Igney, F.H. & Krammer, P.H. (2002).Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2:77–88.

Isogai, E., IsogaiH., Kimura, K., Fujii,N.,Takagi,S., Hirose K.,Hayashi,M.(1996) In vivo induction of apoptosis and immune response in mice by administration of lypopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. *Infection Immunity*.64(4):1461-1466.

Ito M, Nishiyama K, Hyodo S, Shigeta S, Ito T (1985) Weight reduction of thymus and depletion of lymphocytes of T-dependent areas in peripheral lymphoid tissues of mice infected with *Francisella tularensis*. *Infect Immun*.49: 812–818.

Jimenez, B., Volpert, O. V., Crawford, S. E., Febbraio, M., Silverstein, R. L., Bouck, N. (2000). Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med* 6, 41–8.

Kataoka, T., Schröter, M., Hahne, M., Schneider, P., Irmeler, M., Thome, M., Froelich, C.J., Tschopp, J. (1998) FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *Journal Immunology* 161(8):3936–42.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4): 239–57.

Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., Peter, M. E. (1995). CD95 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14, 5579–88.

Kusumi A, Abo T, Masuda T, Sugiura K, Seki S, Ohteki T, Okuyama, R, and K Kumagai. (1992) Lymphotoxin activates hepatic T cells and simultaneously induces profound thymic atrophy. *Immunology* 1992;77:177–84.

Lafon M, Scott-Algara D, Marche PN, Cazenave PA, Jouvin-Marche E (1994) Neonatal deletion and selective expansion of mouse T cells by exposure to rabies virus nucleocapsid superantigen. *J Exp Med* 180: 1207–1215.

Lagrotta-Candido, J.M.; Villa-Verde, D.M.; Vanderlei Jr, F.H. et al. (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.*, v. 170, n. 2, p. 235–44.

Lannes-Vieira, J., van der Meide, P.H., Savino, W. (1991) Extracellular matrix components of the mouse thymic microenvironment. II. In vitro modulation of basement membrane proteins by interferon-gamma: relationship with thymic epithelial cell proliferation. *Cell. Immunol.*, v. 137, n.2, p. 329–340.

Leite de Moraes, M.C., Hontebeyrie-Joskowicz, M., Leboulanger, F., Savino, W., Dardenne, M., Lepault, F. (1991) Studies on the thymus in Chagas' disease. II. Thymocyte subset fluctuations in *Trypanosoma cruzi*-infected mice: Relationship to stress. *Scand J Immunol.* 33 : 267–275.

Leite de Moraes, M.C., Hontebeyrie-Joskowicz, M., Dardenne, M., Savino, W. (1992) Modulation of thymocyte subsets during acute and chronic phases of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology*.77: 95–98.

Leist, M. & Jaattela, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2(8): 589–98.

- Lieberman, J. & Fan, Z. (2003). Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr Opin Immunol* 15: 553–9.
- Ljungstrom I, Huldt G (1977) Effect of experimental trichinosis on unrelated humoral and cell mediated immunity. *Acta Pathol Microbiol Scand [C]* 85: 131–141.
- Lockshin, R.A. & Williams, C.M. (1964). Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol* 10: 643–649.
- Lynch, H.E., Goldberg, G.L., Chidgey, A., Van-den-Brink, M.R.M., Boyd, R., Sempowski, G. D. (2009). Thymic involution and immune reconstitution. *Trends in Immunology* 30(7):366–373.
- Markovits R, Bertho AL, Matos DC (1994) Relationship between apoptosis and thymocyte depletion in rabies-infected mice. *Braz J Med Biol Res* 27:1599–1603.
- Martinvalet, D., Zhu, Pengcheng, Lieberman, J. (2005) Granzyme A Induces Caspase-Independent Mitochondrial Damage, a Required First Step for Apoptosis. *Immunity*. 22:355–370
- McDevitt, M.A., Xie, J., Gordeuk, V., Bucala, R. (2004) The anemia of malaria infection: role of inflammatory cytokines. *Current Hematology Reports* 3:97–106.
- Meier, P., Finch, A. & Evan, G. (2000). Apoptosis in development. *Nature* 407(6805): 796–801.
- Miller, L.H., Good, M.F., Milon, G. (1994) Malaria Pathogenesis. *Science* 264 (5167):1878–83.
- Mucci, J., Hidalgo, A., Mocetti, E., Argibay, P.F., Leguizamon, M.S., Campetella, O. (2002) Thymocyte depletion in *Trypanosoma cruzi* infection is mediated by transsialidase-induced apoptosis on nurse cell complex. *Proc Natl Acad Sci*. 99:3896–3901.
- Napolitano LA, Lo JC, Gotway MB, Mulligan K, Barbour JD, et al. (2002) Increased thymic mass and circulating naive CD4 T cells in HIV-1-infected adults treated with growth hormone. *AIDS* 16: 1103–1111.
- Nishino, M., Ashiku, S.K., Kocher, O.N., Thurer, R.L., Boisselle, P.M., Hatabu, H. (2006) The Thymus: A Comprehensive Review. *RadioGraphics* 26: 335–348.
- Norbury, C. J. & Hickson, I. D. (2001) Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicology* 41: 367–401.
- Opferman, J.T. & Korsmeyer, J.S. (2003) Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nature Immunology* 4: 410 – 415.
- Oya, H., Kawamura, T., Shimizu, T., Bannai, M., Kawamura, H., Minagawa, M., Watanabe, H., Hatakeyama, K., Abo, T. (2000) The differential effect of stress on natural killer T (NKT) and NK cell function. *Clinical Experimental Immunology* 121, 384–390.

Ozeki Y, Kaneda K, Fujiwara N, Morimoto M, Oka S, Yano I.(1997) In vivo induction of apoptosis in the thymus by administration of mycobacterial cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate). *Infect Immun* 65:1793–9.

Pardo,J.,Bosque,A.,Brehm,R.,Wallich,R.,Naval,J.,Mullbacher,A.,Anes,A.,Simon,M.M. (2004) Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis.*J Cell Biol* 167 (3):457-68.

Peter, M. E. & Krammer, P. H. (1998) Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol* 10, 545–51.

Peter, P. (2005) *The Immune System*. Gerland Science Publishing. ISBN 0-8153-4093-1.

Petrie, H.T. & Zúñiga-Pflücker,J.C. (2007) Zoned out:Functional Mapping of Stromal Signaling Microenvironments in the thymus.*Annual Review of Immunology*. 25: 649-679.

Perez,A.R., Roggero,E.,Nicora,A.,Palazzi,J.,Besedovsky,H.O.,del Rey,A.,Bottasso,O.A. (2007) Thymus atrophy during *Trypanosoma cruzi* infection is caused by an immuno-endocrine imbalance. *Brain, Behavior, and Immunity* 21:890–900.

Quaglino,D. & Ronchetti,I.P.(2001) Cell death in the rat thymus: A minireview. *Apoptosis* (5):389-401.

Rathmell,J.C. & Thompson,C.B.(2002).Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease." *Cell* 109(Suppl): S97-107.

Roggero, E.; Piazzon, I.; Nepomnaschy, I. et al. (2004) Thymocyte depletion during acute *Trypanosoma cruzi* infection in C57BL/6 mice is partly reverted by lipopolysaccharide pre-treatment. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v. 41, n. 2, p. 123-131.

Rubio-Moscardo, F., Blesa, D., Mestre, C., Siebert, R., Balasas, T., Benito, A., Rosenwald, A., Climent, J., Martinez, J. I., Schilhabel, M., Karran, E. L.,Gesk, S., Esteller, M., deLeeuw, R., Staudt, L. M., Fernandez-Luna, J. L.,Pinkel, D., Dyer, M. J., and Martinez-Climent, J. A. (2005). Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes.*Blood* 106, 3214–22.

Salmon, M.G., De Souza, J.B., Butcher, G.A., Playfair, J.H.(1997) Premature removal of uninfected erythrocytes during malarial infection of normal and immunodeficient mice. *Clinical Mol. Cell. Biol.*3: 401–410.

Salvesen, G. S. & Duckett, C. S.(2002) IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat. Rev Experimental Immunology* 108:471–476.

Sashchenko LP, Dukhanina EA, Yashin DV, Shatalov YV, Romanova EA,Korobko EV, Demin AV, Lukyanova TI, Kabanova OD, KhaidukovAV, Kiselev SL, Gabibov AG, Gnuchev NV, Georgiev GP. (2004)Peptido-glycan recognition protein Tag7 forms a cytotoxic complex with heatshock protein 70 in solution and in lymphocytes. *J Biol Chem.*279:2117–2124.

Savino W, Dardenne M, Marche C, Trophylme D, Dupui JM, et al. (1986) Thymic epithelium in AIDS: An immunohistologic study. *Am J Pathol* 122:302–307.

Savino W, Leite de Moraes MC, 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: 1727–1733.

Savino W (1990) The thymic microenvironment in infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)* 85: 255–260.

Savino, W., Leite de Moraes, M.C., Silva Barbosa, S.D., Fonseca, E.C., Cotta de Almeida, V., Hontebeyrie-Joskowicz, M. (1992) Is the thymus a target organ in infectious diseases? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 87 73-78.

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 Immunology* 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.

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

Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P.H., Peter, M.E. (1999) The Role of c-FLIP in Modulation of CD95-induced Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 1541-1548.

Seixas, E.M. & Langhorne, J. (1999) T cells contribute to control of chronic parasitemia in *Plasmodium chabaudi* infections in mice. *Journal of Immunology* 162:2837–2841.

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 Immunology*, 10(1): 53-59.

Sodora, D.L., Milush, J.M., Ware, F., Wozniakowski, A., Montgomery, L., McClure, H.M., Lackner, A.A., Marthas, M., Hirsch, V., Johnson, R.P., Douek, D.C., Koup, R.A. (2002) Decreased levels of recent thymic emigrants in peripheral blood of simian immunodeficiency virus-infected macaques correlate with alterations within the thymus. *J. Virology* 76:9981-9990.

Souto, P.C.S., Brito, V.N., Gameiro, J., Cruz Höfling, M.A., Verinaud, L. (2003) Programmed cell death in thymus during experimental paracoccidioidomycosis. *Med. Microbiology and Immunology* 192: 225-229.

Srichaikul, T., Panikbutr, N., Jeumtrakul, P. (1967) Bone-marrow changes in human malaria. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 61: 40–51.

- Stevenson, M.M. & Urban, B.C. (2006) Antigen presentation and dendritic cell biology in malaria. *Parasite Immunology* 28:5-14.
- Stockinger B, Kassiotis G, Bourgeois C. (2004) Homeostasis and T cell regulation. *Curr Opin Immunology* 16:775-9.
- Suliman, A., Lam, A., Datta, R., Srivastava, R. K. (2001) Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and independent pathways. *Oncogene* 20: 2122-33.
- Takahama, Y. (2006) Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat. Rev. Immunol.* 6:127.
- Taylor-Robinson, A. W. (1995) Regulation of immunity to malaria: valuable lessons learned from murine models. *Parasitol. Today* 11: 334-342.
- Tonkonogy, S. L. & Swaint, S. L. (1993) Distinct lymphokine production by CD4+ T cells isolated from mucosal and systemic lymphoid organs *Immunology* 80: 574-580.
- Trapani, J. A. & Smyth, M. J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature Review Immunology* 2:735-47.
- Troye-Blomberg, M., Worku, S., Tangteerawatana, P., Jamshaid, R., Soderstrom, K., Elghazali, G., Moretta, L., Hammarstrom, M., Mincheva-Nilsson, L. (1999) Human gamma delta T cells that inhibit the in vitro growth of the asexual blood stages of the *Plasmodium falciparum* parasite express cytolytic and proinflammatory molecules. *Scandinavian Journal of Immunology* 50: 642-650.
- 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.
- Yamada M, Hirasawa A, Shiojima S, Tsujimoto G. (2003) Granzyme A mediates glucocorticoid-induced apoptosis in leukemia cells. *FASEB J.* 17:1712-1714.
- van den Brink MRM, Alpdogan Ö, Boyd, RL. (2004) Strategies to enhance T-cell reconstitution in immunocompromised patients. *Nature Review Immunology* 4:856-6.
- van der Heyde, H.C., Elloso, M.M., Chang, W.L., Kaplan, M., Manning, D.D., Weidanz, W.P. (1995) Gamma delta T cells function in cell-mediated immunity to acute blood-stage *Plasmodium chabaudi adami* malaria. *Journal of Immunology* 154: 3985-3990.
- van Ewijk, W. (1991) T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. *Annu. Rev. Immunol.* 9:591-615.
- Verinaud, L., Hofling, M.A.C., Sakurada, J.K., Vassalo, J., Wakelin, D., Sewell, H.F; Camargo, I.J.B. (1998) Immunodepression induced by *Trypanosoma cruzi* and mouse hepatitis virus type 3 IS associated with thymus apoptosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 5 (2) 186-191.

- Vicente,R., Swainson, L., Marty-Grès, S., De Barros, S.C., Kinet, S., Zimmermann, V.S., Taylor, N. (2010) Molecular and cellular basis of T cell lineage commitment.Semin Immunol.22(5):270-5.
- Villa-Verde, D.M.; Meloo-Coelho, V.; Lagrota-Candido, J.M. et al. (1995)The thymic nurse cell complex: an in vitro model for extracellular matrix-mediated intrathymic T cell migration. Braz. J. Med. Biol. Res., v. 28, n. 8, p. 907-12.
- Wang SD, Huang KJ, Lin YS, Lei HY.(1994) Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. J Immunology 152:5014–21.
- Watson SR, Miller TB, Redington TJ, Bullock WE (1983)Immunoregulation in experimental disseminated histoplasmosis: Flow microfluorometry (FMF) studies of the Thy and Lyl phenotypes of T lymphocytes from infected mice. J Immunol 131: 984–990.
- Watson SR, Redington TJ, Miller TB, Bullock WE (1984) Flow microfluorometry analysis of alterations in T-lymphocyte subsets during murine listeriosis. Infect Immun 45: 372–377.
- Witt, C.M., Robey, E.A.(2005) Thymopoiesis in 4 dimensions. Semin Immunol 17: 95-102.
- Wickramasinghe, S.N., Looareesuwan, S., Nagachinta, B., White, N.J.(1989) Dyserythropoiesis and ineffective erythropoiesis in Plasmodium vivax malaria. British Journal of Haematology 72:91–99.
- Winkler, S., Willheim, M., Baier, K., Schmid, D., Aichelburg, A.,Graninger, W., and Kremsner, P. G., (1998) Reciprocal regulation of Th1- and Th2-cytokine-producing T cells during clearance of parasitemia in Plasmodium falciparum malaria. Infect. Immun. 66:6040–6044.
- Wellhausen, S.M.&Boros, D.V. (1982) Atrophy of the thymic cortex in mice with granulomatous schistosomiasis mansoni. Infect Immunology .35:1063–1069.
- Zavala F. &Tsuiji M. (2003) T cells as mediators of protective immunity against liver stages of Plasmodium.Trends in Parasitology. 19(2): 88-93.
- Zhang YH, Takahashi K, Jiang GZ, Kawai M, Fukada M, Yokochi T. (1993)In vivo induction of apoptosis (programmed cell death) in mouse thymus by administration of lipopolysaccharide. Infect Immunity 61:5044–8.
- Zhang,N.,Hartig,H., Dzhalalov,I, Draper,D.,He,Y.W.(2005) The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes.Cell Research 15: 749–769.
- Zuzarte-Luis, V. & Hurle, J.M. (2002) Programmed cell death in the developing limb. Int J Dev Biol 46(7): 871-6.

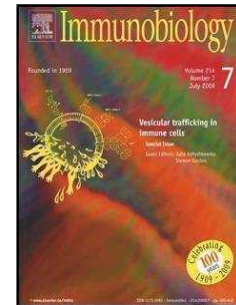
8. ANEXO

Manuscrito Aceito para Publicação

Accepted Manuscript

Title: Effects of *Plasmodium berghei* on thymus: high levels of apoptosis and premature egress of CD4⁺CD8⁺ thymocytes in experimentally infected mice.

Authors: Carolina Francelin, Luciana Campos Paulino, Jacy Gameiro, Liana Verinaud



PII: S0171-2985(11)00067-2
DOI: doi:10.1016/j.imbio.2011.03.009
Reference: IMBIO 50699

To appear in:

Received date: 18-2-2011
Accepted date: 30-3-2011

Please cite this article as: Francelin, C., Paulino, L.C., Gameiro, J., Verinaud, L., Effects of *Plasmodium berghei* on thymus: high levels of apoptosis and premature egress of CD4⁺CD8⁺ thymocytes in experimentally infected mice., *Immunobiology* (2010), doi:10.1016/j.imbio.2011.03.009

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Effects of *Plasmodium berghei* on thymus: high levels of apoptosis and premature egress of CD4⁺CD8⁺ thymocytes in experimentally infected mice.

Carolina Francelin^a, Luciana Campos Paulino^b, Jacy Gameiro^c and Liana Verinaud^{a,*}

^a Department of Anatomy, Cell Biology and Physiology, Biology Institute, State University of Campinas - UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil.

^b Center of Natural and Human Sciences, Federal University of ABC-UFABC, São Paulo, Brazil

^c Department of Parasitology, Microbiology and Immunology; Federal University of Juiz de Fora - UFJF; Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil;

Short Title: Effects of *Plasmodium berghei* on Thymus

Keywords: Thymus; Thymic atrophy; Thymocytes; *Plasmodium berghei*; Malaria.

Abbreviations: DP, double positive; DN, double negative; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase mediated deoxyuridine triphosphate biotin nick end labeling; ABI, apoptotic body index; PI, propidium iodide; PS, phosphatidylserine; MLN, mesenteric lymph nodes; FITC, fluorescein isothiocyanate; TRECs, T-cell receptor excision circles; IFN- γ , Interferon gamma; TNF, Tumor Necrosis Factor; LT, lymphotoxin; Tg, transgenic.

Corresponding author at: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Biologia, Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia. Barão Geraldo, Campinas, São Paulo, Brasil. CEP: 13083-970. Tel.: + 55 19 35216255; fax: + 55 19 35216276. *E-mail address:* verinaud@unicamp.br (L. Verinaud).

Abstract

We have previously showed alterations in the thymus during experimental infection with *Plasmodium berghei*, the causative agent of Malaria. Such alterations comprised histological changes with loss of delimitation between cortical and medullar regions, a profound atrophy with depletion of CD4⁺CD8⁺ double-positive (DP) thymocytes, and severe changes in the expression of cell migration-related molecules, belonging to the extracellular matrix and chemokine protein families. Taken together, these considerations prompted us to evaluate if the acute thymic atrophy observed during *Plasmodium* infection was correlated with increased apoptotic levels of thymocytes or with their premature emigration to the periphery. Our results confirmed the marked reduction of the thymus weight in infected animals that was accompanied by histological alterations, which included a very large number of cells showing nuclear condensation and karyorrhectic changes surrounded by histiocytes suggesting increased levels of apoptosis. This was confirmed by immunohistochemistry and flow cytometry techniques. In order to verify if an accelerated emigration of thymic cells to the peripheral lymphoid organs was also occurring we analyzed the spleen and mesenteric lymph nodes from control and infected mice. No significant differences were found in the spleen, but were seen after 14 days of infection between control and infected mice in the mesenteric lymph nodes. The main alteration was the presence of double negative (CD4⁻CD8⁻) and double positive (CD4⁺CD8⁺) cells. We concluded that both, apoptosis of thymocytes and premature egress of immature cells take place during infection. Additional studies will be necessary to verify how such alterations might influence the systemic immune response to the parasite.

Introduction

The thymus plays a primary role in supplying immunologically competent T cells to the periphery by providing a microenvironment for differentiation and selection of T lymphocytes (or thymocytes, while in the thymus) from lymphoid progenitors. This microenvironment is mainly composed by a three-dimensionally (3D)-oriented network of epithelial cells, macrophages, dendritic cells, fibroblasts and matrix molecules that provide mechanical support and molecular stimuli for thymocyte differentiation, selection of double-positive (DP) cells, and functional maturation of newly generated T cells (Takahama, 2006; Ciofani & Zúñiga-Pflücker, 2007; Petrie & Zúñiga-Pflücker, 2007). The successful development of mature T cells depends on the constant migration of thymocytes through this thymic stromal compartment. So, in the absence of a regularly structured and composed *thymic microenvironment*, the essential functions of the thymus are severely altered and frequently preclude normal thymocyte development to occur (Lind *et al.*, 2001; Petrie, 2002; van Ewijk, 1999). 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 (Shanker, 2004).

The thymus has long been known to be an organ that is vulnerable to atrophy when exposed to a variety of stimuli, including many pathogens, such as *Trypanosoma cruzi* (Savino *et al.*, 1989; Leite-de-Moraes *et al.*, 1992; Cotta-de-Almeida *et al.*, 2003), Human Immunodeficiency Virus (Savino *et al.*, 1986; Sodora *et al.*, 2002) and *Paracoccidioides brasiliensis* (Brito *et al.*, 2003; Souto *et al.*, 2003). All these works show that acute infection of mice is followed by strong thymic atrophy and deep disorganization of thymic architecture (Savino, 2006).

Previously, using a lethal murine malaria model of *Plasmodium berghei*, we have also shown profound histological alterations and severe thymic atrophy with loss of DP cells. In addition, the presence of parasites inside the thymus was detected for the first time (Andrade *et al.*, 2008). In another study that used the same model, we have demonstrated changes in the expression of extracellular matrix elements and chemokine protein families in *Plasmodium*-infected animals (Gameiro *et al.*, 2009). As these molecules play a critical role in T cell maturation because they are involved in the dynamic thymocyte migration within the thymus, it is reasonable to suppose that such events may influence the process of intrathymic T cell differentiation, impairing the normal development of T cells. As a consequence, an altered peripheral immune response to the parasite can be expected due to a severe reduction of lymphocytes and/or because of the presence of cells without fully functional immune competence in blood and peripheral lymphoid tissues.

In the present study, we evaluate whether the acute thymic atrophy observed during *Plasmodium* infection correlates with increased apoptotic levels of thymocytes or with their premature egress from the thymus to the periphery.

Materials and Methods

Animals

Specific pathogen-free BALB/c male mice, 6-8 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 conducted in conformity with the guidelines of the State University of Campinas' Committee on the Use and Care of Animals.

Infection of mice

Groups of five animals were intraperitoneally infected with 10^6 parasitized red blood cells obtained from a source mouse or with saline (control groups). Parasitemia was assessed daily by counting the number of infected erythrocytes in Giemsa-stained thin blood films. At days 7 and 14 following infection, mice were sacrificed and their thymuses and mesenteric lymph nodes collected and analyzed by histological methods, cytofluorometry and/or immunohistochemistry.

Thymus and Mesenteric Lymph Nodes Histology

For microscopic histological evaluation, organs were collected and fixed in a solution 4% paraformaldehyde for 12 hours at 4°C. 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).

Quantification of Relative Thymus Weight

For the analysis of relative thymus weight, body weight of the respective mice was measured before thymi of control and infected mice were isolated by microsurgery. The thymus gland was weighted and the thymic index (%) was calculated as: $100 \times \text{organ weight (g)} / \text{body weight (g)}$.

TUNEL staining of apoptotic cells

The distribution of apoptotic thymocytes in tissue sections of thymi from control and infected mice was determined by the terminal deoxynucleotidyl transferase mediated deoxyuridine triphosphate biotin nick end labeling (TUNEL) method. In brief, 5 μ m

sections were de-waxed, and rehydrated specimens were incubated in proteinase K (40 µg/ml) for one hour at 37°C, and were then treated with 3% H₂O₂ in methanol for 30 minutes at room temperature. After, the specimens were incubated with TdT and digoxigenin (DIG)-dUTP for 1 h at 37°C. Anti-DIG peroxidase was added to the slides, followed by incubation for 30 minutes at 37°C. Slides were stained with diaminobenzine for 10 minutes and counterstained with haematoxylin. Controls for the TUNEL procedure were handled in the same manner as the test samples except that the TdT enzyme was omitted in the nucleotide mixture and was replaced with dH₂O. Apoptotic cells were identified by TUNEL in conjunction with characteristic morphological changes, such as cell shrinkage, membrane blebbing, and chromatin condensation, to distinguish apoptotic cells and apoptotic bodies from necrotic cells. The latter were not considered apoptotic cells. In total, 500 cells were counted for each specimen by using an ocular grid. The apoptotic body index (ABI) was performed by a single observer (C.F.A.) blinded to the animal status, and defined as follows: apoptotic body index (%) = $100 \times \text{apoptotic cells} / \text{total cells}$.

Annexin V and antibody staining

The analysis of surviving, dead and apoptotic cells was based on gating of cells by size (side and forward scatter), plasma membrane integrity [propidium iodide (PI) staining] and redistribution of plasma membrane phosphatidylserine (annexin V binding). Briefly, 1×10^6 thymocytes were resuspended in 100 µl of buffer containing 10 mM HEPES, pH 7.3, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂ and 1.8 mM CaCl₂, and incubated with 0.3 µg/ml of APC-conjugated annexin V and 5 µg/ml propidium iodide (PI) for 15 min. After incubation, samples were diluted 4 times with buffer containing 1.8 mM CaCl₂ and analyzed by flow cytometry. As a negative control for all annexin V

staining procedures, cells were washed extensively in Ca^{2+} -free PBS and stained with annexin V in the absence of Ca^{2+} . To assess the phenotypic characteristics of the thymic cells, cells were stained with anti-CD3mAb coupled to PeCy7, anti-CD8mAb coupled to PE, and anti-CD4mAb coupled to FITC. All reagents were purchased from Pharmingen/Becton Dickinson (San Diego, CA, USA). Fluorochrome-labeled isotype-matched negative controls for the specific mAbs were also Pharmingen products. All samples labeled with antibody were washed in staining buffer after 25 min on ice and cells resuspended in 500 μl of staining buffer for flow cytometric analysis.

Flow cytometry

Thymus and mesenteric lymph nodes were dissected and mechanically disaggregated. Single cell suspensions were obtained and red blood cells were removed by NH_4Cl lysis. Cells were diluted in 10% BSA-phosphate-buffered saline and incubated with anti-Fc γ R antibody (BD Biosciences) to block the binding of conjugated antibodies to Fc γ R. Cells then were incubated with the proper antibodies as described above and samples were acquired on a FACS Aria[®] cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Postacquisition analysis was performed using FlowJo software (Tree Star, San Carlos, CA, USA). As presented in Results PI-positive cells were gated out of all profiles for thymocytes. CD4⁺ and CD8⁺ cell populations were analyzed by gating on CD3⁺ cells.

Statistical Evaluation

Statistical evaluation of the results were made by unpaired Student's *t* and Kruskal-Wallis tests. The GraphPad InStat software version 4.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) was used for these analysis. *P* values of less than 0.05 were considered significant.

Results

BALB/c mice infected intraperitoneally with lethal murine malaria *Plasmodium berghei* NK65 developed high levels of parasitemia, which peaked on day 14 after parasite inoculation. One hundred percent mortality was observed at day 15 of infection (data not shown).

Marked reduction of the thymus weight was verified (Figure 1). Thymic reduction was progressive and reached its maximum value at 14 days post-infection, coinciding with the parasitemia peak. Thymus atrophy did not begin until day 5, but the weights decreased markedly after that.

Atrophy was accompanied by histological alterations in thymus architecture (Figure 2). Histological changes of the thymus were not observed until after day 5 post-infection (Figure 2B). On day 10, the thickness and the number of thymocytes in the peripheral cortex of infected thymi were decreased (Figure 2C). On day 14, total loss of cortical-medullar delimitation was observed when compared to the control mice and/or to the infected mice on day 5 after infection (Figure 2D). Also, a very large number of cells showing nuclear condensation and karyorrhectic changes surrounded by histiocytes constituting a “starry-sky” pattern was observed. Since these alterations suggest the occurrence of apoptosis, this kind of cell death was investigated by terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) technique.

Analysis by TUNEL technique showed a strongly positive reaction in the thymus of infected mice, indicating an augment of programmed cell death beginning at day 10 post- infection and peaking at day 14 (data not shown). The distribution of TUNEL-positive cells in the cortical and medullar zones of the thymus was different between control and infected animals. While in the control thymus TUNEL-positive cells were

predominantly distributed in the cortical layer, in the infected thymus the majority of apoptotic thymocytes *in situ* was detected at the inner region of the organ, which corresponds to the medullar layer in controls (Figure 3A). Apoptotic cells were counted, and an index was generated as the percentage of apoptotic cells compared with total thymus cell number. This analysis showed that the apoptotic index significantly changes between days 7 and 14 after infection (data not shown) and that infected thymus presented increased apoptotic body index when compared with controls (Figure 3B).

Because TUNEL technique can potentially detect nonapoptotic cells, we also investigated exposure of phosphatidylserine (PS) on outer membranes, which occurs during an early phase of apoptosis. The percentage of PS-exposing cells was higher in the *Plasmodium*-infected thymi than that observed in the control ones (Figure 4A). Next, apoptosis induction was analyzed among phenotypically defined thymocyte subsets, including CD4⁻CD8⁻ (double negative, DN), CD4⁺CD8⁺ (double positive, DP), CD4⁺CD8⁻ (single positive, CD4), and CD4⁻CD8⁺ (single positive, CD8) subpopulations. High DN and DP cells percentages and a low CD8-positive cells percentage were associated with infected thymi (Figure 4B). No change in the CD4-positive cells percentage was observed.

Although the rate of apoptosis in the thymus from infected animals is much higher than the controls, the hypothesis that a premature emigration of thymic cells to the peripheral lymphoid organs may also account for the severe atrophy observed during *Plasmodium* infection can not be ruled out. In order to address this issue, we analyzed the cells from spleen and mesenteric lymph nodes on the basis of CD4 and CD8 immunophenotype. Significant differences were seen after 14 days of infection between control and infected mice in the mesenteric lymph nodes. Alterations were found in the cellularity of mesenteric lymph nodes from *Plasmodium*-infected animals, which showed lower

absolute T lymphocyte counts (Figure 5A) and increased percentage of early apoptotic cells (Figure 5B). Infected animals also presented an increase in the percentage and absolute CD4⁺CD8⁻ (DN) and CD4⁺CD8⁺ (DP) T lymphocyte count, a decrease in the percentage and absolute CD4⁺ T lymphocyte count, and an increase in the absolute CD8⁺ T lymphocyte count (although no significant difference was seen in the percentage of these cells) (Figure 5C and 5D). No significant differences were found in the spleen (data not presented).

Discussion

T cell development occurs through a sequence of events that begins with the migration of bone marrow-derived lymphoid progenitors to the thymus and ending with the emigration of immunocompetent TCD4⁺ and TCD8⁺ lymphocytes to the periphery of the immune system. There is much literature demonstrating that the proper T cell maturation depends on sequential interactions between lymphoid progenitors and stromal cells found in distinct regions of the cortex and medulla (Anderson *et al.*, 1996; Ciofani & Zúñiga-Pflücker, 2007). Although the molecular mechanisms that govern intrathymic migration are poorly understood, it is already known that the maintenance of intact thymic microenvironments is crucial for proper T cell generation (Anderson *et al.*, 2007; Petrie & Zúñiga-Pflücker, 2007; Vicente *et al.*, 2010; Savino *et al.*, 2004).

Early studies have already disclosed that viruses, fungi, parasites, and bacterias can affect the thymus direct or indirectly, harm the host immune response and contribute to the pathogenicity of these microorganisms (Price *et al.*, 1993; Sutton *et al.*, 1994; Alvarez *et al.*, 1995; Ozeki *et al.*, 1997; Islam *et al.*, 1998). Acute thymic atrophy observed during infections is accompanied by loss of the maintenance of thymic microenvironment and abnormal development of thymocytes (Savino *et al.*, 1986;

Sodora *et al.*, 2002; Brito *et al.*, 2003; Souto *et al.*, 2003; Savino, 2006; Seixas & Ostler, 2005; Cota-de-almeida *et al.*, 2003; Andrade *et al.*, 2008).

A previous report from our laboratory has shown that after 14 days of infection parasites can be found inside the thymus and the organ presents a profound atrophy with total loss of its architecture (Andrade *et al.*, 2008). In the current study, we have shown that the thymus undergoes a progressive involution that starts at around 5 days of infection and peaks on day 14. In the experimental model presented here, the mice are unable to resolve infection and succumbed with uncontrolled parasitemia. It is not clear whether or not the thymus, in a non-lethal model, would be able to reverse the thymic atrophy and restore its architecture. Experiments to address this question are currently in progress in our laboratory.

Due to the dynamic nature of the thymus, it seemed possible that *Plasmodium* infection was interfering with positive and/or negative selection processes, resulting in aberrant apoptosis of thymocytes. In fact, the enhanced levels of thymocyte apoptosis were correlated with severe thymic atrophy in *Plasmodium*-infected animals. This is quite reasonable because the thymus is a very dynamic organ, with a continual turnover of thymocytes undergoing positive and negative selection. Both of these processes involve apoptosis. Thus, enhanced rates of thymocyte apoptosis without compensating increases in thymocyte division would result in decreased numbers of thymocytes in an infected thymus. In a non-lethal malaria model of *Plasmodium chabaudi*, Seixas and Ostler (2005) have observed thymic atrophy with depletion of single-positive CD4⁺ and CD8⁺ T cells. In our lethal malaria model, we have demonstrated reduction of all thymocyte subpopulations. The mechanism by which *Plasmodium* infection leads to enhanced levels of thymocyte apoptosis is still unclear. One possible explanation is that a direct action of the parasite plays a role, since we have previously shown the presence

of parasites inside the thymus. However, until now we have no result to support this possibility.

If the involvement of *Plasmodium* is ruled out as a factor underlying increased thymocyte apoptosis, then systemic factors, like cytokines, released during the immune response against the parasite might be considered the cause. We are currently investigating the involvement of the cytokine Interferon-gamma (INF- γ) during apoptosis induction of thymocytes in *Plasmodium*-infected mice. As expected, infected animals present high INF- γ serum levels. However, at around day 14 post-infection, when the atrophy and apoptosis reach the maximum rate, these levels are comparable to the non-infected control mice. Also, thymi of IFN-deficient mice when infected with *Plasmodium* do not differ significantly from the wild-type mice or from the experimental model presented here (data not shown). Although preliminary, these results indicate that INF- γ is not directly involved in apoptosis induction during *Plasmodium* infection. Now we intend to test whether or not Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) is an autocrine mediator critical for the activation of apoptosis in our model since the initial acute phase of the blood infection is characterised by proinflammatory mediators, particularly this cytokine.

As pointed out by Savino (2006), the mechanism of thymic atrophy in acute infections might be different in distinct diseases. One possibility is associated with an increase of serum glucocorticoid hormone levels in response to the infection, which can trigger apoptosis in thymocytes (Savino, 2006, Perez *et al.*, 2007). Additionally, it has been suggested that tumor necrosis factor (TNF) also plays a role in the process of thymic atrophy and thymocyte depletion in mice infected with *T. cruzi* (Perez *et al.*, 2007) and *F. tularensis* (Chen *et al.*, 2005).

A model of homeostatic overexpression of TNF/LT cytokines using the genomic human TNF/LT locus as a low copy number Tg was used to investigate the role of TNF and LT (previously known as tumor necrosis factor-beta) in thymic development and function. The expression of Tg TNF/LT gene products led to thymic atrophy, suggesting that upregulation of LT and TNF might be responsible for thymic atrophy in infections (Liepinsh *et al*, 2009).

There is evidence that thymic emigration occurs as a result of a multistep process starting with the correct localization of mature T cells to the thymic medulla and terminating with the movement of thymocytes from the medulla into the blood through the endothelial venules (Petrie, 2003). Recently, we have also demonstrated 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 (Gameiro *et al.*, 2009). It seems quite plausible to suppose that such changes, which included increased expression of ECM components, but downregulation of surface expression of their specific integrin-type receptors, and increased chemokines CXCL12 and CXCR4 levels with decreased expression of their receptors (CCL25 and CCR9, respectively), must alter the intrathymic thymocyte migration pattern.

We then raised the hypothesis that pronounced thymic atrophy is also caused by a defect of thymocyte emigration process, which could be exporting immature cells to the periphery. By using flow cytometric analysis, we have demonstrated the presence of a consistent fraction of immature thymocytes (DN and DP) in mesenteric lymph nodes of *Plasmodium*-infected mice. Although this result serves as evidence of premature emigration of non-mature thymocytes the precise mechanism by which this process occurs is unclear.

Savino (2006) suggested that altered thymocyte migration could be responsible for releasing potentially autoreactive cells in *T. cruzi* infection. However, this hypothesis has not been further investigated.

Although 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 (Marsh & Kinyanjui, 2006; Schofield & Grau, 2005; Seixas & Ostler, 2005). 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. This is illustrated by detection of serum IgG and IFN γ producing CD4⁺ T cells (Fonseca *et al.*, 2007).

Decreased CD4⁺ T cell number was found in the MLN from *Plasmodium* infected animals. This can be explained by the destruction and/or reduced production of CD4⁺ T cells and certainly decrease host ability to respond to parasite. Increased CD8⁺ T cell number was also observed in infected-MLN, and we believe that this can be explained by peripheral expansion and/or redistribution of pre-existing cytotoxic T cells; although increased thymic output must also be taken into account.

The study of recent thymic emigrants would provide valuable information and help to explain the results presented here. However, the severe atrophy observed during acute *P. berghei* infection generates a technical problem because injecting FITC into this atrophic thymus is virtually impossible. So, evaluation of thymic output by determination of CD4⁺ and CD8⁺ cells with naïve phenotype (coexpression of CD45RA and CD62L) and determination of T-cell receptor excision circles (TRECs) have been attempted in our laboratory. On the other hand, it is already known that the acute thymic

involution resulting from infection is transient and the thymus quickly recovers when the causative agent is eliminated. Our laboratory is now trying to develop a non-lethal model of *Plasmodium berghei* NK65 infection to investigate the consequences of thymic atrophy during a long period of time for the host immune response.

Currently, there are no treatments available to protect against acute thymic atrophy or to accelerate recovery, thus leaving the immune system compromised during infections. Our findings provide relevant information concerning the immune involvement in malaria infection. Moreover, the murine model described here could be useful for mechanist studies of acute thymic atrophy.

Acknowledgements

We thank Dra. Irente Lorand-Metze from Centro de Hematologia e Hemoterapia – Hemocentro de Campinas for her generous assistance with the FACSaria[®] cytometer. The authors extend special thanks to Marcos C. Meneghetti and Lucimara Rocha da Silva for animal colony maintenance and expert technical help, respectively. This work was supported by the state-granting agency (FAPESP - #08/58604-0) and C.F.A. was a recipient of a Master fellowship (FAPESP - # 08/56496-6).

References

- Alvarez, F., Villena, A., Zapata, A. Rasquin, B., 1995. Histopathology of the thymus in *Saprolegnia*-infected wild brown trout, *Salmo trutta* L. Vet. Immunol. Immunopathol. 47, 163-72.
- Anderson, G., Moore, N.C., Owen, J.J.T., Jenkinson, E.J., 1996. Cellular interactions in thymocyte development. Annual Review of Immunology.14, 73-99.
- Anderson, G., Lane, P.J., Jenkinson, E.J., 2007. Generating intrathymic microenvironments to establish T-cell tolerance. Nat. Rev. Immunol. 7, 954-63.
- Andrade, C.F., Gameiro, J., Nagib, P.R.A., Carvalho, B.O., Talaisys, R.L., Costa, F.T.M., Verinaud, L., 2008. Thymic Alterations in *Plasmodium berghei*-infected mice. Cell. Immunol. 253, 1-4.
- Brito, V.N., Souto, P.C.S., Cruz-Höfling, M.A., Ricci, L.C., Verinaud, L., 2003. Thymus invasion and atrophy induced by *Paracoccidioides brasiliensis* in BALB/c mice, Med Mycol. 41, 83-87.
- 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, 189-96.
- Ciofani, M., Zúñiga-Pflücker, J.C., 2007. The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 23, 463–493.
- Cotta-de-Almeida, V., Bonomo, A., Mendes-da-Cruz, D.A., Riederer, I. de Meis J., Lima-Quaresma, K.R.F., Vieira-de-Abreu, A., Villa-Verde, D.M.S., Savino, W., 2003.

Trypanosoma cruzi infection modulates intrathymic contents of extracellular matrix ligands and receptors and alters thymocyte migration. Eur. J. Immunol. 32,2329-2338.

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.

Gameiro, J., Nagib, P.R.A., Andrade, C.F., Villa-Verde, D.M., Silva-Barbosa, S.D., Savino, W., Costa, F.T.M., Verinaud, L., 2009. Changes in Cell Migration-Related Molecules Expressed by Thymic Microenvironment during Experimental *Plasmodium berghei* Infection: Consequences on Thymocyte Development. Immunology 129, 248-256.

Islam, Z., Nagase, M., Yoshizawa, T., Yamauchi, K., Sakato, N. 1998. T-2 toxin induces thymic apoptosis *in vivo* in mice. Toxicol. Appl. Pharmacol. 148, 205-14.

Leite-de-Moraes, M.C., Hontebeyrie-Joskowicz, M., Dardenne, M., Savino, W., 1992. Modulation of thymocyte subsets during acute and chronic phases of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Immunology 77,95-98.

Liepinsh, D.J., Kruglov, A.A., Galimov, A.R., Shakhov, A.N., Shebzukhov, Y.V., Kuchmiy, A.A., Grivennikov, S.I., Tumanov, A.V., Drutskaya, M.S., Feigenbaum, L., Kuprash, D.V., Nedospasov, S.A. 2009. Accelerated thymic atrophy as a result of elevated homeostatic expression of the genes encoded by the TNF/lymphotoxin cytokine locus. Eur J Immunol. 39, 2906-15.

- 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.* 194,127-134.
- Marsh, K., Kinyanjui, S., 2006. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol.* 28,51–60.
- Ozeki, Y., Kaneda, K., Fujiwara, N., Morimoto, M., Oka, S., Yano, I. 1997 In vivo induction of apoptosis in the thymus by administration of mycobacterial cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate). *Infect. Immun.* 65, 1793-9.
- Pérez, A.R., Roggero, E., Nicora, A., Palazzi, J., Besedovsky, H.O., Del Rey, A., Bottasso, O.A. 2007 Thymus atrophy during *Trypanosoma cruzi* infection is caused by an immuno-endocrine imbalance. *Brain. Behav. Immun.* 21, 890-900.
- Petrie, H.T., 2002. Role of *thymic* organ structure and stromal composition in steady-state postnatal T-cell production. *Immunol. Rev.* 189,8-20.
- Petrie, H. T.. 2003. Cell migration and the control of post-natal T-cell lymphopoiesis in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.* 3:859.-866
- Petrie, H.T., Zúñiga-Pflücker, J.C., 2007. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 649–679.
- Price, P., Olver, S.D., Gibbons, A.E., Teo, H.K., Shellam, G.R., 1993 Characterization of thymic involution induced by murine cytomegalovirus infection. *Immunol. Cell. Biol.* 71, 155-65.

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, 302-307.

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.* 19,1726-1732.

Savino, W., Mendes-Da-Cruz, D.A., 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.

Savino, W., 2006. The thymus is a common target organ in infectious diseases. *PLoS Pathog.* 6, 472-483.

Schofield, L., Grau, G., 2005. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev. Immunol.* 5, 722-35.

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

Shanker, A., 2004. Is thymus redundant after adulthood? *Immunol. Lett.* 91, 79-86.

Sodora, D.L., Milush, J.M., Ware, F., Wozniakowski, A., Montgomery, L., McClure, H.M., Lackner, A.A., Marthas, M., Hirsch, V., Johnson, R.P., Douek, D.C., Koup, R.A., 2002. Decreased levels of recent thymic emigrants in peripheral blood of simian immunodeficiency virus-infected macaques correlate with alterations within the thymus. *J. Virol.* 76, 9981-9990.

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

Sutton, P., Newcombe, N.R., Waring, P., Müllbacher, A., 1994. *In vivo* immunosuppressive activity of gliotoxin, a metabolite produced by human pathogenic fungi. *Infect. Immun.* 62, 1192-8.

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

van Ewijk, W., Wang, B., Holländer, G.A., Kawamoto, H., Spanopoulou, E., Itoi, M., Amagai, T., Jiang, Y.F., Germeraad, W.T., Chen, W.F., Katsura, Y., 1999. *Thymic microenvironments*, 3-D versus 2-D? *Semin. Immunol.* 1, 57-64.

Vicente, R., Swainson, L., Marty-Grès, S., De Barros, S.C., Kinet, S., Zimmermann V.S., Taylor, N., 2010. Molecular and cellular basis of T cell lineage commitment. *Semin. Immunol.* 22, 270-5.

Figure Legends

Figure 1: Changes of thymus weights in *Plasmodium berghei*-infected BALB/c mice.

Note significant differences between control and infected mice on days 7 and 14 p.i. (all

values in the figures are expressed as means $\pm$ SE from 5 mice for each group).

** $p < 0.01$ and *** $p < 0.005$.

Figure 2: Representative histological changes in thymus after *Plasmodium berghei*

infection. Thymus of a control mouse (A) and of a mouse at 5 days after infection (B),

showing no histological changes. (C) Thymus of a mouse at 10 days after infection,

showing reduction of cortical thickness and the thymocyte numbers. (D) Thymus of a

mouse at 14 days after infection, showing total loss of cortical-medullary delimitation.

Magnification: $\times 100$.

Figure 3: Evaluation of cortical and medullar apoptosis in thymus by TUNEL staining.

(A) Representative photographs of TUNEL-positive cells in control and Plasmodium-

infected mice after 14 days of infection are shown. The result reveals increased number

of TUNEL-positive cells in Plasmodium-infected animals mainly in the medullar area.

Magnification: $\times 100$. (B) The data represent means $\pm$ SE of 5 different mice per group,

expressed as the apoptotic body index (ABI) in the cortical and medullar areas.

*** $p < 0.005$.

Figure 4: Detection of apoptotic cells in thymus by Annexin V staining. (A)

Fluorescence cytograms (propidium fluorescence versus APC fluorescence). Results are

presented as the mean percentage of live cells (in the lower left quadrant), early

apoptotic cells (in the lower right quadrant), late apoptotic cells (in the upper right

quadrant) $\pm$ SE ($n = 5$). Data shown refer to a single experiment, but is representative of

all experiments. (B) Annexin V positivity in CD4/CD8-defined subpopulations (DN:CD4⁻CD8⁻, DP:CD4⁺CD8⁺, CD4:CD4⁺CD8⁻, CD8:CD4⁻CD8⁺) from control and *Plasmodium berghei*-infected mice. Values expressed as means $\pm$ SE for at least 5 different animals per group, with infected animals being sacrificed on day 14 post-infection. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.005$ versus control group.

Figure 5: Changes on CD4 and CD8 immunophenotype of the mesenteric lymph nodes after *Plasmodium berghei* infection (14 days p.i.). (A) Decreased absolute T lymphocyte count. (B) Increased percentage of early apoptotic cells. (C) and (D) Increased percentage and absolute CD4⁻CD8⁻ (DN) and CD4⁺CD8⁺ (DP) T lymphocyte count, decreased percentage and absolute CD4⁺ T lymphocyte count, and increased absolute CD8⁺ T lymphocyte count. * $p < 0.05$ and **** $p < 0.001$ versus control group.

Figure 1

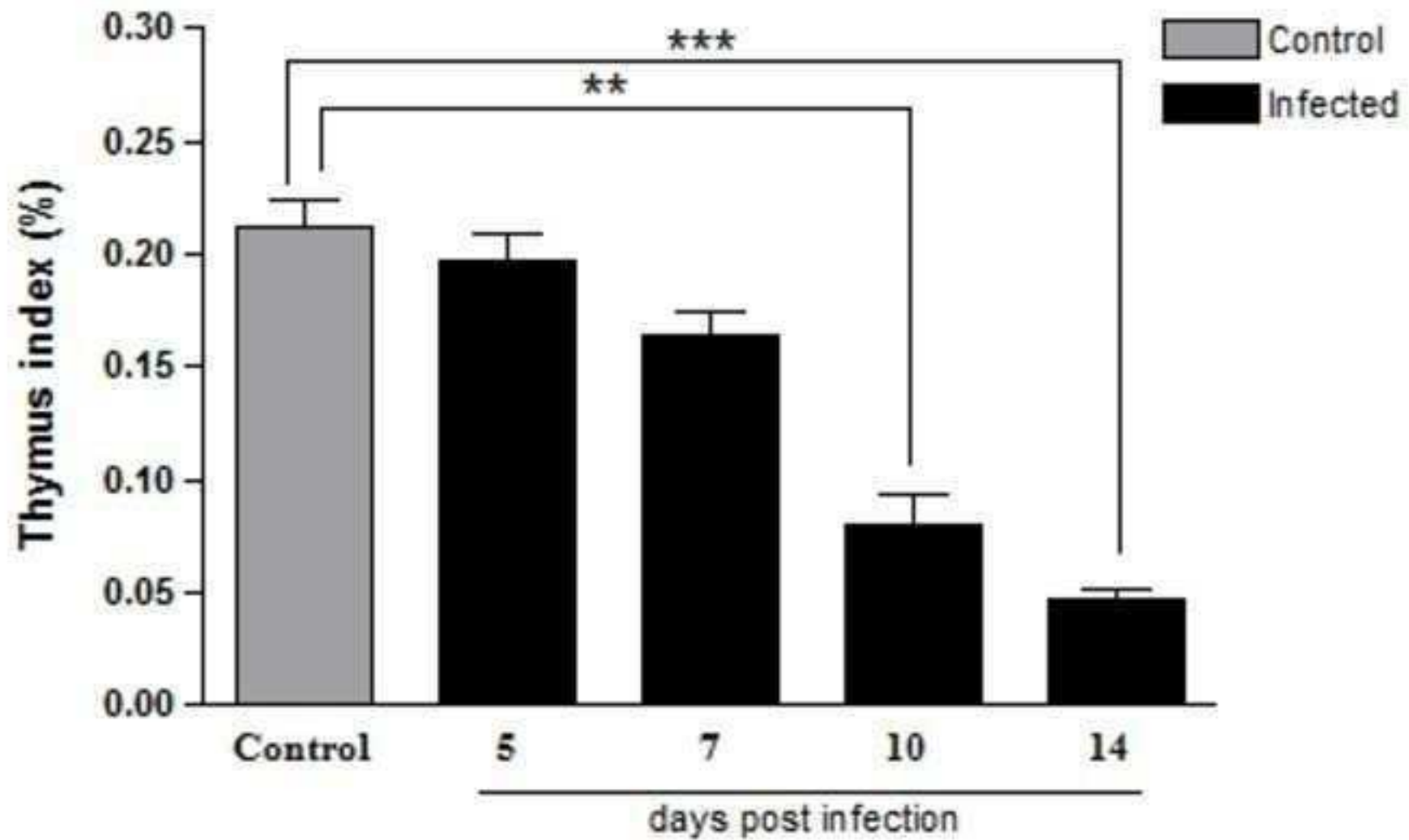
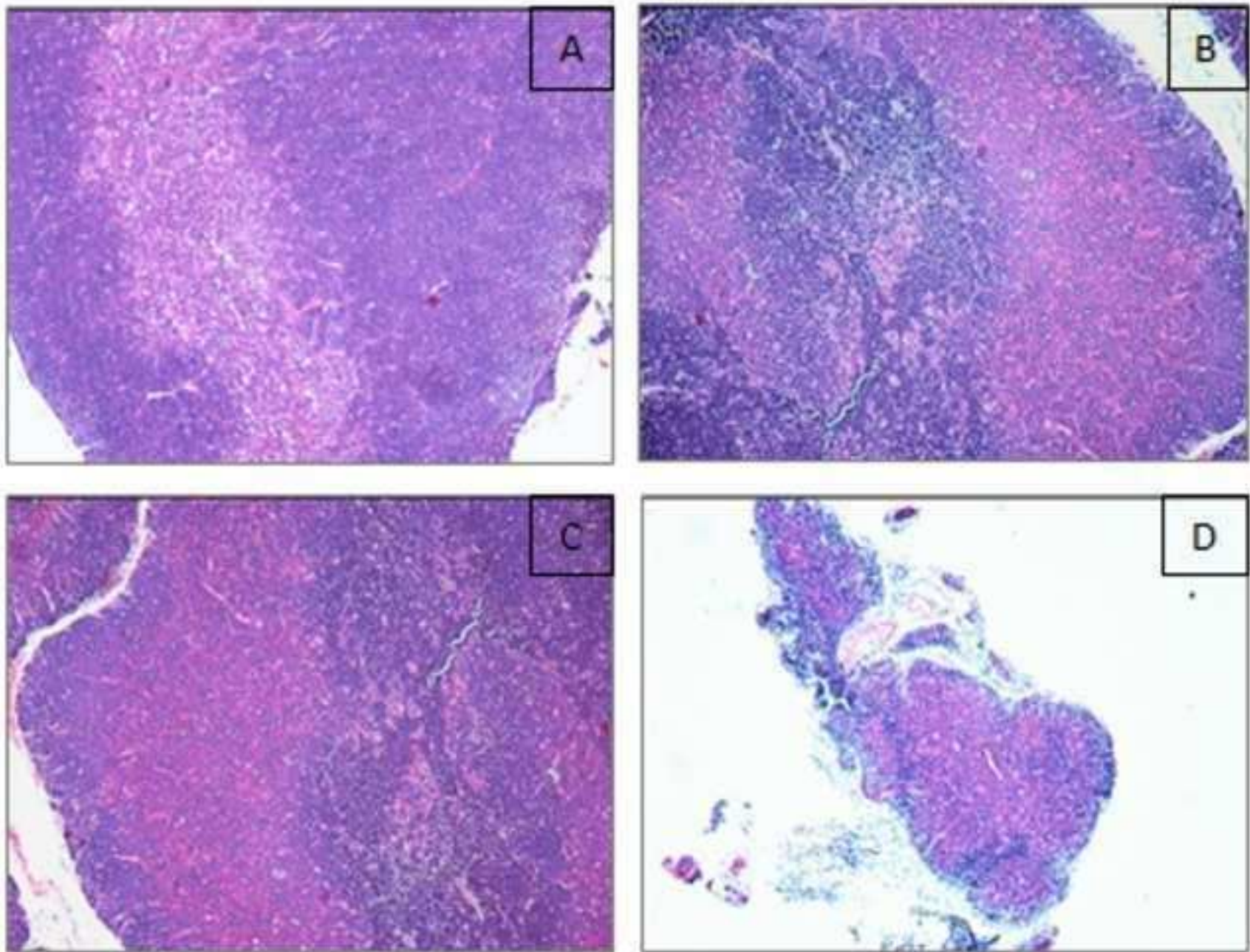
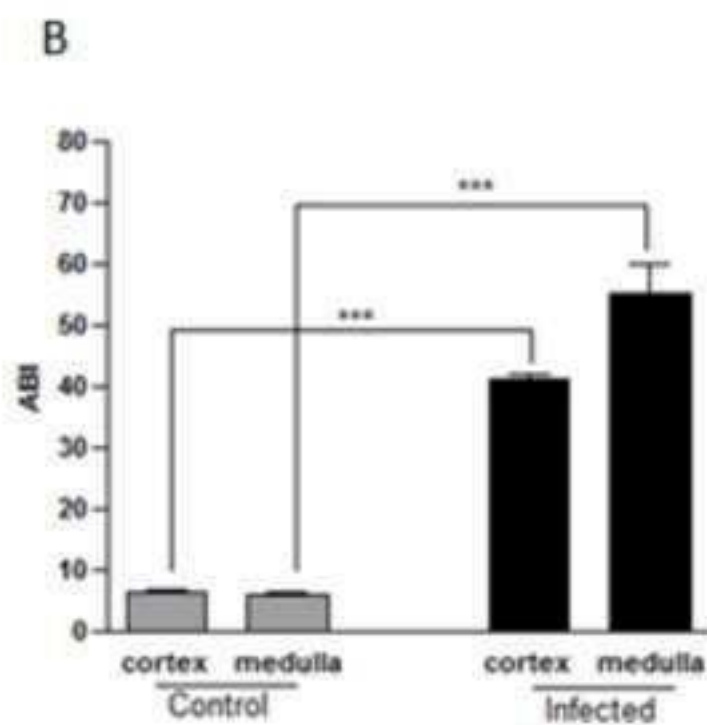
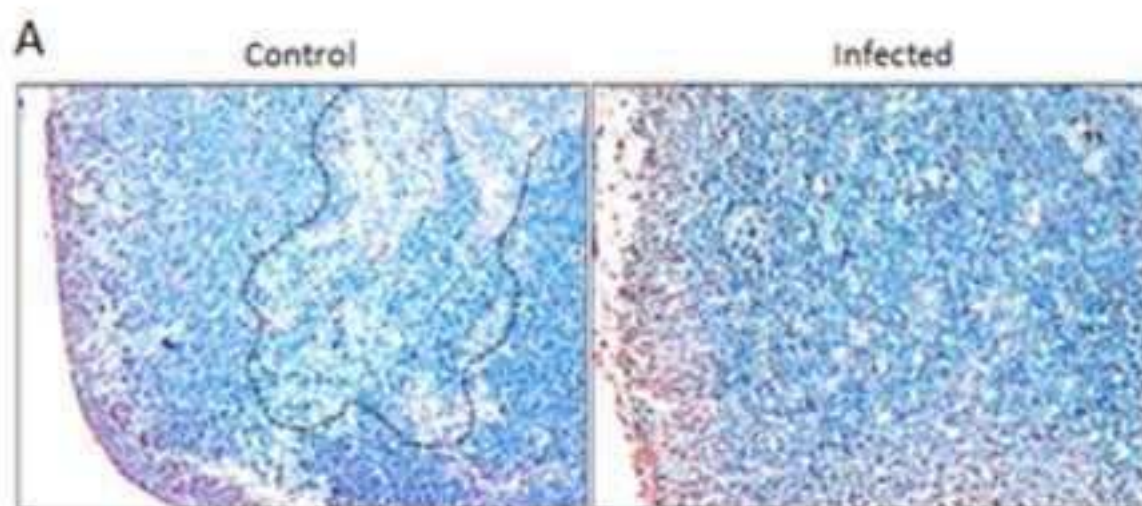


Figure 2





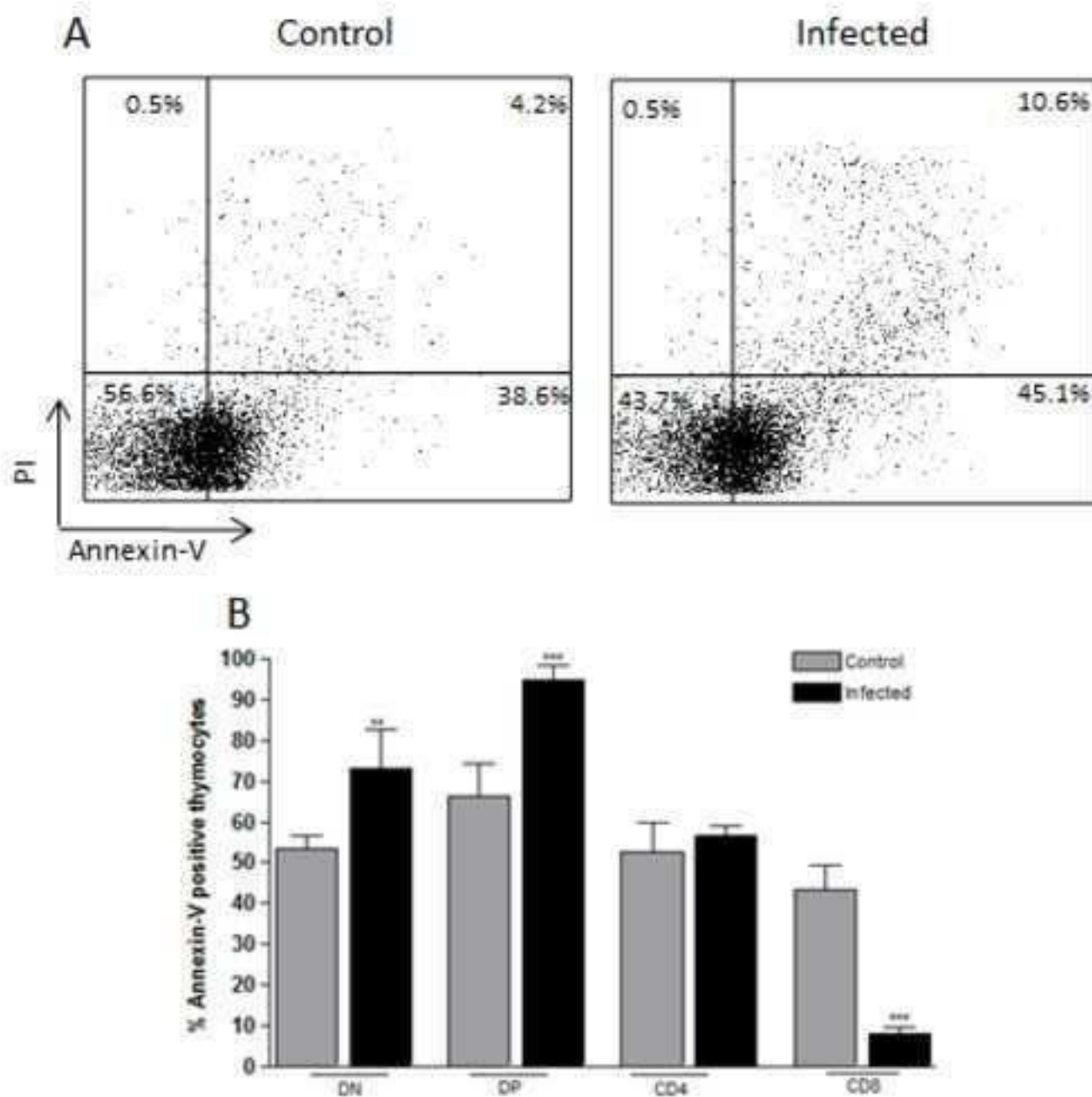


Figure 5

