

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Alliny Carolina Dionete Lima

**“Atrofia Tímica induzida por *Plamodium berghei*: Análise da expressão e atividade de metaloproteinases e seus inibidores”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)

*Alliny Carolina D. Lima*

*Liana Maria Cardoso 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, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

D622a Dionete, Alliny Carolina, 1988-  
Atrofia tímica induzida por *Plasmodium berghei*:  
análise da expressão e atividade das metaloproteínas  
e seus inibidores / Alliny Carolina Dionete. – Campinas,  
SP: [s.n.], 2011.

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

1. Atrofia tímica. 2. *Plasmodium berghei*. 3.  
Malária. 4. Metaloproteínas. 5. Inibidores teciduais  
de Metaloproteínas. I. Verinaud, Liana Maria  
Cardoso, 1969-. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Thimic atrophy induced by *Plasmodium berghei*: analysis of expression and activity of metalloproteinases and their inhibitors

**Palavras-chave em Inglês:**

Thimic atrophy

*Plasmodium berghei*

Malaria

Metalloproteinases

Tissue inhibitor of metalloproteinases

**Área de concentração:** Imunologia

**Titulação:** Mestre em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Liana Maria Cardoso Verinaud [Orientador]

Dagmar Ruth Stach Machado

Stephen Hyslop

**Data da defesa:** 28-02-2012

**Programa de Pós Graduação:** Genética e Biologia Molecular

Campinas, 28 de Fevereiro de 2012

**BANCA EXAMINADORA**

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

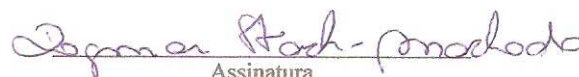


Assinatura

Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos

Assinatura

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



Assinatura

Prof(a). Dr(a) . Eva Burger

Assinatura

Prof. Dr . Stephen Hyslop



Assinatura

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, São Paulo, com apoio financeiro da FAPESP (Processo # 08/58604-04) e CAPES, pelo Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular (PG-GBM).



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

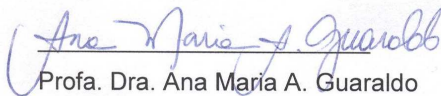
Certificamos que o Protocolo nº **1789-1**, sobre "**Análise da expressão e atividade de metaloproteínas e seus inibidores durante a atrofia tímica induzida por *Plasmodium berghei***", sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Liana Maria Carvalho Verinaud / Alliny Carolina Dionete Lima**, está de acordo 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 **16 de março de 2009**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1789-1**, entitled "**Expression and activity analysis of metalloproteinases and their inhibitors during thymic atrophy induced by *Plasmodium berghei***", 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 **March 16, 2009**.

Campinas, 15 de dezembro de 2011.

2ª. VIA

  
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](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

“Se a educação sozinha não pode transformar a sociedade,  
tampouco sem ela a sociedade muda”

Paulo Freire

À minha mãe, Cida, que com sua ternura e força  
mostrou-me o melhor exemplo de como  
alcançar à felicidade.

## AGRADECIMENTOS

Sempre penso que tive uma grande sorte por ter conhecido as pessoas maravilhosas que encontrei pelos caminhos da vida. Hoje, tenho a oportunidade de agradecê-las neste trabalho.

Não poderia iniciar estes agradecimentos por outra pessoa sem ser a pessoa mais importante do mundo para mim: Minha mãe, Cida. A você, minha querida, pela minha vida. Por lutar incondicionalmente pelo meu aprendizado tanto escolar como o aprendizado das lições da vida. A você, por sozinha conseguir me dar tudo que eu precisava para me tornar a mulher que eu sou hoje. Por nunca desistir de me fazer uma pessoa sempre melhor, por me mostrar o valor das pequenas atitudes, por ser uma mulher tão guerreira e ao mesmo tempo tão doce e dedicada à família. Ah, se eu pudesse ser metade do ser humano que você é, mamãe. A você agradeço por lutar junto comigo, por mais esta conquista. À você agradeço por ser a minha mãe. Eu te amo com o amor mais profundo que possa existir.

À minha avó Alice, pelo amor e auxílio desde criança até hoje. Você é a minha segunda mãe, vó!

Às minhas irmãs Alessandra e Andressa, por serem o meu porto seguro. Por me auxiliarem em tudo, principalmente nesses anos morando fora de bauru. Obrigada pelos conselhos, pelos puxões de orelha e claro, por todas as caronas que vocês me deram na vida.

Aos meus cunhados Alexandre e Cláudio por serem também parte desta família, por me ajudarem sempre e também pelas caronas.

Ao meu querido sobrinho Enzo que nasceu há pouco tempo, mas que já ocupa um espaço imenso em meu coração. Você é a minha razão de acordar feliz.

Ao meu pai, Ednilson, sua esposa, Noeli e meu irmãozinho querido, Henry. Por serem as pessoas que mais me proporcionam momentos de descontração e alegria fazendo uma das coisas que eu mais



gosto que é cantar. Nô, nunca me esqueço do que você me disse a vida inteira: Que a estrela que me acompanha brilha muito forte. Obrigada por acreditar em mim.

À Jandira e Walter, por terem sido como pais para mim quando eu iniciei o meu mestrado. E também, a todos os amigos queridos que eu fiz em Vinhedo. Vocês todos vão morar para sempre no meu coração.

À minha orientadora, Liana Verinaud, por todo o auxílio, pelos conselhos, pela força, por tudo. Você também é um pouquinho mãe de todos nós, Liana.

Às minhas queridas amigas da faculdade, Mariana e Talitha por estarem por perto e me apoiando principalmente quando eu iniciei o mestrado.

À Nay, minha amiga, minha irmã, meu exemplo. Por tudo que você me inspirou a ser, pela força nos momentos mais difíceis e pelos conselhos maravilhosos de vida. Eu te amo, amiga.

Aos meus maravilhosos amigos Tosi, Felipe, Luana, Serginho, Lourdes pela companhia e apoio durante esses anos todos.

À Thais, minha irmã de alma, pelos onze anos de amizade. Você é inestimável para mim. Obrigada por ser a pessoa que mais acredita no meu potencial. Obrigada por me ajudar a escolher a minha profissão quando tínhamos dezesseis anos e eu dava aulas para você de Geometria espacial. Tudo bem, me tornei bióloga, mas não abri mão de ser professora.

Ao Bruno, por estar ao meu lado em todos os momentos desde o início da faculdade. Por todos os momentos difíceis, todas as risadas, todas as tortas em casa, todos os filmes que eu dormi na metade, todas as festas, todos os passeios. Por todos esses últimos oito anos que eu passei da condição de uma menina recém-colegiada, para uma mulher, mestre agora. Você foi essencial em minha vida, principalmente nos momentos pré embarque em vôos que eu tenho pavor.

Aos meus colegas de laboratório, Carol, Rosária, Thiago, Rodolfo e Ieda, e também à Lucimara pelos auxílios técnicos, pela força, e claro: pelas coxinhas.

Ao Marcos, por ser um grande amigo em Campinas, por todos os auxílios no biotério e na vida. Obrigada por ser a pessoa em que confio para ser meu confidente e conselheiro.

Aos grandes amigos Luizinha, Felipe, Bruninha e Mari os quais eu tive o privilégio de dividir mais que uma casa, um lar.

À minha querida amiga Jubs, que além de dividir um lar, dividimos um quarto, uma vida. Dividimos nossos sonhos, nossos medos e nossos mais profundos segredos. Sou imensamente grata por ter encontrado você no momento que eu mais precisei de uma amiga aqui em Campinas. Obrigada por carinhosamente me trazer uma xícara de leite para me consolar nos momentos difíceis. Sua amizade para mim vale mais que ouro.

Ao Felipe Bocucci e toda a sua família por estarem ao meu lado durante 2011. Com vocês aprendi que devemos dar o devido valor às coisas certas. Obrigada por tudo.

Às amigas Patrícia e Geni, pelo estudo bíblico e pela visão nova das coisas que estou aprendendo com vocês. Obrigada por serem tão especiais em minha vida.

À professora Maria do Carmo, que me ensinou como ver o que era o ensino e a importância do professor para o aluno. Obrigada pelos anos de cursinho Principia.

A todos os meus professores da UNESP que me ajudaram a formar a base de muitos conhecimentos que eu usei durante o mestrado.

E por fim e mais importante a Jeová Deus, pela minha vida, por me permitir alcançar os meus sonhos e os meus objetivos. “Eu, Jeová, sou teu Deus, aquele que te ensina a tirar proveito, aquele que te faz pisar no caminho em que deves andar” (Is 48:17).

## RESUMO

O timo é um órgão linfóide primário localizado no mediastino anterior cuja função principal é o desenvolvimento das células T.

Os precursores imaturos dos linfócitos T oriundos da medula óssea chegam ao timo através da junção córtico-medular e são denominados de timócitos. Estes timócitos passam por estágio denominados duplo-negativos (DN), não expressando os co-receptores CD4 e CD8, duplo positivos, expressando estes dois receptores e simples positivo, expressando somente um dos receptores. Desta forma, o completo desenvolvimento de células T torna-se dependente da constante migração dos precursores hematopoiéticos através do microambiente tímico que é composto por componentes linfóides e não linfóides.

Já está bem documentada na literatura a importância que a matriz extracelular (MEC) exerce nos processos de migração dos timócitos. Durante todo este processo, os timócitos interagem com os componentes do microambiente tímico composto pela rede tridimensional formada por células epiteliais tímicas (*TEC*), macrófagos, células dendríticas, fibroblastos e componentes da matriz extracelular.

Contudo, esta rede tridimensional pode ser remodelada pela ação de enzimas denominadas metaloproteinases de matriz (MMPs) que são capazes de degradar componentes da MEC revelando sítios de ligação para diversas integrinas e liberando fatores de crescimento e quimiocinas interligadas a esta rede.

No timo já foram descritos vários membros da família das MMPs, como a MMP-2, 9, 14, 19 e ADAM 10, 17 e 28. Contudo, pouco se sabe sobre a atuação destas moléculas nos processos intratímicos .

Estudos recentes do nosso grupo mostraram que a atrofia tímica induzida por *P. berghei*, um protozoário transmitido através da picada de um mosquito do gênero anófeles, leva a numerosas alterações no ambiente tímico.

Assim, no presente trabalho pretende-se avaliar, quantitativamente e funcionalmente, possíveis alterações nas metaloproteinases MMP-2, 9, bem como nos seus inibidores TIMP-1, TIMP-2 durante a atrofia tímica observada após infecção pelo *Plasmodium berghei* NK65.

## ABSTRACT

The primary function of the thymus is to develop immature T-cells into cells that will be able to carry out immune functions. So, alterations in its microenvironment may disrupt intrathymic processes leading to an altered exportation of T cell to the periphery. We have recently showed that experimentally *Plasmodium berghei*-infected mice present severe thymic alterations characterized by atrophy with depletion of double-positive thymocytes, histological alterations with loss of delimitation between cortical and medullar regions, and altered expression of cytokines and its respective receptors. Besides, it was also observed that such alterations, conjunctively, are able to promote increase of thymocyte migratory activity. Considering that MMPs also have a crucial role in thymocyte migration, in this study we investigated alterations in the expression pattern and activity of matrix metalloproteinases MMP-2, 9, 14, 19 and ADAM-28, as well as in tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-1, TIMP-2 and RECK, by using the same experimental model. Our results show differential expression pattern of MMPs and TIMPs mRNAs among infected and non-infected mice. Besides, an imbalance between MMPs and their inhibitors that results in altered proteolytic activity were observed in thymus from infected mice. We hypothesize that disturbed MMP and TIMP expression and activity have also a role in the altered thymocyte migration through intrathymic microenvironments observed during *plasmodium* infection.

## LISTA DE ABREVIATURAS

CD4.....	Grupamento de diferenciação 4
CD8.....	Grupamento de diferenciação 6
DAB.....	Cromógeno de diaminobenzidina
DN.....	Duplo-negativos: Linfócitos que não expressam co-receptores CD4 e CD8
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico
DP	Duplo-positivos...Linfócitos que expressam co-receptores CD4 e CD8
HE.....	Hematoxilina
MEC.....	Matriz extracelular
MHC.....	Complexo Maior de Histocompatibilidade
MHC-I.....	Complexo Maior de Histocompatibilidade classe I
MHC-II.....	Complexo Maior de Histocompatibilidade classe II
MMP.....	Metaloproteinase
MT-MMP.....	Metaloproteinase de membrana
PBS.....	Solução salina tamponada com fosfato
RNA.....	Ácido ribonucleico
RT-PCR.....	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SEM.....	Erro padrão da média
SP	Simples-positivos..Linfócitos que expressam co-receptores CD4 ou CD8
SPF.....	Colônias livres de patógenos

TCR..... Receptor de células T  
TEC..... Células epiteliais tímicas  
TIMP..... Inibidor de metaloproteinase  
TNF- $\alpha$ ..... Fator alfa de necrose tumoral

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 O timo	19
1.2 Matriz extracelular tímica: metaloproteinases e seus inibidores	22
1.2.1 Colagenases	23
1.2.2 Gelatinases (MMP-2 e MMP-9)	24
1.2.3 Estromelisinases	24
1.2.4 Matrilisinases	24
1.2.5 Metaloelastase	25
1.2.6 MMPs ancoradas à membrana	25
1.3 Metaloproteinases no timo	25
1.4 Regulação da atividade das metaloproteinases	26
1.4.1 Regulação transcricional dos genes de metaloproteinases	26
1.4.2 Ativação proteolítica da pró-enzima	27
1.4.3 Inibição da atividade enzimática	27
1.5 Atrofia tímica e modelos experimentais	28
2.OBJETIVOS	31
3.MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Animais	32
3.2 Preparo do inoculo	32
3.3 Parasitemia	33
3.4 Índice tímico	33
3.5 Análise histopatológica do timo	33



3.6 Expressão de genes de metaloproteinases e seus inibidores	34
3.7 Análise da atividade enzimática das metaloproteinases	34
3.8 Análise da localização tecidual das metaloproteinases e seus inibidores	35
3.9 Análise quantitativa	36
3.10 Análise estatística	36
4.RESULTADOS	37
4.1 Parasitemia	37
4.2 Índice tímico	38
4.3 Análise histopatológica	39
4.4 Expressão gênica de metaloproteinases	41
4.4.1 Expressão gênica de MMP-2	41
4.4.2 Expressão gênica de MMP-9	42
4.5 Expressão gênica de inibidores de metaloproteinases	44
4.5.1 Expressão gênica de TIMP-1	44
4.5.2 Expressão gênica de TIMP-2	45
4.6 Atividade enzimática de metaloproteinases	47
4.7 Localização tecidual de metaloproteinases	51
4.7.1 Localização tecidual de MMP-2	51
4.7.2 Localização tecidual de MMP-9	53
4.8 Localização tecidual de inibidores de metaloproteinases	56
4.8.1 Localização tecidual de inibidores de TIMP-1	56
4.8.2 Localização tecidual de inibidores de TIMP-2	59
5.DISSCUSSÃO	62
6.CONCLUSÃO	67



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 O timo

O timo é um órgão linfóide primário localizado na porção ântero-superior da cavidade torácica, cuja função se resume na diferenciação e maturação dos linfócitos T. Ele é composto por dois lobos (direito e esquerdo), sendo cada lobo composto por lóbulos e estes, por sua vez, divididos em duas regiões: córtex, porção mais externa do órgão formada principalmente por componentes linfóides (timócitos), e medula, porção central do órgão composta principalmente por células epiteliais e mesenquimais (NISHINO *et al.*, 2006; CIOFANI & ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2007; VICENTE *et al.*, 2005).

A composição celular tímica engloba as células epiteliais tímicas (TECs) - que podem ser corticais ou medulares, macrófagos, células dendríticas, células *nurse* e fibroblastos, enquanto que a composição da matriz extracelular abrange moléculas tais como fibronectina, laminina, colágeno tipo I e colágeno tipo IV, entre outras. Estes componentes celulares e de matriz formam uma rede tridimensional disposta em diferentes microambientes de acordo com os tipos celulares presentes. Há também a produção de fatores solúveis, as quimiocinas e citocinas que exercem importante papel na taxia dos timócitos. Dentro do timo, os timócitos em desenvolvimento encontram diferentes microambientes onde ocorrem as interações célula-célula e/ou célula-matriz. Desta forma, a migração é um evento crucial para a diferenciação das células T no timo (Figura1) (revisado por SAVINO, 2006).

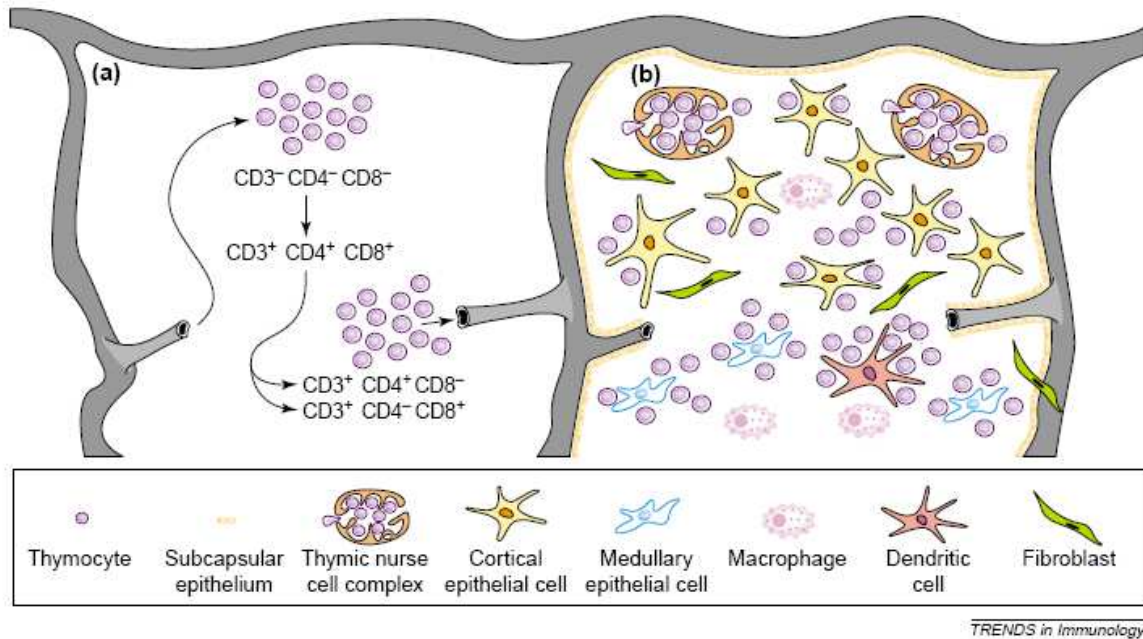


Figura1. Microambiente tímico. A figura mostra as diferentes células que compõe o timo, bem como a entrada de precursores de linfócitos T imaturos e saída de linfócitos T maduras para a periferia.

Diferentemente da medula óssea, o timo não contém nenhum potencial de auto-renovação e depende totalmente do fluxo semi-contínuo de células vindas da medula óssea através do sangue, para realizar sua função. Os progenitores de linfócitos T provenientes da medula óssea entram no timo pela região cortico-medular, ainda sem estarem comprometidos com a linhagem T e sem expressar os marcadores CD4 e CD8 característicos de células T, sendo chamados, portanto, de linfócitos ou timócitos duplo-negativos (DN) (PETRIE & ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2007).

Os timócitos DN se diferenciam fenotipicamente e passam pelos estágios DN1 até DN4, da medula em direção ao córtex. Durante este processo de migração, os timócitos DN iniciam a produção do receptor de célula T (TCR). Este receptor reconhece o complexo peptídeo-MHC formado nas células apresentadoras de antígenos. O TCR é distribuído clonalmente. Isto significa que diferentes clones de células T possuem distintos TCRs. Esta vasta variedade de TCRs ocorre devido a um evento denominado rearranjo gênico, o qual permite gerar grande variedade de TCRs utilizando uma fração

relativamente pequena do genoma. Este evento ocorre a partir da geração de rupturas e reparos na dupla hélice de DNA nos genes do TCR, além de inserções de nucleotídeos durante a união de genes diferentes. Assim, há alta variedade de TCRs nos clones de células T imaturas no timo. Este processo é essencial para a maturação de células T no timo (ABBAS *et al*, 2008).

Na zona subcapsular do órgão ocorrem as principais mudanças que levam as células duplo-negativas (DN) a adquirirem os marcadores CD4 e CD8, tornando-se assim células duplo-positivas (DP). Ainda no córtex, ocorrem eventos essenciais às células DP tais como: (i) perda da capacidade proliferativa, provavelmente por causa de estímulos proliferativos ou a alguns sinais anti-proliferativos, (ii) perda do contato celular, propiciando uma mobilidade maior dos timócitos na matriz tímica, e (iii) seleção positiva (PETRIE & ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2007).

A seleção positiva é um evento que garante que timócitos DP cujos receptores e co-receptores ligam-se às moléculas do MHC próprio, possam receber sinais de sobrevivência e migrar em direção à medula para dar continuidade à sua maturação. Aqueles timócitos que não interagem com o MHC próprio são eliminados por apoptose. Após a seleção positiva, as células DP perdem um dos receptores CD4 ou CD8 tornando-se células simples-positivas TCD4+ ou TCD8+(SP) e migram para a medula para finalizar sua maturação. Na medula tímica, as células SP, passam por outra seleção chamada seleção negativa, onde células cujos receptores e co-receptores reconhecem com alta afinidade peptídeos apresentados através do MHC, são eliminadas por apoptose. Esse processo é essencial para que não se desenvolva doenças auto-imunes devido ao reconhecimento de moléculas próprias na periferia do sistema imune (WITT & ROBEY, 2005; TAKAHAMA, 2006).

Por fim, os linfócitos TCD4+ e TCD8+ que sobreviveram à migração pelo timo, aos ganhos e perdas de receptores e às seleções positiva e negativa, deixam o timo para povoar regiões específicas nos órgãos linfoides secundários e exercer as funções de células T auxiliares e citotóxicas, respectivamente (Figura 2) (ANDERSON *et*, 2007, LYNCH, *et al.*, 2009).

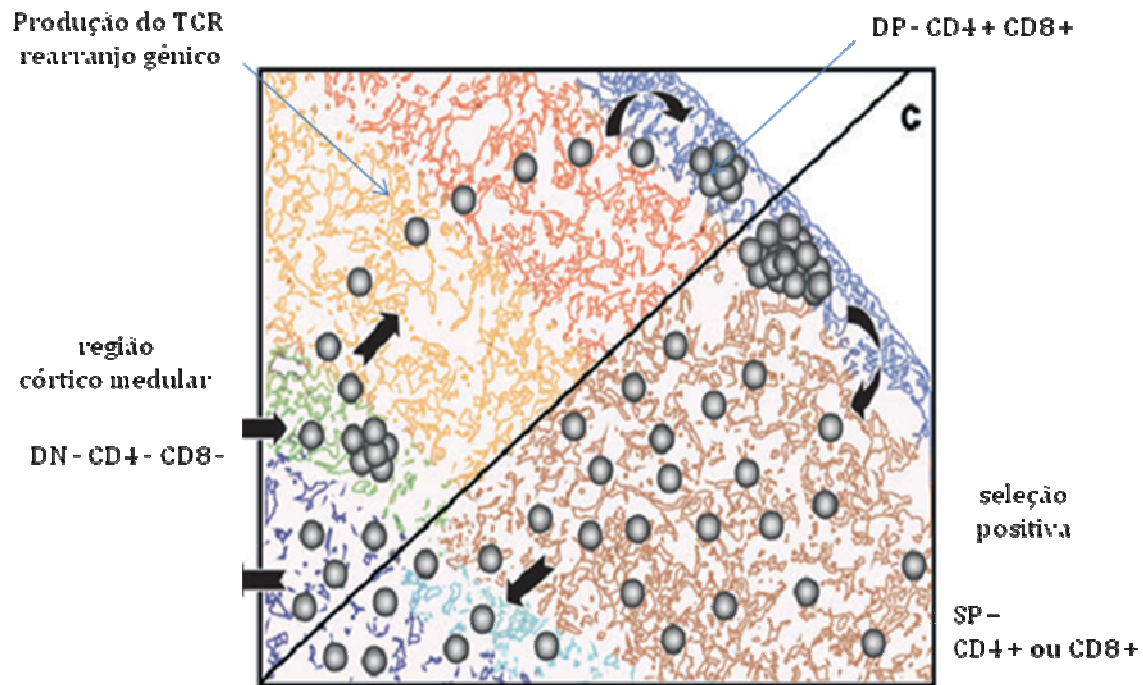


Figura 2. Migração e maturação dos timócitos. No timo, estas células fazem uma jornada até com diversas interações com o microambiente tímico até que possam estar maduras para executar as funções de células T helper e T citotóxico.

## 1.2 MMPs e seus Inibidores

Como vimos, o microambiente tímico é composto por células e matriz extracelular, essenciais para o desenvolvimento dos timócitos. Contudo, esta rede tridimensional pode ser remodelada pela ação de enzimas denominadas MMPs de matriz (MMPs) (SAVINO *et al.*, 2003). As MMPs (MMPs) compõem uma família de enzimas proteolíticas dependentes de zinco que, em sua totalidade, são capazes de degradar todas as proteínas constituintes da matriz extracelular (CURRAN & MURRAY, 2000; O'CHAROENRAT *et al.*, 2003; PALOSAARI *et al.*, 2003; ALA-AHO & KÄHÄRI, 2005; VICENTE *et al.*, 2005).

A atividade das MMPs ocorre, geralmente, em condições fisiológicas tais como remodelação óssea, reparo de feridas, embriogênese e involução pós-parto. Contudo, diversos estudos têm relatado a alta expressão de MMPs em enfermidades como artrite reumatóide, osteoartrites, periodontites e principalmente, tumores (WESTERMARCK & KÄHÄRI, 1999; CURRAN & MURRAY, 2000; KIVELÄ-RAJAMÄKI *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2005).

As MMPs, em geral, são constituídas por domínios bem conservados: um peptídeo sinalizador, um pró-peptídeo, cuja clivagem proteolítica é necessária para a ativação enzimática, um domínio catalítico, com um sítio de ligação para o zinco, e um domínio C-terminal de hemopexina, homóloga na interação com outras MMPs e inibidores de MMPs (TIMPs) (THOMAS *et al.*, 1999; WESTERMARCK & KÄHÄRI, 1999; RUNDHAUG, 2003).

Baseados em critérios funcionais e estruturais distintos, as MMPs podem ser secretadas (MMPs 1-13 e 18-20) ou ancoradas na membrana celular (MMPs 14-17), ou ainda subdivididas em colagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinas e metaloelastase de acordo com seu substrato de preferência (SOUZA & LINE, 2002).

### **1.2.1 Colagenases**

As colagenases são compostas por três membros: MMP-1 (colagenase 1), MMP-8 (colagenase 2) e MMP-13 (colagenase 3). Estas enzimas são capazes de degradar principalmente colágeno tipo I, II, III e VII. Os produtos resultantes da clivagem destes substratos são rapidamente desnaturados na temperatura corpórea, transformando-se em gelatina, que logo depois é degradada pelas gelatinases (MMP-2 e -9) (ALA-AHO & KÄHÄRI, 2005).

### **1.2.2 Gelatinases (MMP-2 e MMP-9)**

As gelatinases são assim denominadas pela sua preferência em degradar colágeno desnaturado (gelatina). Estas incluem a MMP-2 (gelatinase A) e a MMP-9 (gelatinase B). Assim como as outras MMPs, estas também são capazes de degradar os colágenos tipo I, IV V e X. A MMP-2 é ainda capaz de degradar laminina-5 (CAVDAR *et al.*, 2009) e é expressa particularmente em células estromais, enquanto que a MMP-9 tem a expressão mais restrita aos tecidos normais ou quiescentes. No entanto, a expressão de MMP-9 é induzida sob condições que requerem remodelação tecidual (POLETTE *et al.*, 2004).

### **1.2.3 Estromelisinias**

As estromelisinias são constituídas pelos membros MMP-3 (estromelisina 1), MMP-10 (estromelisina 2) e MMP-11 (estromelisina 3).

MMP-3 e -10 são expressas predominantemente em células epiteliais normais, mas também são encontradas em carcinomas e podem degradar uma gama de substratos incluindo colágeno tipo IV, V, IX e X, fibronectinas, lamininas, elastinas, gelatinas e proteoglicanas. MMP-11, expressa por células mesenquimais, principalmente fibroblastos, clivam essencialmente inibidores de protease, mas aparece em menor potência para degradar componentes da MEC (STAMENKOVICK, 2000).

### **1.2.4 Matrilisinias**

As matrilisinias (MMP-7 e MMP-26) são os menores membros constituintes da família das MMPs, porém, é amplo o número de substratos capazes de serem degradados por estas enzimas (YAMAMOTO *et al.*, 2004). MMP-7 pode ser expressa em células epiteliais, fibroblastos e macrófagos durante condições patológicas como a progressão tumoral (WILSON & MATRISIAN,



1996), enquanto que MMP-26 pode ser encontrada tanto em tecidos adultos normais como em neoplasias (PILKA *et al.*, 2004; YAMAMOTO *et al.*, 2004; AHOKAS *et al.*, 2005).

### **1.2.5 Metaloelastase**

MMP-12 (metaloelastase). MMP-12 é expressa em macrófagos e em células estromais. Esta degrada principalmente elastina, mas também exerce alguma atividade sobre fibronectina, laminina, vitronectina e colágeno tipo IV (STAMENKOVICK, 2000).

### **1.2.6 MMPs ancoradas à membrana**

As MT-MMPs são MMPs fixas à membrana celular. Os quatro membros da família são conhecidos como MMP-14 (MT1-MMP), MMP-15 (MT2-MMP), MMP-16 (MT3-MMP) e MMP-17 (MT4-MMP). MMP-14 é o membro mais conhecido da família, pois promove a clivagem de laminina-5 e a ativação de pró-MMP-2 (NAGASE, 1997; STAMENKOVICK, 2000).

## **1.3 MMPs no timo**

Apesar das MMPs já serem bem conhecidas como enzimas de degradação presentes na maioria dos órgãos em condições patológicas e fisiológicas, pouco foi estudado com relação às MMPs no timo.

Acerca deste assunto é sabido que estão presentes no timo alguns membros da família das MMPs como ADAM-28 (HAIDL *et al.*, 2006), MMP-2 (SOGAWA *et al.*, 2003), MMP-9 (ODAKA *et al.*, 2004), MMP-14 (VIVINUS-NEBOT *et al.*, 2004) e MMP19 (BECK *et al.*, 2008). Estas enzimas estão diretamente relacionadas com a maturação dos linfócitos T no timo, uma vez que liberam fatores que provem a diferenciação celular através da degradação da matriz extracelular (SAVINO *et al.*, 2004).

Além de componentes da matriz extracelular como fibras colágenas, estudos têm mostrado de forma interessante que MMPs também clivam citocinas presentes no timo e que auxiliam na diferenciação dos timócitos. Estes trabalhos mostram que MMP-9 é capaz de clivar CXCL12, CXCL8 (McQUIBBAN *et al.*, 2000; SANZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2001; OVERALL *et al.*, 2002), MMP-2 cliva CXCL12 e MMP-8 cliva CXCL8 (VAN DEN STEEN *et al.*, 2003).

#### **1.4 Regulação da atividade das MMPs**

Como já visto, as MMPs são enzimas de degradação de matriz extracelular distribuídas por todo o organismo. Por esta razão, eventos que regulam a expressão de tais proteínas têm sido alvo de estudo uma vez que seu efeito desregulado no organismo pode resultar em graves consequências. A regulação das MMPs pode ocorrer de três formas: regulação transcripcional, ativação proteolítica ou inibição da atividade enzimática (STAMENKOVIC, 2000; NABESHIMA *et al.*, 2002; POLETTE *et al.*, 2004).

##### **1.4.1 Regulação transcripcional dos genes das MMPs**

A regulação transcripcional dos genes de MMPs é a forma inicial de regulação, pois impede que os genes de MMPs sejam expressos, formando as proteínas. Tanto em condições normais quanto em condições adversas ao organismo, os genes das MMPs são expressos quando há remodelação tecidual e suprimidos quando a remodelação não é requerida. Para tanto, fatores como citocinas, hormônios, fatores de crescimento ou mesmo fragmentos resultantes da clivagem da matriz, estão envolvidos na regulação transcripcional dos genes de MMPs (THOMAS *et al.*, 1999; NABESHIMA *et al.*, 2002).

Muitos componentes são conhecidos por inibir a síntese de MMPs, incluindo retinóides, hormônios da tireóide, glicocorticóides, progesterona e andrógenos. Todos esses agentes ligam-se aos membros da subfamília de receptores nucleares. Estes controlam a expressão de genes por diferentes mecanismos (NABESHIMA *et al.*, 2002).

### **1.4.2 Ativação proteolítica da pró-enzima**

Quando liberadas para o espaço extracelular, as MMPs não se encontram ativas. Elas são secretadas como precursores latentes denominados zimogênios. A latência das MMPs é mantida através da interação entre o grupo sulfídrico de um resíduo conservado de cisteína e o domínio de zinco da MMPs.

Para que as MMPs latentes possam ser ativadas no espaço extracelular, é necessário que haja uma clivagem no pró-domínio n-terminal. Desta forma, elas passam de uma forma latente para uma forma ativa, a qual podem degradar os componentes da MEC. Esta clivagem é usualmente realizada por serino proteinases, como a plasmina e tripsina e, ocasionalmente, por outras MMPs. Portanto, a regulação da atividade das MMPs neste nível ocorre pela falta destes elementos de clivagem ou mesmo por restrições no domínio de clivagem (CURRAN & MURRAY, 2000; VICENTE *et al.*, 2005).

### **1.4.3 Inibição da atividade enzimática**

Por fim, se os genes das MMPs forem expressos e a ativação enzimática ocorrer, ainda assim, as MMPs podem ser impedidas de realizar a clivagem de seus substratos. Isso pode ocorrer devido à inibição da atividade enzimática.

Uma vez ativas, as MMPs podem ser controladas por inibidores de MMPs TIMPs, do inglês, tissue inhibitor of metalloproteinases. TIMPs são pequenas proteínas de 21 a 28 kDa que bloqueiam a atividade das MMPs ligando-se ao sítio de zinco das MMPs. Os TIMPs são capazes de bloquear especificamente as formas ativas das MMPs. Quatro membros da família de inibidores de MMPs são conhecidos: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4. Todos eles possuem doze resíduos de cisteína conservados, utilizados na formação de seis pontes dissulfeto. O domínio utilizado na atividade inibitória das MMPs é o amino-terminal (VAALAMO *et al.*, 1999).

Os TIMPs são produzidos por uma variedade de tipos celulares, incluindo queratinócitos, fibroblastos, osteoblastos e células endoteliais. A expressão de TIMP-1 é super-regulada através de muitas citocinas e fatores de crescimento, incluindo o fator de transformação e crescimento beta (TGF- $\beta$ ), o e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1), IL-6 e retinóides (ODAKA *et al.*, 2004).

A expressão de TIMP-4 é restrita, sendo mais alta em coração humano e menor em outros órgãos incluindo a placenta, cólon e rins. TIMPs 1, 2 e 4 são secretados na forma solúvel enquanto que TIMP-3 é seqüestrado na matriz pericelular. São os inibores do TIMP-1 e TIMP-2 que inibem a atividade da maioria das MMPs (RAHKONEN *et al.*, 2002).

A inibição das MMPs pelos TIMPs se dá pela formação de complexos enzima-inibidor. A extensão da degradação da MEC pelas MMPs, tanto em condições fisiológicas quanto em efeitos patológicos, é determinada pelo balanço entre MMPs e TIMPs (RAUVALA *et al.*, 2005).

No timo, é relatada a presença de TIMP-1 (HAIDL *et al.*, 2006) e TIMP-2 (WANG *et al.*, 2007), estando este último profundamente envolvido na inibição de MMP2 e MMP-9 no parênquima tímico.

### **1.5 Atrofia tímica e modelos experimentais**

Fisiologicamente, o timo sofre atrofia dependente da idade. A atrofia é resultado de alterações hormonais que ocorrem a partir da puberdade e que causam no timo diversas mudanças tais como diminuição de tamanho, alterações na arquitetura tímica e perda da delimitação cortico-medular. Essas mudanças têm como consequência a morte de células tímicas, diminuindo, desta forma o peso relativo do timo e o número de células T *naïve* na periferia. Apesar disso, a literatura tem mostrado que o timo atrófico não é comprometido no que concerne a sua função. Sendo, portanto funcionalmente capaz de

realizar o desenvolvimento de timócitos até a fase senil do indivíduo (SHIRAIISHI *et al.*, 2003; HAYNES *et al.*, 2000).

Como consequência da involução tímica dependente da idade, estudos a partir de timos humanos são pouco possíveis, podendo raramente ocorrer em casos de óbitos infantis. Neste caso, o estabelecimento de modelos experimentais se torna de extrema importância para a progressão do conhecimento científico acerca deste assunto (GRUVER *et al.*, 2008).

Por ser um órgão alvo durante infecções, o timo sofre atrofia causada por diversos patógenos como vírus, fungos, protozoários e helmintos. Estes patógenos são capazes de invadi-lo causando profundas alterações estruturais, que podem ser verificadas tanto em humanos quanto nos modelos experimentais (SAVINO *et al.*, 2004).

Desde 1999, nosso laboratório vem estudando o timo e evidenciando, através de modelos murinos, a atrofia tímica induzida por *Paracoccidioides brasiliensis*, vírus da hepatite murina (HMV) e diabetes experimental induzida por aloxana (VERINAUD, *et al.*, 1998; BRITO, *et al.* 2003; SOUTO, *et al.* 2003; NAGIB, *et al.*, 2010). Nestes estudos, a involução tímica e a perda da celularidade foram evidenciadas. A partir de 2007, foram iniciados estudos para estabelecer modelos de atrofia tímica utilizando o protozoário *Plasmodium berghei* NK65 (ANDRADE *et al.*, 2008).

Protozoários do gênero *Plasmodium* são os agentes etiológicos da malária e são transmitidos através da picada de um mosquito do gênero *Anopheles*. O protozoário cai na corrente sanguínea e passa seu primeiro estágio no fígado. Lá, se multiplica e extravasa os hepatócitos para dar início ao seu ciclo eritrocítico, causador da patologia observada durante esta infecção. Apesar de ser uma doença pandêmica, os continentes tropicais são os mais afetados e o grau de risco varia entre os países, ou mesmo até entre diferentes áreas do mesmo país (MILLER *et al.*, 1994).

Embora existam muitos estudos sobre resposta imune à malária, a complexidade do ciclo do parasita é um dos fatores que dificulta a obtenção de conhecimento sobre os mecanismos responsáveis

pela imunidade protetora dos indivíduos (TSUJI & ZAVALA, 2003, OVERSTREET *et al.*, 2008; CHAKRAVARTY *et al.*, 2008).

A resposta imune contra a malária envolve elementos tanto da imunidade inata quanto da imunidade adquirida. A literatura é vasta em apontar o papel de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e da citotoxicidade dos linfócitos TCD8<sup>+</sup> na imunidade contra malária. As células TCD8<sup>+</sup> inibem o desenvolvimento dos estágios iniciais no fígado, impedindo o extravasamento do parasita para alcançar o ciclo eritrocítico no sangue. As células TCD4<sup>+</sup> exercem tripla função protetora contra a doença: (i) auxiliam os linfócitos B na produção de anticorpos contra o parasita, (ii) auxiliam as respostas citotóxicas das células TCD8<sup>+</sup> por meio das citocinas, e (iii) inibem o desenvolvimento de parasitas no fígado. Como os linfócitos T representam um importante elemento na imunidade contra a malária, é possível que as alterações observadas na arquitetura e no microambiente tímico acarretem distúrbios na maturação e diferenciação de timócitos, com implicações na resposta imune sistêmica ao *Plasmodium spp* (revisto por SCHOFIELD & GRAU, 2005).

Estudos recentes do nosso grupo mostraram que a atrofia tímica induzida por *P. berghei* leva a numerosas alterações no ambiente tímico como: alterações no padrão de expressão de elementos de matriz (fribronectina e laminina) e seus receptores; alterações na expressão de quimiocinas e seus receptores (aumento da expressão de CXCL-12 e CXCR-4 e a diminuição da expressão de CCL-25 e CCR-9). Além disso, observamos que tais alterações, conjuntamente, podem levar ao aumento da migração de timócitos (GAMEIRO *et al.*, 2009).

No entanto, nenhum estudo acerca da atuação das MMPs bem como a de seus inibidores havia sido feito. Tendo em vista a degradação que ocorre no microambiente tímico durante a infecção por *P. berghei*, a necessidade de ampliar estudos relacionados à atrofia tímica e as MMPs, objetivou o nosso estudo.

## 2. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo principal analisar a expressão gênica e a atividade das MMPs MMP-2 e MMP-9, bem como de seus inibidores TIMP-1 e TIMP-2 durante a atrofia tímica induzida por *P. berghei* NK65.

Para tanto, as seguintes metas foram seguidas:

- Análise da atrofia tímica durante o curso da infecção e da relação entre a massa corpórea do animal e a massa tímica;
- Análise da expressão gênica das moléculas MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2;
- Análise da atividade enzimática das MMP-2 e MMP-9;
- Análise da localização tecidual e quantificação das moléculas MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Neste estudo foram utilizados camundongos machos da linhagem Balb/c, com 8 semanas de idade, obtidos do CEMIB-UNICAMP a partir de colônias livres de patógenos específicos (SPF). Os animais foram mantidos durante todo o tempo 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 pela 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 nº 1789-1.

#### **3.2 Preparo do inóculo**

Para o preparo do inóculo foi utilizado o isolado virulento de *P. 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 repique 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 1ml de PBS, e em seguida centrifugado por 5 minutos a 380xg. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* ressuspense 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  $5 \times 10^6$  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 histopatológica estabelecida por Romanowsky através do kit comercial para coloração hematológica “Panótico Rápido” (Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil) e a porcentagem de hemácias infectadas calculada ( $\text{Parasitemia} = \text{hemácias infectadas} / \text{hemácias totais} \times 100$ ).

### **3.4 Índice tímico**

Animais controle e infectados foram anestesiados com xilazina/quetamina (100 mg/kg de cloridrato de quetamina e 5 mg/kg de cloridrato de xilazina), e então pesados. Em seguida, os timos foram assepticamente retirados, limpos e pesados. O índice tímico foi calculado pela fórmula : $\text{peso do órgão(g)} / \text{peso do animal (g)} \times 100$ .

### **3.5 Análise histopatológica do timo**

O timo de animais controle e infectados de todos os grupos experimentais foram coletados e fixados em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M. Após 12 h de fixação o órgão foi desidratado em gradiente crescente etanol (70, 80, 85, 90, 95 e 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 através da coloração de hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram montadas e analisadas em microscópio de luz (Olympus, BX50).

### 3.6 Expressão dos genes de MMPs e seus inibidores

A expressão de genes das MMPs MMP-2 e MMP-9, e de seus inibidores, TIMP-1 e TIMP-2 foi avaliada através de 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*<sup>TM</sup> (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e realizadas no aparelho *ABI Prism 7300* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Diferentes oligonucleotídeos e sondas foram utilizados para amplificação do controle endógeno 18S e dos alvos: MMP-2(Applied: [Mm01253624](#))\_m1 mmp2, MMP-9Mm00600164\_g1 mmp9, TIMP-1Mm01341361\_m1 TIMP-1 e TIMP-2Mm00441825\_m1 TIMP-2 todas conjugadas com TaqMan-MGB. A expressão gênica destes genes nos grupos controle e infectado foi representada como o número relativo de cópias através do método do ciclo delta *threshold* ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ).

### 3.7 Análise da atividade enzimática das MMPs

Os timos de animais controle e infectados foram triturados em uma solução de 50 mM de Tris-HCL, pH 7,4, 0,2 M de NaCl, 0,1% de Triton, 10 mM de CaCl<sub>2</sub> e um coquetel inibidor de protease 1% (Sigma) para a extracção da proteína. A proteína total foi quantificada de acordo com o método de Bradford ([Bradford, 1976](#)) utilizando albumina de soro bovino (Sigma) como padrão. Os ensaios de zimografia foram realizados em géis de poliacrilamida a 7,5% contendo 0,1% de gelatina e usando 20 mg de proteína por amostra. Após a electroforese, os géis foram lavados com 2,5% de Triton X-100 à temperatura ambiente e incubadas durante a noite numa solução de 50 mM de Tris-HCl, pH 7,4, NaCl 0,1 M e azida de sódio 0,03% a 37 ° C. Finalmente, os géis foram corados com Coomassie Blue. As bandas de proteínas correspondentes a atividade gelatinolítica foram observadas após a lavagem dos

géis com uma solução contendo metanol a 30% e 10% de ácido acético. O gel foi avaliado por densitometria da banda utilizando o programa Scion Image.

### **3.8 Análise da localização tecidual da matriz e seus inibidores**

Para análise da localização tecidual das MMPs MMP-2 e MMP-9, e seus inibidores TIMP-1 e TIMP-2, os timos dos animais controle e infectados foram assepticamente retirados e processados para inclusão em parafina. Foram obtidos em micrótomo cortes de 5µm. Os cortes foram desparafinizados com xilol, incubados com tris-EDTA por 30 minutos no vapor. Foi feito o bloqueio da peroxidase endógena utilizando uma solução de água e metanol 1:1 e peróxido de hidrogênio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10%. As lâminas foram lavadas por 3 vezes durante 5 minutos em uma solução de TBS 1X. Após a lavagem, os cortes foram incubados com proteinase K 10µg/ml durante 20 minutos e lavados novamente por 3 vezes durante 5 minutos em uma solução de TBS 1X. Os cortes foram incubados por uma hora com o soro bloqueio do kit ABC Staining System – Santa Cruz Biotechnology (SC-2023). Foram adicionados aos cortes, os anticorpos primários anti-MMP-2, anti-MMP-9, anti-TIMP-1 e anti-TIMP-2 e incubados overnight. Após este período, as lâminas foram lavadas por 3 vezes durante 5 minutos em uma solução de TBS 1X e Tween 0,5%. Os cortes foram incubados por uma hora e dez minutos com o anticorpo secundário seguindo as instruções do Kit ABC Staining System – Santa Cruz Biotechnology (SC-2023). Após esta etapa, os cortes foram novamente lavados com TBS – Tween 0,5% como descrito acima. Após a lavagem os cortes foram encubados com Avidina-Biotina do Kit durante 30 minutos. As lâminas foram novamente lavadas com TBS-Tween e a revelação do sistema foi feita com diaminobenzidina (DAB). A análise quantitativa foi realizada por meio IMAGE J programa ® 1,45 como um quantificador.

### **3.9 Análise quantitativa**

Para a análise quantitativa, utilizamos o processador de imagens Image J 1.45 que permite extrair numericamente o contraste de coloração da marcação obtida na técnica de imunistoquímica. A média dos resultados obtidos por grupo foi utilizada na análise estatística.

### **3.10 Análise Estatística**

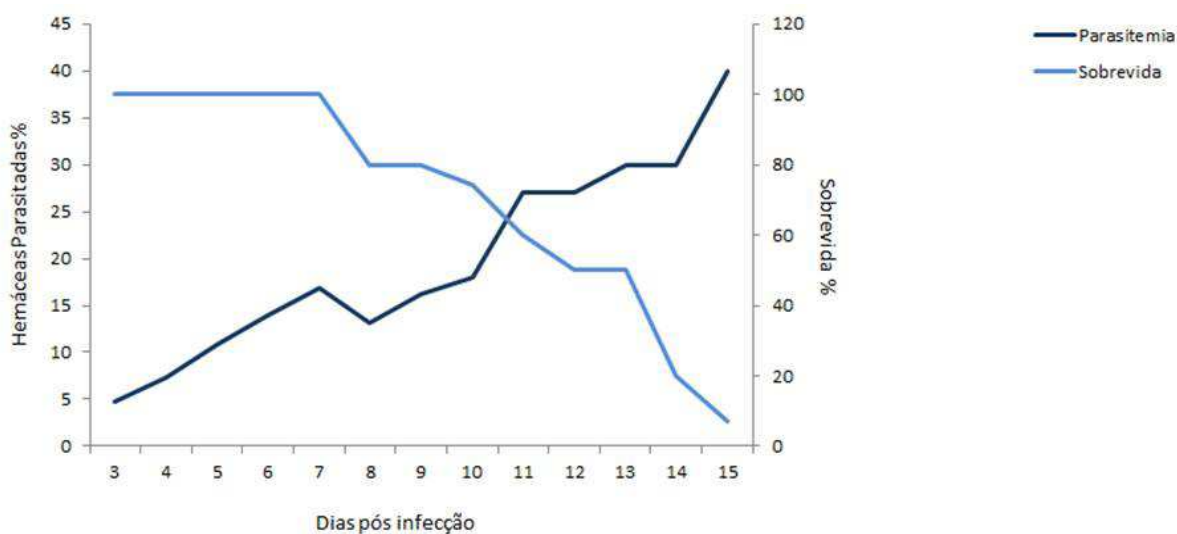
A avaliação estatística dos resultados entre o controlo e os animais infectados foi realizado pelo teste T não emparelhado utilizando o software GraphPad Prism 5,0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Os resultados são apresentados como média SE e valores de p iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

## 4. RESULTADOS

O timo é um órgão alvo a diversas infecções virais, fúngicas e bacterianas. Estudos do nosso grupo demonstraram recentemente que a infecção por *Plasmodium sp*, agente causador da malária também afeta o timo, causando profunda atrofia após 14 dias de infecção. Diante deste dado o estudo cinético da atrofia tímica foi realizado a fim de verificarmos em quais fases no decorrer da doença, ocorriam às mudanças antes constatadas.

### 4.1 Parasitemia

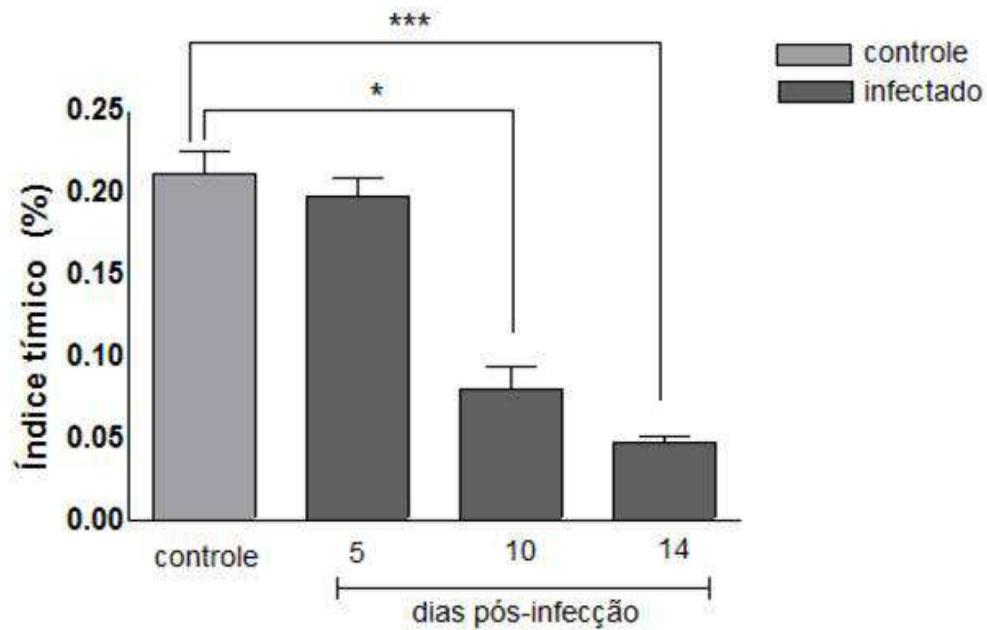
A cepa virulenta de *P.berghei* NK65, caracterizada por ser letal e não induzir a forma cerebral da doença, inoculada em camundongos BALB/c apresenta parasitemia com pico aos 14 dias de infecção e 100% de mortalidade aos 15 dias pós-infecção (pi) (Figura 3).



**Figura3:** Curso da infecção malárica por *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. A curva de sobrevida mostra que no décimo quinto dia de infecção todos os animais infectados morreram em decorrência da infecção. Todos os animais utilizados neste trabalho foram avaliados.

## 4.2 Índice tímico

Todos os animais infectados pelo *Plasmodium berghei* tiveram acentuada redução no peso relativo do timo, com considerável involução a partir do décimo dia, e pico de atrofia no décimo quarto dia (Figura 4).

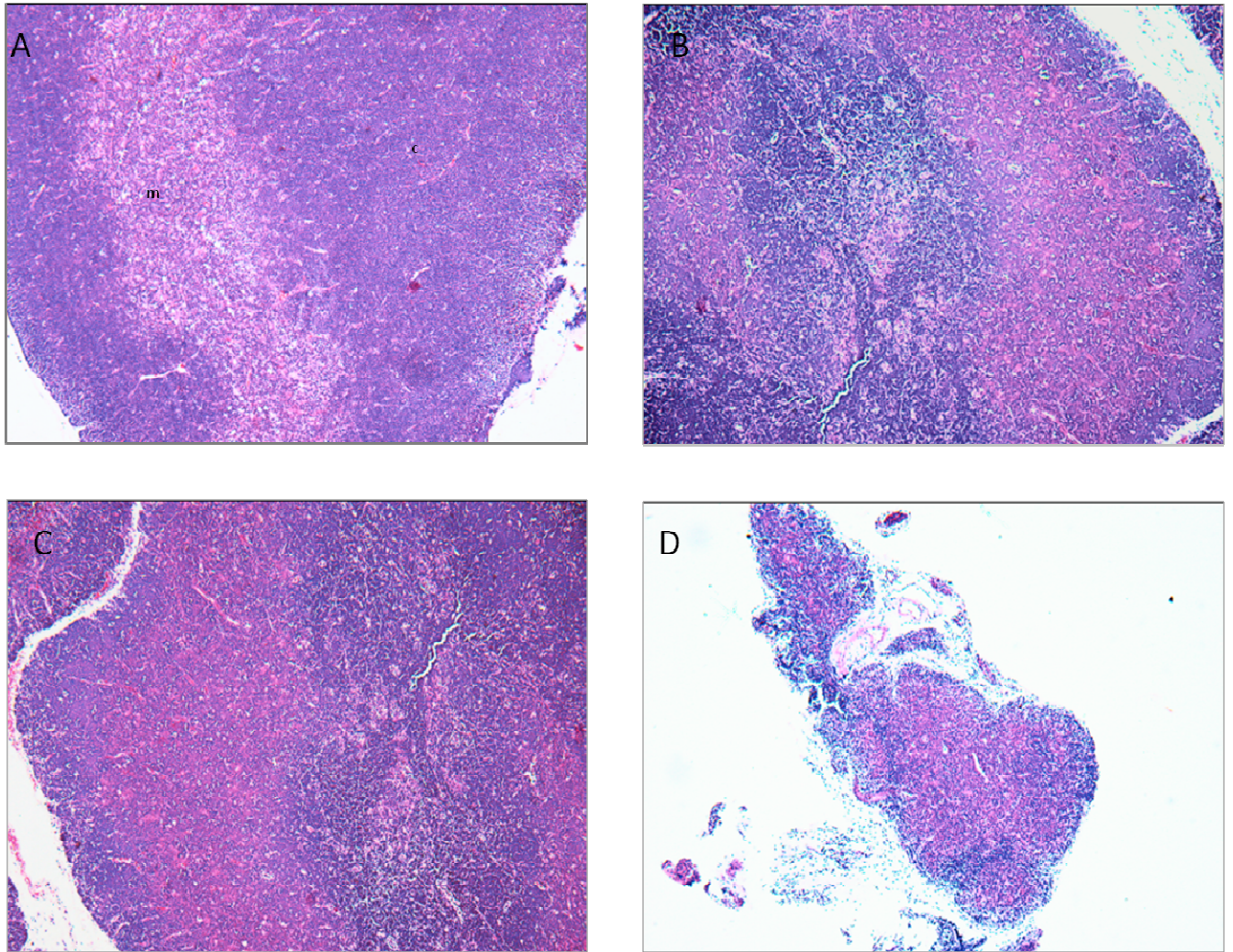


**Figura 4:** Peso relativo do timo de animais BALB/c controle e inoculados com *P.berghei* NK65, e sacrificados após 5, 10 e 14 dias de infecção. Observa-se gradual perda de peso tímico em animais infectados pelo parasita quando comparado ao grupo controle. Maior atrofia tímica observada no décimo quarto dia de infecção. (\*  $p \leq 0,01$  e \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

### **4.3 Análise histopatológica do timo**

Em nosso modelo de infecção é possível observar que, embora ocorra redução do peso relativo do timo até o quinto dia de infecção este fenômeno não altera a estrutura do órgão que se apresenta semelhante ao timo de animais não infectados, mantendo a estrutura das zonas tímicas com lóbulos visíveis e acentuada delimitação das regiões cortical e medular.

A partir do décimo dia de infecção, o timo apresenta-se com uma redução de 50% da sua massa em comparação com os animais não infectados. A análise histopatológica demonstrou que a partir deste período são notáveis as mudanças histológicas que começam a ocorrer no tecido tímico. Apesar de a infecção malárica causar atrofia a partir do quinto dia de infecção, alterações no tecido tímico passam a ser visivelmente caracterizadas no décimo dia pós-infecção, com perda da delimitação córtico-medular. O órgão apresenta-se completamente comprometido no décimo quarto dia após a infecção, com total perda da delimitação córtico-medular e acentuada atrofia tímica (Figura 5).



**Figura 5.** Análise histopatológica do timo de animais BALB/c controle e infectados com *Plasmodium berghei* NK65 corados com HE. (A) Timo de animal controle. (B) Timo de animal com 5 dias de infecção. Notar ausência de alterações histológicas: septos característicos e delimitação entre a porção cortical e medular. (C) Timo de animal com 10 dias de infecção. (D) Timo de animal com 14 dias de infecção. Magnitude 200X

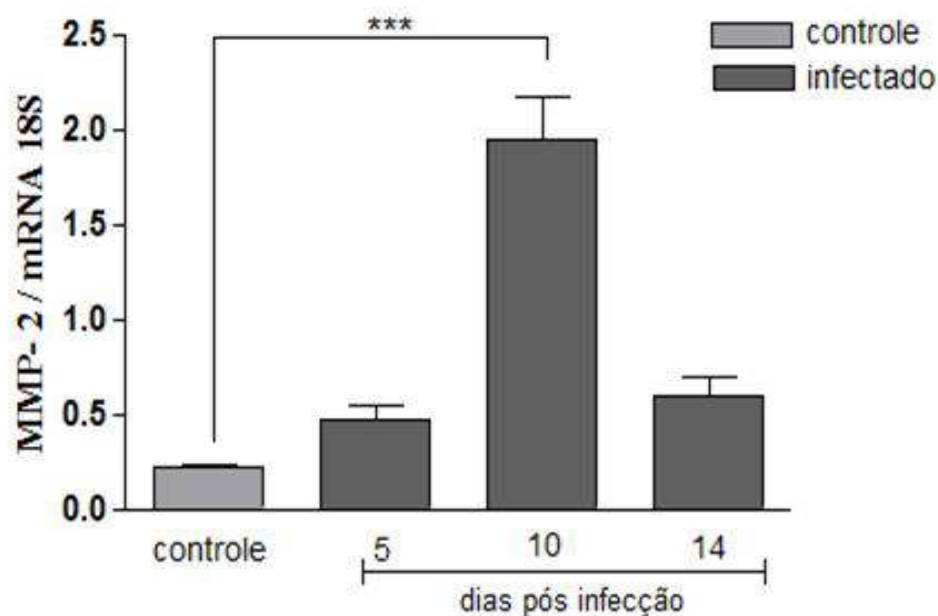


## 4.4 Expressão gênica de MMPs

### 4.4.1 MMP-2

No modelo desenvolvido a partir da infecção de animais BALB/c com o protozoário *P. berghei* NK65 vimos que, em animais não infectados existe a expressão gênica de MMP-2 em quantidade basal. A partir do quinto dia de infecção a expressão de MMP-2 passa a aumentar chegando ao pico de expressão gênica no décimo dia de infecção. A partir do décimo dia de infecção há um decréscimo da expressão gênica de MMP-2. No décimo quarto dia de infecção a expressão gênica de MMP-2 se aproxima da expressão gênica encontrada no quinto dia de infecção (Figura 6).

Nota-se que o pico da expressão gênica de MMP-2, que se dá no décimo dia de infecção, coincide com o início do desarranjo histológico com perda de delimitação córtico-medular visto na análise histopatológica do timo. Também com o início da diminuição significativa do peso relativo do timo, como mostrado no índice tímico.



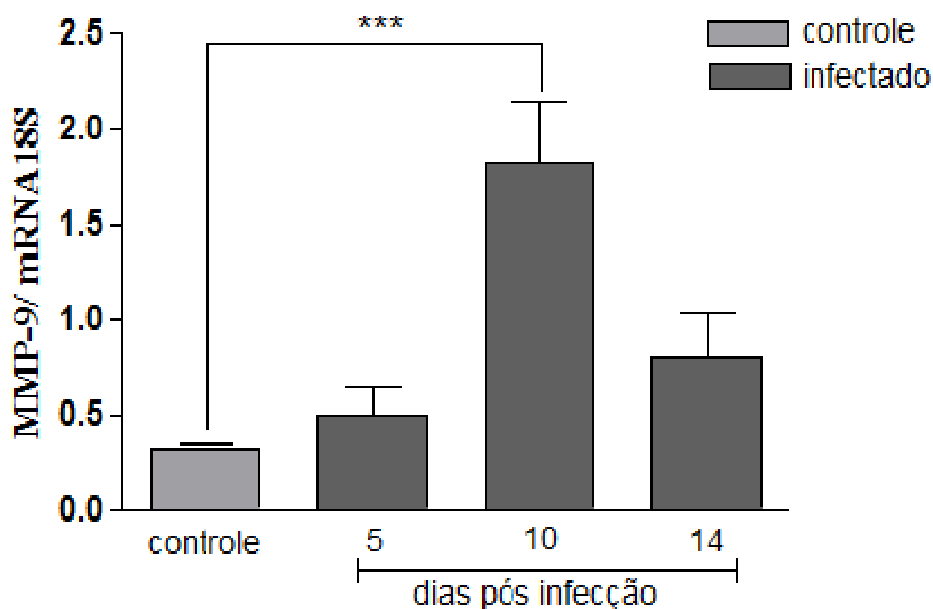
**Figura 6.** Análise da expressão gênica de MMP-2 em timos de animais BALB/c controle e infectados com *P. berghei* NK65 por meio de PCR em tempo real. O gráfico mostra que em timos de animais controle existe uma pequena expressão gênica de MMP-2 que aumenta com o decorrer da doença e com o aumento do comprometimento tímico até o décimo dia de infecção. Observa-se, no décimo quarto dia de infecção, queda da expressão gênica de MMP-2 que se aproxima da expressão gênica verificada no quinto de infecção. Pode-se notar que a expressão gênica de MMP-2, mesmo diminuída, não se iguala novamente àquela verificada nos animais BALB/c não infectados. Resultados expressos em média  $\pm$  SE de quatro animais (\*\*\*)  $p \leq 0.0001$ ).

#### 4.4.2 MMP-9

Os resultados deste experimento mostram um quadro semelhante à expressão gênica de MMP-2. No quinto dia de infecção a expressão de MMP-9 passa a aumentar chegando ao pico de expressão gênica no décimo dia de infecção. A partir do décimo dia de infecção há um decréscimo da expressão

gênica de MMP-9. No décimo quarto dia de infecção a expressão gênica de MMP- 9 se aproxima da expressão gênica encontrada no quinto dia de infecção (Figura 7).

Assim como visto na expressão gênica de MMP-2, podemos notar que o pico da expressão gênica de MMP-9, que se dá no décimo dia de infecção, coincide com o início do desarranjo histológico com perda de delimitação córtico-medular visto na análise histopatológica do timo.



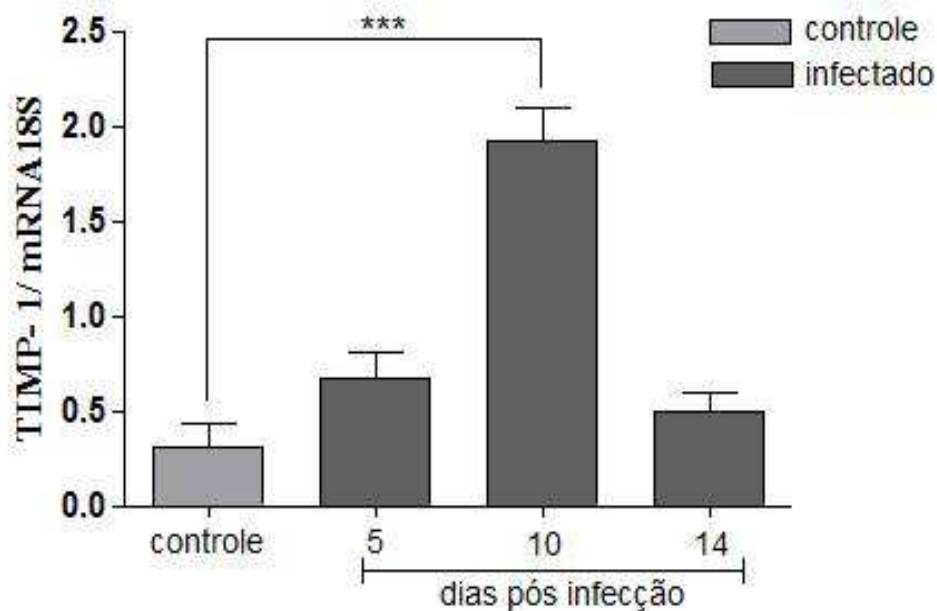
**Figura 7.** Análise da expressão gênica de MMP-9 em timos de animais BALB/c controle e infectados com *Plasmodium berghei* NK65 por meio de PCR em tempo real. Animais controle apresentam baixa expressão gênica de MMP-9 que aumenta com o decorrer da doença e com o aumento do comprometimento tímico até o décimo dia de infecção. Assim como MMP-2, a expressão gênica de MMP-9 encontra-se diminuída no décimo quarto dia de infecção. Ainda assim os níveis de expressão não se igualam aos vistos no grupo de animais controle. Resultados expressos em média  $\pm$  SE de quatro animais (\*\*\*  $p \leq 0.0001$ ).

## **4.5 Expressão gênica de Inibidores de MMPs**

### **4.5.1 TIMP-1**

Acerca dos resultados obtidos analisando a expressão gênica de MMPs -2 e -9, o mesmo estudo realizado com os inibidores de MMPs seria de grande valia para a compreensão dos processos que poderiam influenciar a degradação da MEC no timo.

No quinto dia de infecção a expressão de TIMP-1 passa a aumentar chegando ao pico de expressão gênica no décimo dia de infecção. Depois do décimo dia de infecção é observado o decréscimo da expressão gênica de TIMP-1, que, aos 14 dias de infecção, assemelha-se aos níveis de expressão gênica observados no quinto dia de infecção (Figura 8). Notamos que o pico da expressão gênica de TIMP-1, que se dá no décimo dia de infecção, coincide com o início do desarranjo histológico com perda de delimitação córtico-medular visto na análise histopatológica do timo, com o início da diminuição significativa do peso relativo do timo, mostrado no índice tímico.

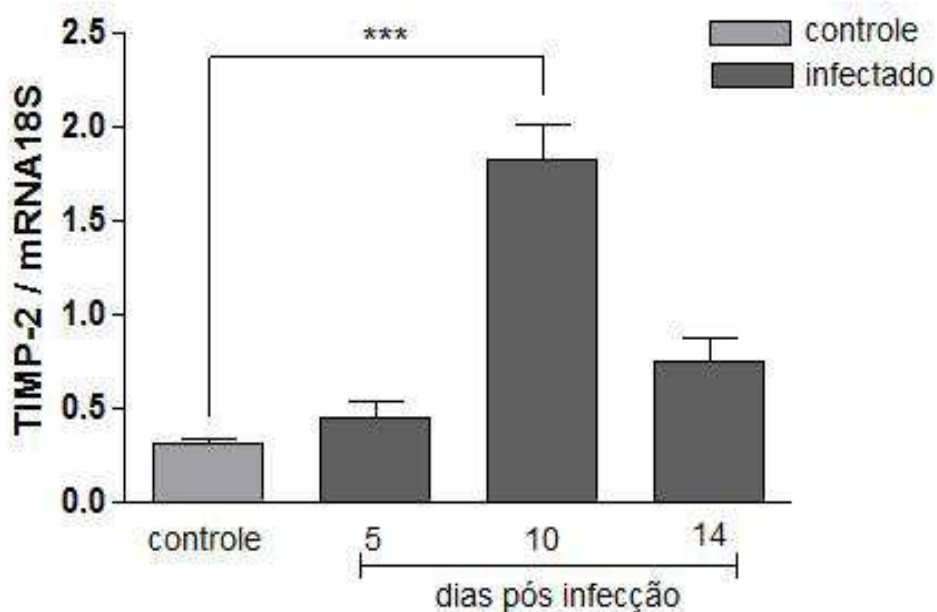


**Figura 8.** Análise da expressão gênica de TIMP-1 em timos de animais BALB/c controle e infectados com *Plasmodium berghei* NK65 por meio de PCR em tempo real. O gráfico mostra que em timos de animais controle existe uma pequena expressão gênica de TIMP-1 que aumenta com o decorrer da doença e com o aumento do comprometimento tímico até o décimo dia de infecção. No período final da doença, no décimo quarto dia pós-infecção, observa-se a diminuição da expressão gênica de TIMP-1. Resultados expressos em média  $\pm$  SE de quatro animais (\*\*\*  $p \leq 0.0001$ ).

#### 4.5.2 TIMP-2

Os resultados deste experimento mostram um quadro semelhante à expressão gênica de TIMP-2. No quinto dia de infecção há um aumento da expressão gênica de TIMP-2 que chega ao ápice no décimo dia de infecção. A partir do décimo dia de infecção há um decréscimo da expressão gênica de TIMP-2. No décimo quarto dia de infecção a diminuição da expressão gênica de TIMP-2 pode ser verificada, aproximando-se daquela encontrada no quinto dia de infecção (Figura 9).

Nota-se um padrão de expressão gênica diretamente proporcional entre as MMPs e os TIMPs analisados. Desta forma, observa-se que o pico da expressão gênica de TIMP-2, que se dá no décimo dia de infecção, coincide com o aumento das outras moléculas analisadas, assim como coincide também seu decréscimo.

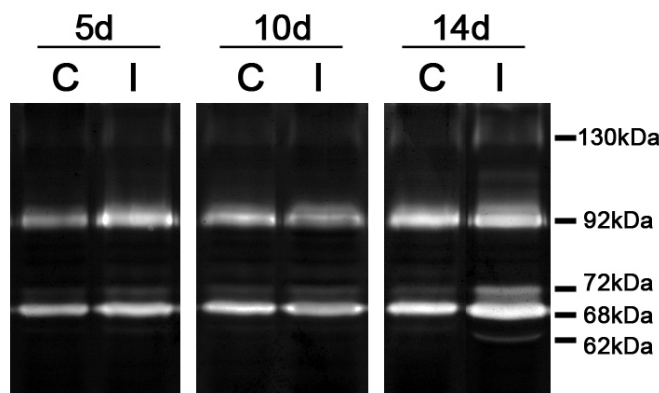


**Figura 9.** Análise da expressão gênica de TIMP-2 em timos de animais BALB/c controle e infectados com *Plasmodium berghei* NK65 por meio de PCR em tempo real. O gráfico mostra que em timos de animais controle a expressão gênica de TIMP-2 é pouco significativa. Porém a expressão aumenta com o decorrer da doença e com o aumento do comprometimento tímico até o décimo dia de infecção. Aos 14 dias pós- infecção, quando o tecido tímico encontra-se totalmente desestruturado, observa-se que a expressão gênica de TIMP-2 decai e alcança níveis semelhantes aos verificados no quinto dia de infecção. Mesmo assim estes níveis são maiores do que os observados nos animais BALB/c não infectados. Resultados expressos em média  $\pm$  SE de quatro animais (\*\*\*)  $p \leq 0.0001$ ).

#### 4.6 Atividade enzimática de MMPs

Através da técnica de zimografia a atividade das MMPs nos grupos de animais infectados e não infectados por *P. berghei* NK65 foi avaliada.

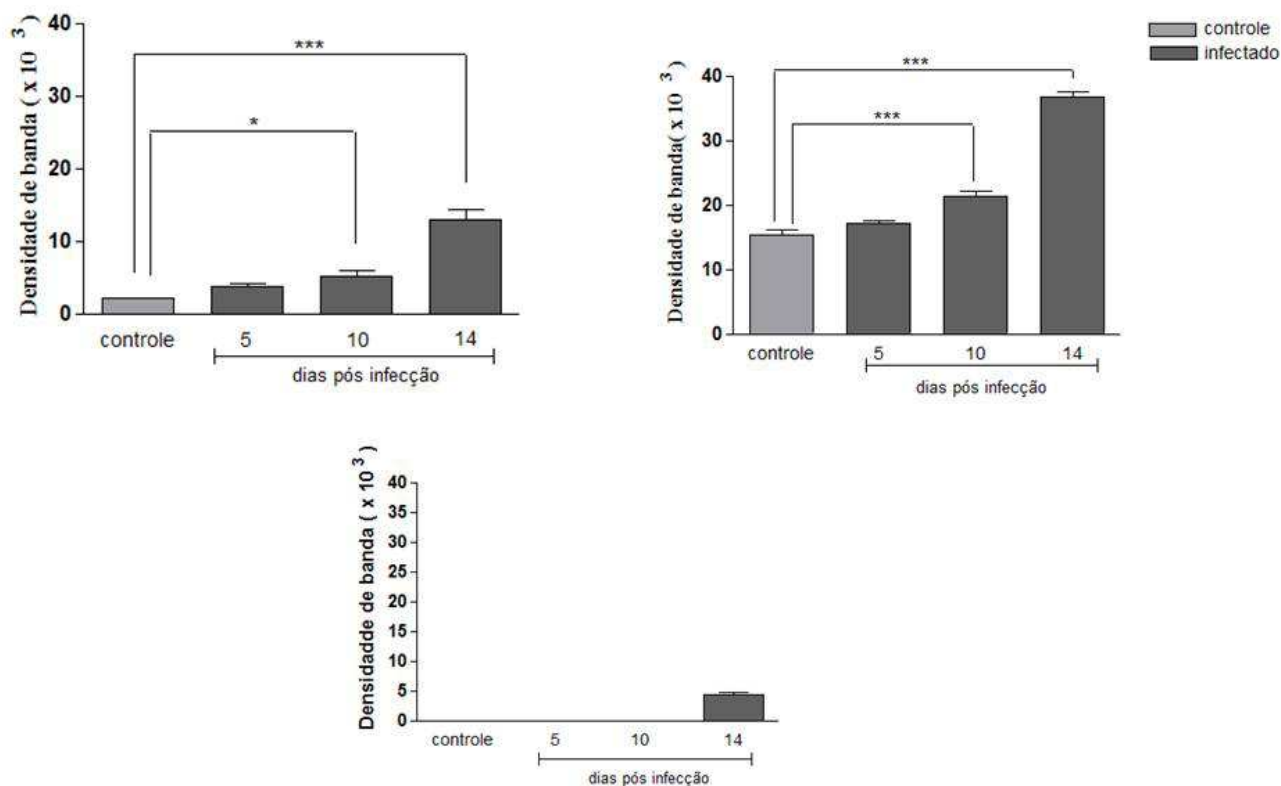
No gel de zimografia podemos identificar um grupo de bandas compreendidas entre 62 kDa e 72 kDa. Estas sugerem serem as bandas representantes de MMP-2 no tecido tímico. A banda de 72 KDa representa o estado latente da enzima, por conter o sítio de zinco e a banda de 68 kDa posiciona-se no estado intermediário, quando começa a ocorrer a quebra de ligação do grupo de zinco. Por fim a banda de 62 KDa apresenta-se com MMP-2 em seu estado ativo, quando perdeu totalmente a ligação com o grupo de zinco, estando, portanto, mais leve (Figura 10). No mesmo gel, a banda de 92kDa sugere ser o estado latente da MMP-9 que pode ser observado nos grupos controle e infectados. Ainda, uma banda de 130 kDa foi verificada, o que sugere ser um complexo de MMPs. (Figura 10).



**Figura 10.** Gel de zimografia com substrato de colágeno para MMPs. Podemos observar um grupo de bandas de 62KDa à 72KDa referentes aos estados ativo, intermediário e latente de MMP-2, respectivamente. As bandas referentes ao estado latente e intermediário apresentam-se nos grupos infectados e não infectados, enquanto que banda de 62 KDa pôde ser verificada apenas no grupo com 14 dias de infecção. Uma banda de 92KDa sugere ser o estado latente de MMP-9 e está presente nos grupos de animais infectados e não infectados pelo *Plasmodium*. Pode-se notar também uma banda de 130KDa que sugere ser um complexo de MMPs. Este complexo foi verificado apenas no décimo quarto dia pós-infecção. C: animal controle e I: animal infectado aos 5, 10 e 14 dias pós infecção.

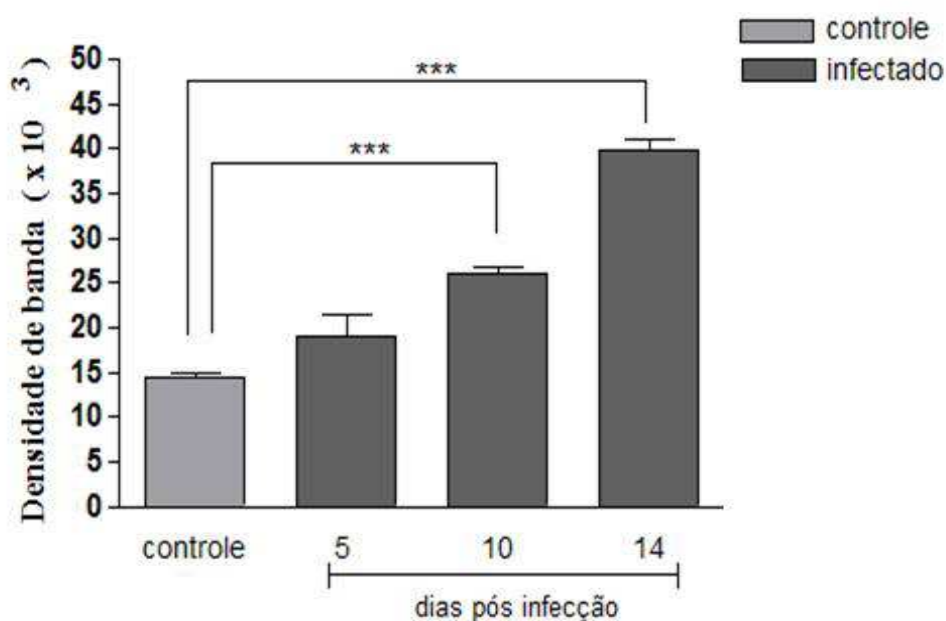
Através da análise quantitativa das bandas obtidas no experimento observam-se três estados de ativação da MMP-2: Um estado latente onde a enzima não possui atividade, um intermediário onde a enzima passa a ter atividade inicial e, por fim, um estado ativo, onde as MMPs estão degradando efetivamente os componentes da MEC. As bandas verificadas nos estados latente e intermediário da MMP-2 puderam ser quantificadas no grupo controle e em todos os grupos pós-infecção, com pico no décimo quarto dia quando comparados ao grupo de animais não infectados. Porém, existe também diferença significativa quando comparado o décimo dia de infecção em relação ao grupo de animais não infectados. O estado ativo da MMP-2 só pôde ser verificado no décimo quarto dia pós-infecção. Interessante notarmos que é neste período que a desorganização do tecido tímico está no maior grau verificado durante a atrofia tímica induzida pelo *Plasmodium* (Figura 11).





**Figura 11.** Análise quantitativa da densidade ótica das bandas referentes à metaloproteinase-2. Em (A), nota-se que o estado latente da enzima é encontrado em animais infectados e não infectados com *Plasmodium berghei* NK65. O grupo controle possui uma quantidade de MMP-2 latente inferior aos outros grupos analisados. O aumento de MMP-2 latente se dá a partir do quinto dia de infecção com um aumento significativo no décimo dia de infecção e o ápice no décimo quarto dia de infecção. Em (B), observa-se que o estado intermediário de ativação de MMP-2 segue um aumento paralelo com o analisado em no estado latente, tendo aumento a partir do quinto dia de infecção, aumento significativo no décimo dia de infecção e pico no décimo quarto dia. Em (C), MMP-2 em seu estado ativo somente no décimo quarto dia pós-infecção. Resultados expressos em média  $\pm$  SE de quatro animais (\* $p \leq 0.01$  e \*\*\*  $p \leq 0.0001$ ).

A análise quantitativa da banda referente à MMP-9 pôde ser observada somente no seu estado latente durante a atrofia tímica induzida por *P berghei* (Figura 12). Nota-se um aumento de MMP-9 ativa no tecido tímico desde o grupo de animais não infectados até o pico de quantidade de MMP-9 no décimo quarto dia de infecção. Verifica-se também a existência de uma diferença significativa do aumento de MMP-9 latente quando comparada com o grupo do décimo dia pós-infecção com o grupo de animais não infectados pelo *Plasmodium* (Figura 12).



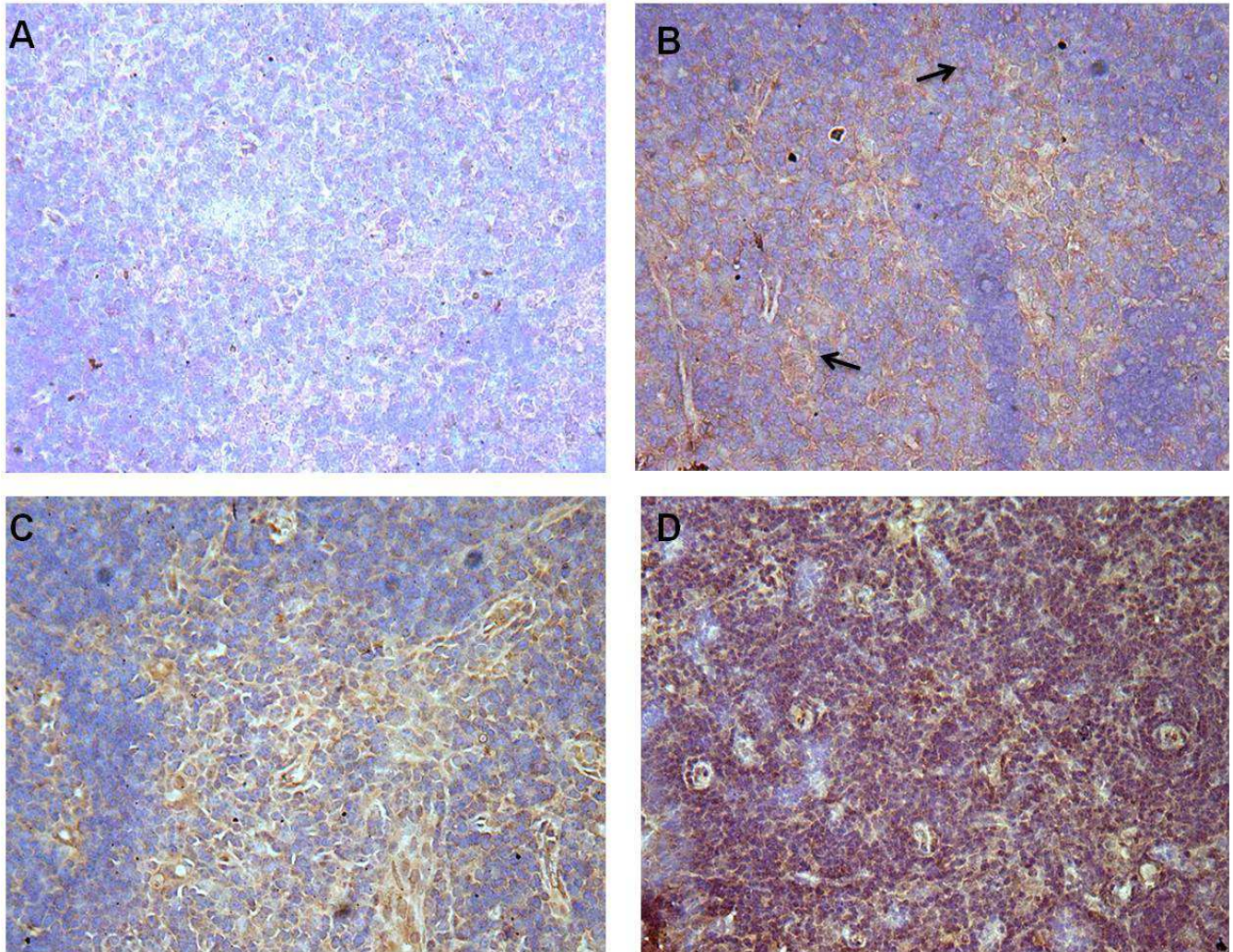
**Figura 12.** Análise quantitativa da densidade ótica da banda referente à metaloproteinase-9 em seu estado latente no tecido tímico. Vemos que o estado ativo da enzima é encontrado em animais infectados e não infectados com *Plasmodium berghei* NK65. O grupo controle possui uma quantidade de MMP-9 latente inferior aos outros grupos analisados. O aumento de MMP-9 latente se dá a partir do quinto dia de infecção com um aumento significativo no décimo dia de infecção e o ápice no décimo quarto dia de infecção. Resultados expressos em média  $\pm$  SE de quatro animais (\*\* $p \leq 0,001$ ).

## **4.7 Localização tecidual de MMPs**

### **4.7.1 MMP-2**

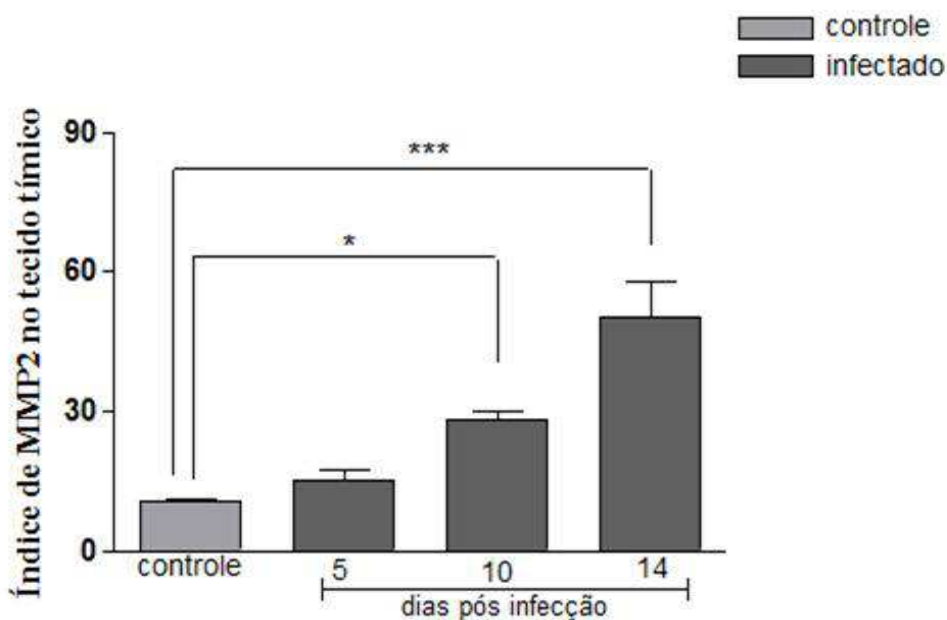
A técnica de imunistoquímica foi utilizada para identificar as regiões do timo onde MMP-2 se localizava.

Diante dos resultados obtidos com esta técnica, pôde-se verificar a presença das moléculas estudadas no tecido tímico de animais infectados e não infectados pelo *Plasmodium*. Observa-se uma quantidade basal de MMP-2 no tecido tímico de animais não infectados. A partir da infecção com *Plasmodium berghei* NK65, a quantidade de MMP-2 aumenta crescentemente até o décimo quarto dia de infecção. Quanto à localização tecidual de MMP-2 nota-se que no início da infecção MMP-2 está mais presente na região medular do órgão e com a progressão da doença adquire distribuição generalizada por todo o tecido tímico (Figura 13).



**Figura 13.** Presença de moléculas de MMP-2 no timo. (A) Animais não infectados. Nota-se que a marcação de moléculas de MMP-2 de maneira basal no timo destes animais. (B) Animais com 5 dias de infecção. Nota-se um pequeno aumento de MMP-2 no timo com relação aos animais não-infectados, e localização próxima às células da região medular (setas.) (C) Animais com 10 dias de infecção. Nota-se o início do espalhamento de MMP-2 pelo tecido. (D) Animais com 14 dias de infecção. Nota-se o aumento significativo da quantidade de MMP-2 no timo, com dispersão abrangente pelo órgão. Magnitude 200x.

A análise quantitativa das lâminas com marcação para MMP-2 no timo mostrou que uma quantidade basal de MMP-2 existe em timo de animais controle. Este número aumenta com o decorrer do período pós-infecção. Um aumento significativo pode ser visto a partir do décimo dia de infecção, porém, o ápice de aumento de MMP-2 no timo se dá aos 14 dias de infecção (Figura 14).



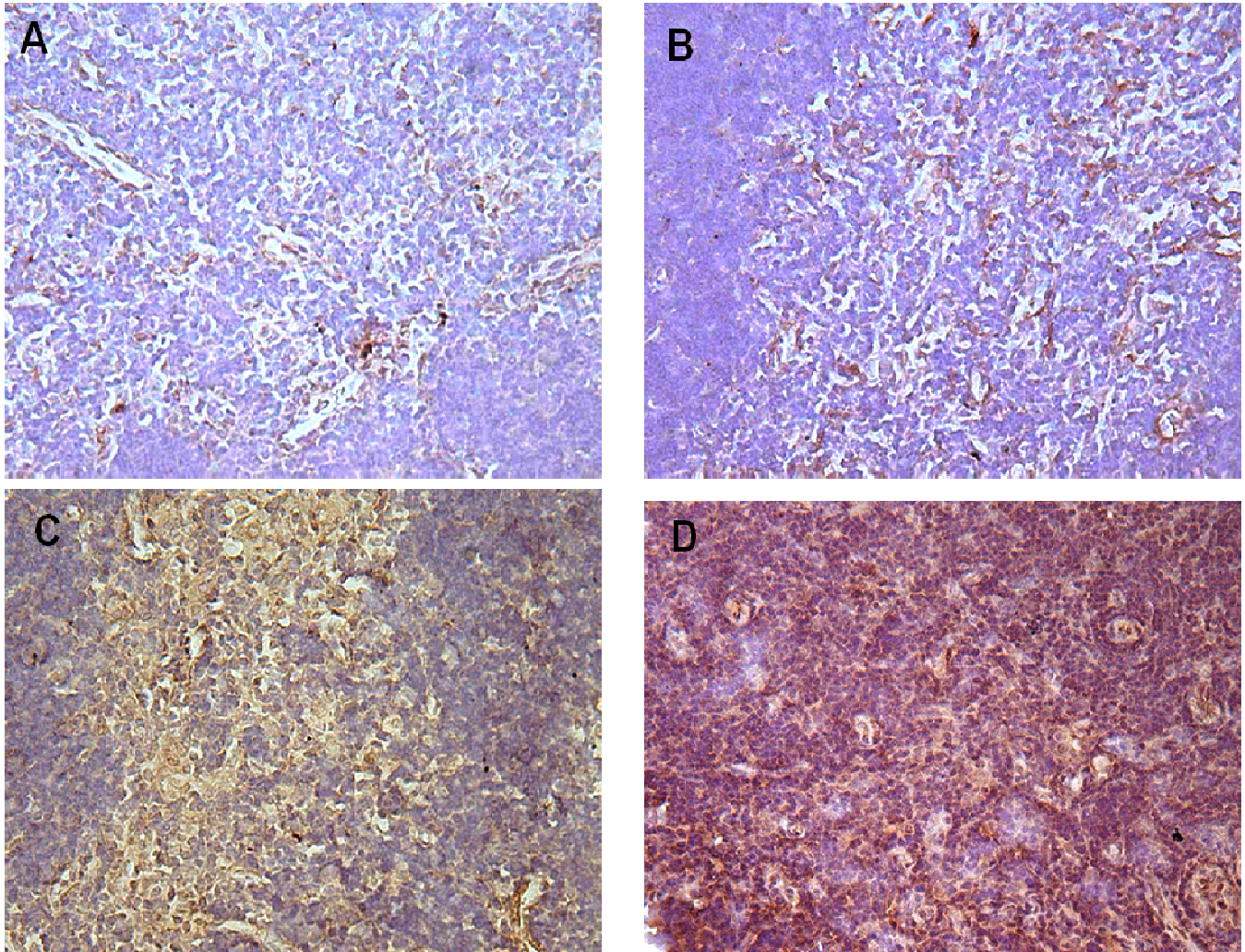
**Figura 14.** Análise quantitativa de MMP-2 no tecido tímico. No gráfico de análise quantitativa, pode-se confirmar numericamente os dados obtidos no corte histológico referente à imunomarcação para MMP-2. No grupo de animais não infectados existe uma quantidade ínfima de MMP-2. A partir da infecção com *P. berghei* esse aumento é notável passando a ser significativo a partir do décimo dia de infecção. O aumento máximo de MMP-2 no timo ocorre aos 14 dias de infecção. Resultados expressos em média ± SE de quatro animais (\*  $p \leq 0,01$  e \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

#### 4.7.2 MMP-9

Com relação à MMP-9, os resultados da imunomarcação assemelham-se àqueles observados para MMP-2. Observa-se uma quantidade basal de MMP-9 no tecido tímico de animais não infectados. A partir da infecção com *P. berghei* NK65, a quantidade de MMP-9 aumentou crescentemente até o décimo quarto dia de infecção. Com relação à distribuição de MMP-9 pelo tecido tímico, nota-se que

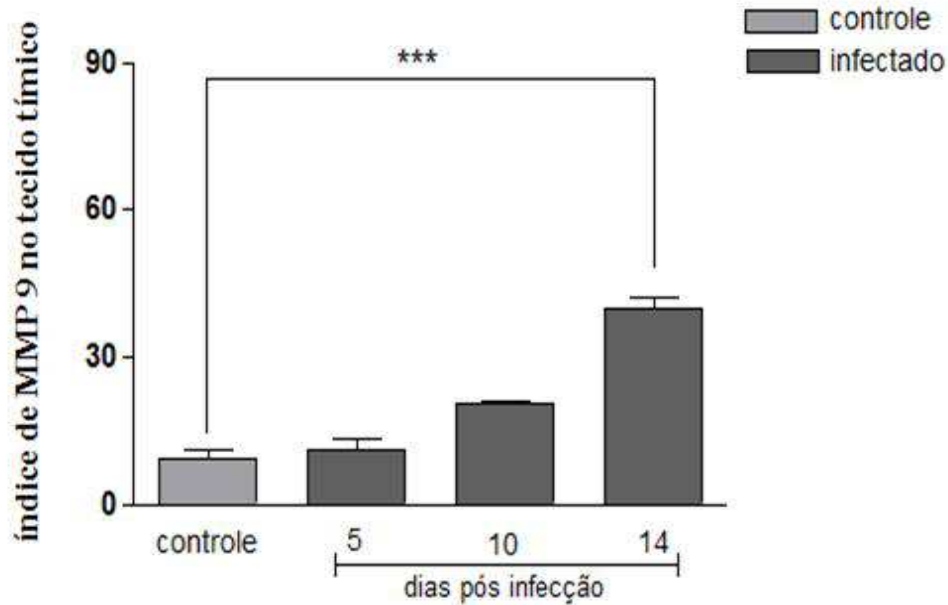


até o décimo dia de infecção estas moléculas se localizam principalmente na região medular. Porém aos 14 dias de infecção, a distribuição de MMP-9 pelo tecido tímico torna-se generalizada (Figura 15).



**Figura 15.** Presença de moléculas de MMP-9 no timo. (A) Animais não infectados. Nota-se que timo de animais não infectados tem uma quantidade basal de MMP-9. (B) Animais com 5 dias de infecção. Nota-se um pequeno aumento de MMP-9 no timo destes animais com relação aos animais não-infectados. (C) Animais com 10 dias de infecção. Nota-se que MMP-9 iniciando o alcance à região medular do órgão. (D) Animais com 14 dias de infecção. Nota-se o aumento significativo da presença de MMP-9 no timo com dispersão abrangente pelo tecido tímico. Magnitude 200x.

Na análise quantitativa observa-se que MMP-9 no timo está presente em uma quantidade basal em animais controle. Este número aumenta com o decorrer do período pós-infecção. Um aumento significativo pode ser visto a partir do décimo dia de infecção, porém, o ápice de aumento de MMP-9 no timo dá aos 14 dias de infecção (Figura 16).



**Figura 16.** Análise quantitativa de MMP-9 no tecido tímico. No gráfico de análise quantitativa, podemos confirmar numericamente os dados visíveis no corte histológico referente à imunomarcação. No grupo de animais não infectados existe uma quantidade ínfima de MMP-9. A partir da infecção com *P. berghei* esse aumento é notável passando a ser significativo a partir do décimo dia de infecção. O aumento máximo de MMP-9 no timo ocorre aos 14 dias de infecção. Resultados expressos em média  $\pm$  SE de quatro animais ( $p^{***} \leq 0,001$ ).

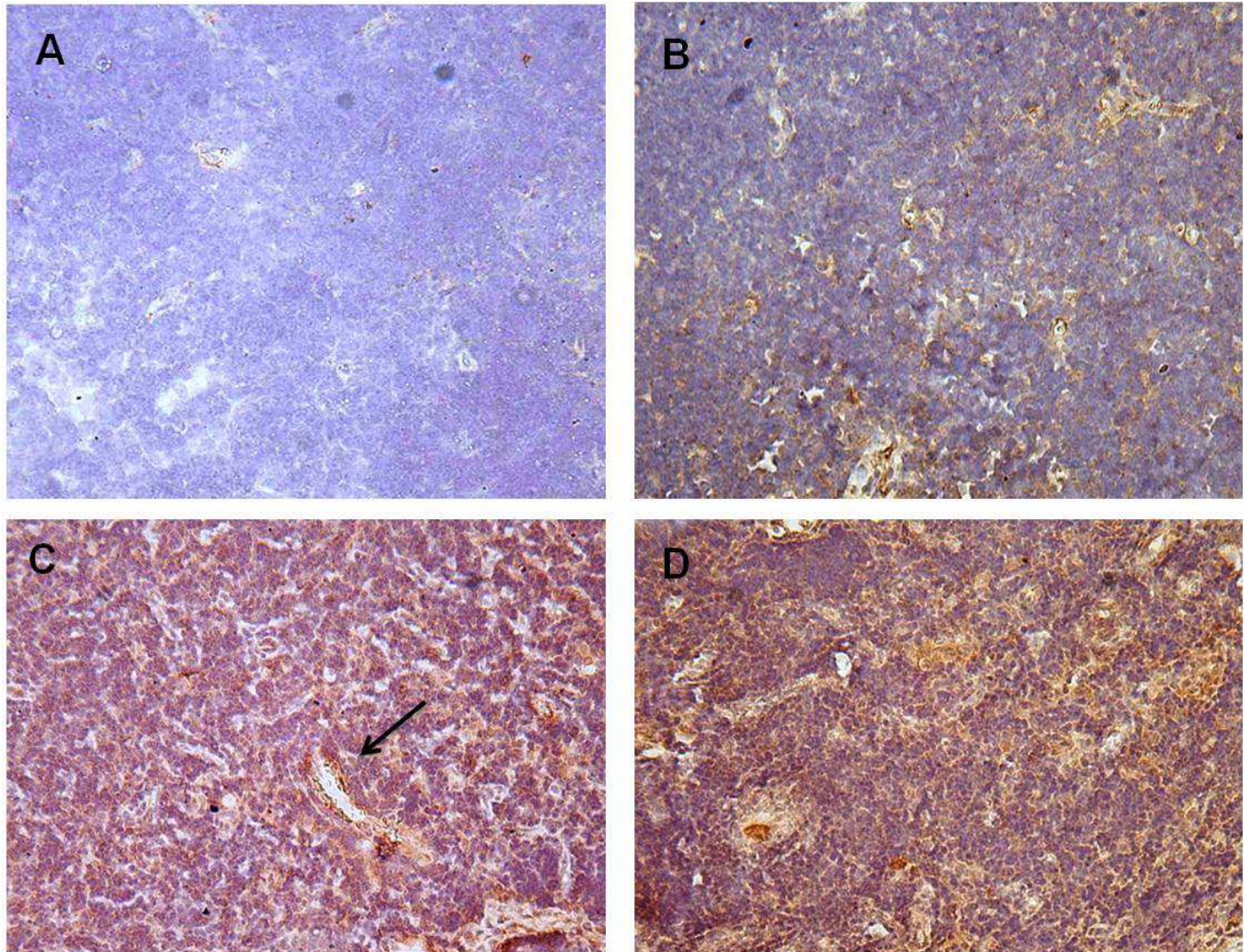
## **4.8 Localização tecidual de inibidores de MMPs**

### **4.8.1 TIMP-1**

Assim como para MMP-2 e MMP-9, técnica de imunistoquímica também foi utilizada para identificar as regiões do timo onde o inibidor de MMPs TIMP-1 se localizava.

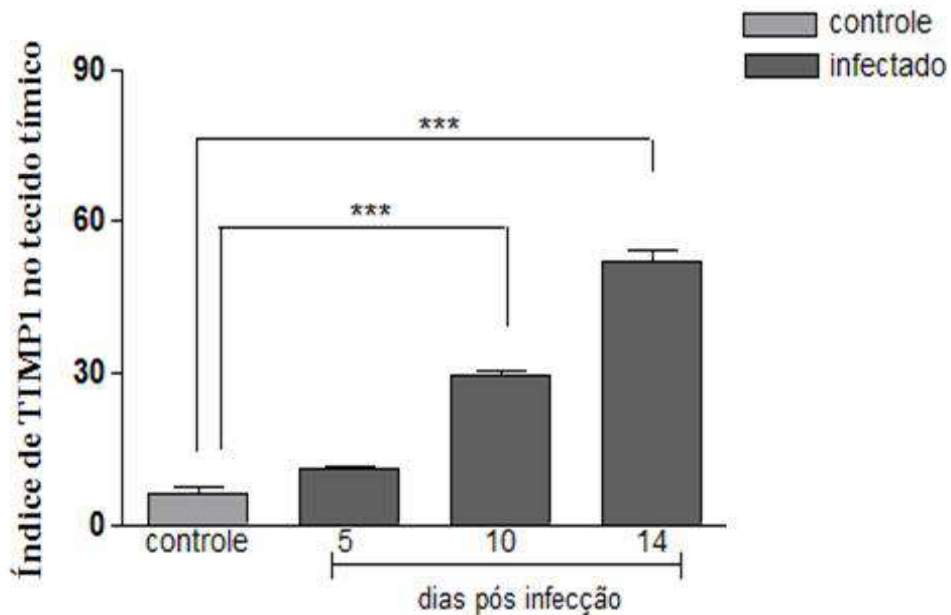
Diante dos resultados, pudemos verificar a presença das moléculas estudadas no tecido tímico de animais infectados e não infectados pelo *Plasmodium*. Observa-se uma quantidade basal de TIMP-1 no tecido tímico de animais não infectados. A partir da infecção com *P. berghei* NK65, a quantidade de TIMP-1 aumentou de forma crescente no timo com proximidade às células endoteliais no início da infecção e espalhando-se totalmente pelo timo até o décimo quarto dia de infecção (Figura 17).





**Figura 17.** Presença de moléculas de TIMP-1 no timo. (A) Animais não infectados. Nota-se que a marcação de moléculas de TIMP-1 não está evidente no timo destes animais. (B) Animais com 5 dias de infecção. Nota-se um pequeno aumento de TIMP-1 no timo destes animais com relação aos animais não-infectados. (C) Animais com 10 dias de infecção. Nota-se que TIMP-1 está próxima a vasos (seta). (D) animais com 14 dias de infecção. Nota-se o aumento significativo da presença de TIMP-1 no timo com dispersão abrangente pelo timo. Magnitude 200x.

A análise quantitativa das lâminas com marcação para TIMP-1 no timo mostrou que em animais controle, uma quantidade basal de TIMP-1 é encontrada. Este número aumenta com o decorrer do período pós-infecção. Um aumento significativo pode ser visto a partir do décimo dia de infecção, porém, o ápice de aumento deste inibidor no timo de dá aos 14 dias de infecção, quando as outras moléculas também estão aumentadas no tecido tímico (Figura 18).

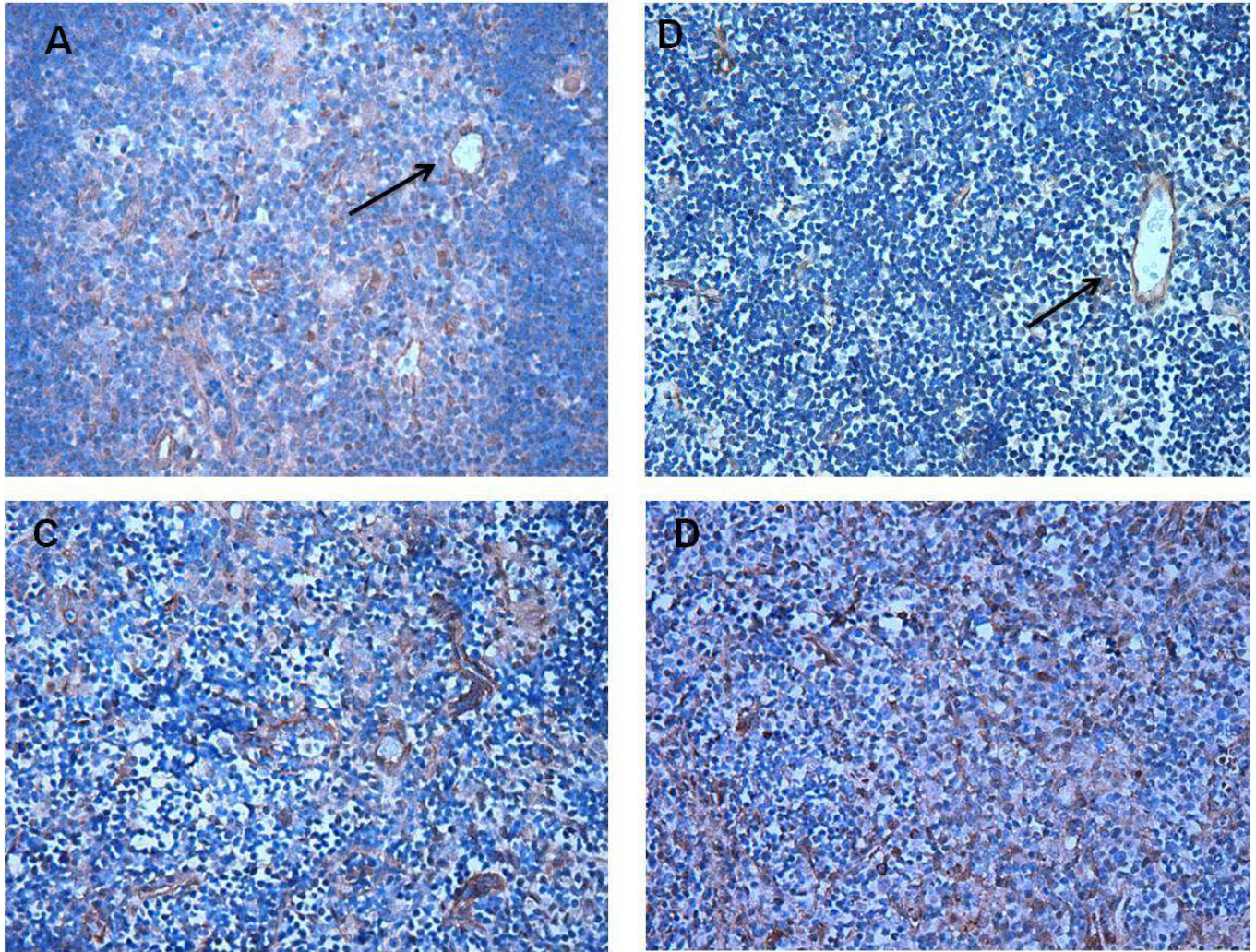


**Figura 18.** Análise quantitativa de TIMP-1 no tecido tímico. No gráfico de análise quantitativa, podemos confirmar numericamente os dados visíveis no corte histológico referente à imunomarcação. No grupo de animais não infectados existe uma quantidade ínfima de TIMP-1. A partir da infecção com *P. berghei* esse aumento é notável passando a ser significativo a partir do décimo dia de infecção. O aumento máximo de TIMP-1 no timo ocorre aos 14 dias de infecção. Resultados expressos em média  $\pm$  SE de quatro animais (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

#### **4.8.2 TIMP-2**

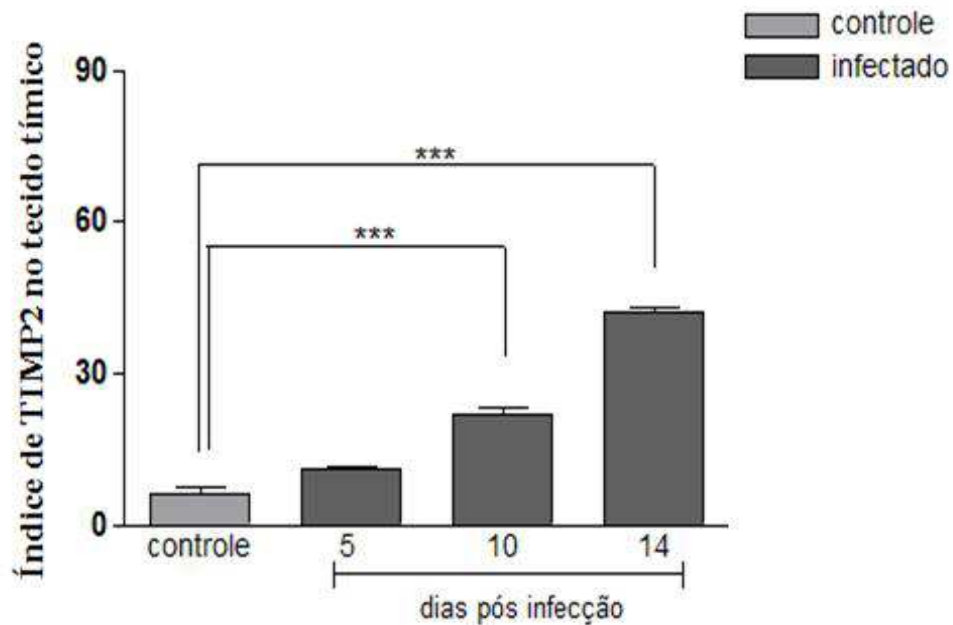
Para identificarmos a presença de TIMP-2 no tecido tímico, a mesma técnica foi desenvolvida. Diante dos resultados, vimos que há TIMP-2 no timo de animais infectados e não infectados pelo *Plasmodium*. Observa-se que TIMP-2 no tecido tímico de animais não infectados está presente em singela quantidade. A partir da infecção com *Plasmodium berghei* NK65, TIMP-2 altera sua quantidade de forma crescente até o décimo quarto dia de infecção. Quanto à localização tecidual de TIMP-2 nota-se que conforme aumenta a quantidade desta molécula do timo sua presença se torna mais evidente e a distribuição deixa de ser apenas próxima a vasos e passa a povoar o timo (Figura 19).





**Figura 19.** Presença de moléculas de TIMP-2 no timo. (A) Animais não infectados. Nota-se que a marcação de moléculas de TIMP-2 não está evidente no timo destes animais. (B) animais com 5 dias de infecção. Nota-se em A e B que TIMP-2 está presente em torno do epitélio vasos (setas). (C) animais com 10 dias de infecção. (D) animais com 14 dias de infecção. Nota-se o aumento significativo da presença de TIMP-2 no timo com total dispersão pelo órgão. Magnitude 200x.

Na análise quantitativa TIMP-2 mostra-se em uma quantidade basal em timos de animais controle. Este número aumenta com o decorrer do período pós-infecção. Um aumento significativo pode ser visto a partir do décimo dia de infecção, porém, o ápice de aumento de TIMP-2 no timo de dá aos 14 dias de infecção (Figura 20).



**Figura 20.** Análise quantitativa de TIMP-2 no tecido tímico. No gráfico de análise quantitativa, confirma numericamente os dados visíveis no corte histológico referente à imunomarcção. No grupo de animais não infectados existe uma quantidade ínfima de TIMP-2. A partir da infecção com *P. berghei* esse aumento é notável passando a ser significativo a partir do décimo dia de infecção. O aumento máximo de TIMP-12 no timo ocorre aos 14 dias de infecção. Resultados expressos em média  $\pm$  SE de quatro animais (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

## 5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento dos linfócitos T, essenciais componentes celulares do sistema imune, ocorre no timo e depende da integridade do microambiente tímico para chegarem ao estágio mais avançado de maturação: as células T simples positivas CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. Devido a isto, a manutenção do microambiente tímico é essencial para o completo desenvolvimento dos timócitos, uma vez que os precursores provenientes da medula óssea entram no timo e migram entre as regiões cortical e medular devido aos estímulos quimiotáticos (exibidos pelas quimiocinas e citocinas) e às ligações timócito - células do epitélio tímico. O estroma tímico além de promover a migração dos timócitos também apresenta uma série de interações celulares com os timócitos, através de receptores celulares, promovendo sua maturação. O engajamento dos receptores das células estromais aos timócitos ativa, neste último, uma série de cascatas intracelulares que promovem sua diferenciação de células duplo negativas em duplo positivas e por fim, em células funcionais simples positivas que são exportadas para a periferia do sistema imune (SAVINO *et al.*, 2004; PETRIE & ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2007).

Na presença de alterações no padrão de expressão dos elementos de matriz extracelular tímica, os timócitos são amplamente afetados tendo, sua migração através do epitélio tímico aumentada (GAMEIRO, 2010, COTTA-DE-ALMEIDA *et al.*, 2003) com sugestiva perda de função ou não ativação do processo de maturação timocitária. Ainda, em modelos experimentais murinos, são muitos os relatos de aumento da morte dos timócitos em condições patológicas (VERINAUD, *et al.*, 1998; BRITO, *et al.*, 2003; SAVINO, 2006; FRANCELIN *et al.*, 2011).

A matriz extracelular tímica está sob a constante ação de MMPs que mesmo em condições fisiológicas degradam o estroma tímico. Desta forma, os estudos realizados neste trabalho visaram analisar a atuação das MMPs e seus inibidores na atrofia tímica durante o curso da infecção malárica pelo *P. berghei* NK65.

O estudo das mudanças no timo durante a infecção malárica confirmou através da cinética do comprometimento tímico, que com o decorrer da doença ocorre a redução progressiva do órgão. A partir do quinto dia pós-infecção o timo inicia a redução do peso relativo tendo alcançado seu menor tamanho aos 14 dias de infecção. Podemos notar que a diminuição do peso relativo tímico ocorre juntamente com dois fatores: aumento da parasitemia e diminuição da taxa de sobrevivência devido a fatores múltiplos que desencadeiam a piora do quadro clínico em camundongos BALB/c durante a infecção por *P. berghei* NK65.

Há muito tempo foi identificada a presença de MMPs em diversas fisiopatologias (WESTERMARCK & KAHARI, 1999; CURRAN & MURRAY, 2000; KIVELÄ-RAJAMÄKI *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2005). Um estudo revelou a expressão e produção de MMP-9 por células estromais tímicas durante o desenvolvimento de linfoma tímico (AOUDJIT *et al.*, 1999). Neste trabalho houve aumento da expressão de MMP-9 em animais doentes.

Em nosso modelo experimental verificamos o mesmo padrão de comportamento. Com o decorrer da doença, a expressão gênica de MMP-9 tem seus níveis aumentados. Este aumento ocorre até o décimo dia de infecção e diminui no décimo quarto dia. Este último dado foi possível perceber pelo fato de que analisamos a progressão da doença durante 3 estágios diferentes da infecção, o que nos permitiu ter uma visão dos processos como um todo até o estágio final da doença.

A literatura mostra que após a injeção de anti-CD3 ocorre a indução de apoptose de células TCD<sup>4+</sup> e TCD<sup>8+</sup> e aumento de MMP-9 no timo (ODAKA *et al.*, 2004). Em nosso modelo experimental, os eventos de aumento do índice de apoptose de timócitos juntamente com o de aumento de MMP-9 são observados durante a atrofia tímica induzida por *P. berghei* podendo ser, portanto, eventos que ocorrem conjuntamente.

Trabalhos relacionados à tumores epiteliais tímicos mostraram o aumento considerável de MMP-2 durante a doença (SOGAWA *et al.*, 2003). Em nosso modelo cuja doença desenvolvida no timo é a malária, a expressão gênica de MMP-2 também mostrou-se aumentada até o décimo dia de infecção.

Para entendermos de forma eficaz a desestruturação da arquitetura tímica durante a atrofia induzida por *P. berghei*, avaliamos não somente as MMPs como também seus inibidores TIMPs, pequenas proteínas que bloqueiam a atividade das MMPs pela ligação ao sítio de zinco das MMPs, formando complexos enzima-inibidor (MAARTIR VAALAMO *et al.* 1999).

Nossos resultados a cerca da expressão gênica de TIMP-1 e TIMP-2, revelaram que há um aumento na produção de proteínas no décimo dia pós-infecção. Estes resultados são paralelos com o aumento da expressão gênica de MMP-2 e MMP-9 visto anteriormente.

Em 2010, Mieczkowaska e colegas citaram em um de seus trabalhos que TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  são citocinas que estimulam a produção de MMPs ao mesmo tempo em que inibem a produção de TIMPs na arterosclerose. Em nosso laboratório, estudos acerca da presença de TNF- $\alpha$  durante a infecção por *P. berghei* revelaram um aumento de TNF- $\alpha$  sérico aos 10 dias de infecção. Este aumento coincide com o aumento da expressão gênica de MMP-2 e MMP-9 no tecido tímico. Contudo, no mesmo período houve aumento da expressão gênica de inibidores TIMP-1 e TIMP-2 na infecção por *P. berghei*. Para entendermos quais outros mecanismos estão ativando a produção de inibidores, outros experimentos acerca deste assunto deverão ser realizados.

Apesar de TIMPs serem inibidores de MMPs e suas taxas estarem aumentadas durante a atrofia tímica, seu efeito não mostrou conter a degradação da matriz extracelular, sendo observada profunda desorganização do estroma aos 14 dias após a infecção malárica.



MMPs podem ser secretadas para a matriz extracelular e não necessariamente se tornarem ativas. Elas são em grande parte secretadas na forma de precursores latentes denominados pró-enzimas ou zimogênios.

Com relação à atividade das MMPs no timo durante a infecção por *P. berghei*, notamos que MMP-2 encontra-se nos estados latente, intermediário e ativo. Os estados latente e intermediário puderam ser observados no grupo de animais infectados e não infectados enquanto que o estado ativo foi observado somente aos 14 dias de infecção. Ainda, a atividade gelatinolítica de MMP-9 foi verificada apenas em seu estado latente nos grupos de animais infectados e não infectados com aumento no décimo quarto dia de infecção.

Trabalhos relacionados à tumores e apoptose no timo também demonstraram a presença de MMP-2 e MMP-9 ativas no tecido tímico (ODAKA *et al.*, 2004; SOGAWA *et al.*, 2010). Experimentos para medir a atividade enzimática de MMP-2 e MMP-9 na doença periodontal influenciada por diabetes mellitus tipo I revelaram a presença de MMP-2 latente, intermediária e ativa no tecido periodontal com um aumento aos 15 dias de infecção e diminuição aos 30 dias de infecção. O mesmo resultado foi obtido analisando MMP-9 durante a doença periodontal (SILVA *et al.*, 2008). Esses dados confirmam nossos resultados, mostrando que as MMPs têm um aumento expressivo durante processos que envolvem a degradação da matriz extracelular.

Com relação à localização tecidual de MMPs MMP-2 e MMP-9, notamos que no início da infecção por *Plasmodium berghei*, estas aparecem no tecido tímico próximas a região medular. Com a progressão da doença, além de existir um aumento visível da quantidade de MMP-2 e MMP-9 no timo, notamos também que a distribuição destas moléculas passa a ser abrangente tomando o timo como um todo. Quanto aos inibidores TIMP-1 e TIMP-2 nota-se que no início do desenvolvimento da infecção malárica estas moléculas apresentam-se próximas a região de células endoteliais. Com a progressão da doença, aos 14 dias de infecção, TIMP-1 e TIMP-2 passam a distribuir-se inteiramente pelo tecido

tímico. Esses resultados de padrão de distribuição podem ser intensificados por trabalhos que mostram que a produção de moléculas de MMP-2 e MMP-9 se dá essencialmente por células estromais como macrófagos. No timo estas células encontram-se principalmente povoando a região medular do órgão (MIECZKOWSKA *et al.*, 2010). Do mesmo modo, TIMP-1 e TIMP-2 são produzidos por células endoteliais o que enfatiza a localização tecidual que, inicialmente se encontra próximas a estas células e tardiamente distribui-se de forma generalizada (ODAKA *et al.*, 2004).

Os últimos resultados do nosso grupo acerca do estudo tímico demonstraram que durante o desenvolvimento da malária altos níveis de apoptose de timócitos e depleção de células CD4+CD8+ são verificados (FRANCELIN *et al.*, 2011).

Neste trabalho, os dados apresentados mostraram o aumento significativo de MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 em animais infectados com *P. berghei* NK65. Com estes resultados sugerimos que o aumento de moléculas de degradação de matriz pode estar influenciando a liberação tanto de fatores presos no arcabouço da matriz extracelular responsáveis pela maturação dos timócitos. A falta deste microambiente propício pode estar ocasionando a apoptose. Com relação ao aumento de inibidores, levantamos a hipótese de que este aumento seja devido à tentativa de homeostase do organismo em conservar o microambiente tímico. No entanto, neste modelo experimental, TIMPs não conseguem conter de forma eficaz a degradação do microambiente tímico.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho evidenciam o aumento progressivo das MMPs produzidas no timo. Este aumento sugere fortemente o envolvimento das MMPs durante a atrofia induzida pela infecção com *Plasmodium*. É altamente plausível se supor que a profunda desorganização da arquitetura tímica, que por si influencia o desenvolvimento dos timócitos, seja consequência da atuação das MMPs na degradação da matriz extracelular.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S. (2008) *Imunologia Celular e Molecular* [tradução de Claudia Reali e outros]. Rio de Janeiro: Elsevier.

Ahokas, K. (2005) Matrylisin-2 (matrix metalloproteinase-26) is upregulated in keratinocytes during wound repair and early skin carcinogenesis. *J Invest Dermatol* 124:849-856.

Ala-Aho, R., Kähari. (2005) Collagenases in cancer. *Biochimie*. 87:273-286.

Anderson, G., Lane, P.J., Jenkinson, E.J. (2007) Generating intrathymic microenvironments to establish T-cell tolerance. *Nat Rev Immunol* 7:954-963.

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.

Aoudjit, F., Masure, S., Opendakker, G., Potworowski, E.F., St-Pierre, Y. (1999) Gelatinase B (MMP-9), but not its inhibitor (TIMP-1), dictates the growth rate of experimental thymic lymphoma. *Int. J. Cancer* 82:743-747.

Beck, I.M., Rückter, R., Brandt, K., Mueller, M.S., Sadowski, T., Brauer, R., Schirmacher, P., Mentien, R., Sedlacek, R. (2008) MMP19 is essential for T cell development and T cell-mediated cutaneous immune responses. *Plos ONE* 3:2343.

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.

Cavdar, Z., Canda, A.E., Terzi, C., Sarioglu, S., Fuzun, M., Oktay, G. (2011) Role of gelatinases (MMP-2 and MMP-9), vascular endothelial growth Factor (VEGF) and endostatin on clinicopathological behavior of rectal cancer. *Colorectal Disease* 13:154-160.

Chakravarty, S., Cockburn, I.A., Kuk, S., Overstreet, M.G., Sacci, J.B., Zavala, F. (2008) Effector CD8+ T lymphocytes against liver stages of *Plasmodium yoelli* do not require gamma interferon for antiparasite activity. *Infect Immun* 76:3628-3631.

Ciofani, M. Zúñiga-Pflücker, J. C. (2007) The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Ann Rev Cell Dev Biol* 23:463-493.

Cotta-de-Almeida, V., Bonomo, A., Mendes-da-Cruz, D.A., Reiderer, 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 Immunol* 33:2439-2448.

Curran, S., Murray, G.I. (2000) Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumor invasion and metastasis. *Eur J Kane* 36: 1621-1630.

Francelin, C., Paulino, L.C., Gameiro, J., Verinaud, L. (2011) Effects of *Plasmodium berghei* on thymus: High levels of apoptosis and premature egresso f CD<sup>4+</sup> CD<sup>8+</sup> thymocytes in experimentally infected mice. *Immunobiology* 21:1148-1154.

Gameiro, J., Nagib, P., Verinaud, L. (2010) The thymus microenvironment is regulating thymocyte differentiation. *Cell Adh Migr* 4:382-390.

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

Guevara Patino, J.A., Ivanov, V.N., Lacy, E., Elkon K.B., Marino M.W., Nikolic–Zugic J. (2000) TNF- $\alpha$  is the critical mediator of the cyclic AMP-induced apoptosis of CD8C4C double-positive thymocytes. *J Immunol* 164:1689-1694.

Haidl, I.D., Falk, I., Nerz, G., Eichmann, K. (2006) Metalloproteinase-dependent control of thymocyte differentiation and proliferation . Scand J Immunol 64:280-286.

Haynes, B.F., Sempoowisk, G.D., Wells, A.F., Hale, L.P. (2000) The human thymus during aging. Immunol Res 22:253-261.

Kivelä-Rajamäki, M. (2003) Levels and molecular forms of MMP-7 (matrilysin-1) and MMP-8 (collagenase-2) in disease human peri-implantar sulcular fluid. J Periodont Res 38:583-590.

Koshikawa, N., Giannelli, G., Cirulli, V., Mtyazaki, K., Quaranta, V. (2000) Role of cell surface metalloproteinase MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. J Cell Biol 148:615-624.

Lagrotta-Candido, J.M., Villa-Verde, D.M., Vanderlei Jr, F.H. (1996) Extracellular matrix components of the mouse thymus microenvironment. V. Interferon-gamma modulates thymic epithelial cell thymocyte interaction via extracellular matrix ligands and receptors. Cell Immunol 170: 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 137:329-340.

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 Immunol 30:366-373.

McQuibban, G.A., Gong, J.H., Tam, E.M., McCulloch, C.A., Clark-Lewis, I., Overall, C.M. (2000) Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. Science 289:1202-1206.

Mieczkowska, J., Mosiewicz, J., Braud, W., Kwasniewski, W. (2010) Changes in the activity of connective tissue matrix enzymes in the metabolic syndrome Arch Med Sci 7:634-641.

Miller, L.H., Good, M.F., Milon, G. (1994) Malaria pathogenesis. *Science* 264:1878-1883.

Nabeshima, K. (2002) Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int* 52:255-264.

Nagase, H. (1997) Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem Hoppe Seyler's* 378:151-160.

Nagib, P.R., Gameiro, J., da Costa, T.A., Di Gangi, R., Ribeiro, J.S., Paulino, L.C., Verinaud, L. (2010) Effect of HeNe laser irradiation on extracellular matrix deposition and expression of cytokines and chemokines in paracoccidioidomycotic lesions. *Photochem Photobiol* 86:920-924.

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

O'charoenrat, P., Rhys-Evans, P.H., Archer, D.J., Eccles, S.A. (2003) C-erb B receptors in squamous cell carcinomas of the head and neck: clinical significance and correlation with matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factors. *Oral Oncol* 38:73-80.

Odaka, C., Tanioka, M., Itoh, T. (2004) Matrix metalloproteinase-9 in macrophages induces thymic neovascularization following thymocyte apoptosis. *J Immunol* 174:846-53.

Overall, C.M, McQuibban, G.A., Clark-Lewis, I. (2002) Discovery of chemokine substrates for matrix metalloproteinases by exosite scanning: a new tool for degradomics *Biol Chem* 383:1059-1066.

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

Palosaari, H., Pennington, C.J., Larmas, M., Edwards, D.R., Tjäderhane, L., Salo, T. (2003) Expression profile of matrix metalloproteinases MMPs and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *Eur J Oral Sci* 111:117-127.

Pereira, A.L.A., Veras, S.S.L., Silveira, E.J.D., Seabra, F.R.G., Pinto, L.P., Souza, L.B., Freitas, R.A. (2005) The role of matrix extracellular proteins and metalloproteinases in head and neck carcinomas: an updated review. *Rev Bras Otorrinolaringol* 71:81-86.

Petrie, H.T., Zúñiga-Pflücker, J.C. (2007) Zoned out: Functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Ann Rev Immunol* 25: 649-679.

Pilka, R., Norata, G.D., Domanski, H., Andersson, C., Hansson, S., Eriksson, P., Casslén, B. (2004) Matrix metalloproteinase-26 (Matrilysin-2) expression is high in endometrial hyperplasia and decreases with loss of histological differentiation in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 94:661-670.

Polette, M., Nawrocki-Raby, B., Gilles, C., Clavel, C., Birembaut, P. (2004) Tumor invasion and matrix metalloproteinases. *Crit Rev Oncol Hematol* 49:179-186.

Prado, A., Selman, M. (2005) MMP-1: the elder of the family. *Int J Biochem Cell Biol* 37:283-288.

Rahkonen, O.P., Koskivirta, I.M.O., Oksjoki, S.M., Jokinen, E., Vuorio, I. (2002) Characterization of the murine TIMP4 gene, localization within intron 5 of the synapsin 2 gene and tissue distribution of the mRNA. *Biochim Biophys Acta* 1557:45-52.

Rauvala, M., Puistola, U., Turpeenniemi-Hujanen, T. (2005) Gelatinases and their tissue inhibitors in ovarian tumors; TIMP-1 is a predictive as well as a prognostic factor. *Gynecol Oncol* 99:656-663.

Rundhaug, J.E. (2003) Matrix metalloproteinases, angiogenesis and cancer. *Clin Cancer Res* 9:551-554.



Sanz-Rodriguez, F., Hidalgo, A., Teixido, J. (2001) Chemokine stromal-cell-derived factor-1 $\alpha$  modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/ fibronectin and VCAM-1. *Blood* 97:346-351.

Savino, W., Ayres-Martins, S., Neves-dos-Santos, S., Smaniotto, S., Ocampo, J.S., Mendes-da-Cruz, D.A., Terra-Granado, E., Kusmenok, O., Villa-Verde, D.M. (2003) Thymocyte migration: an affair of multiple cellular interactions? *Braz. J. Med. Biol. Res* 36:1015-1025.

Savino, W., Mendes-da-Cruz, D.A., Silva-Monteiro, E., Villa-Verde, D.M. (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 Pathogen* 2:62.

Schofield, L., Grau, G.E. (2005). Immunological process in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol* 5:772-735.

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

Silva, J.A.F., Lorencini, M., Peroni, L.A., De La Hoz, C.L.R., Carvalho, H.F., Stach-Machado, D.R. (2008) The influence of type I diabetes mellitus on the expression and activity of gelatinases (matrix metalloproteinases-2 and -9) in induced periodontal disease. *J Periodont Res* 43:48-54.

Sogawa, K., Kondo, K., Fujino, H., Takahashi, Y., Miyoshi, T., Sakiyama, S., Mukai, K., Monden, Y. (2003) Increased expression of metalloproteinase-2 and Tissue Inhibitor of metalloproteinase-2 is correlated with poor prognostic variables in patients with thymic epithelial tumors *Cancer* 98:1822-1829.

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

Souza, A.P., Line, S.R.P. (2002) The biology of matrix metalloproteinases. *Rev Fob* 10:1-6.

Stamenkovick, I (2000) Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Cancer Biol.* 10:415-433.

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

Thomas, G.T., Lewis, M.P., Speight, P.M. (1999) Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral Oncol* 35:227-233.

Tsuji, M., Zavala, F. (2003) T cells as mediators of protective immunity against liver stages of *Plasmodium*. *Trends Parasitol* 19:83-88.

Vaalamo, M., Leivo, T., Saarialho-Kere, U. (1999) Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, -2, -3 and -4) in normal and aberrant wound healing. *Hum Pathol* 30:795-802.

Van Den Steen, P.E., Wuyts, A., Husson, S.J., Proost, P., Van Damme, J., Opdenakker, G. (2003) Gelatinase B/MMP-9 and neutrophil collagenase/MMP-8 process the chemokines human GCP-2/CXCL6, ENA-78/CXCL5 and mouse GCP-2/LIX and modulate their physiological activities. *Eur J Biochem* 270:3739-3749.

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

Vicente, J.C., Fresno, M.F., Villalain, L., Vega, J.A., Hernández, V.G. (2005) Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 41:283-293.

Vivinus-Nebot, M., Rousselle, P., Breittmayer, J., Cenciarini, C., Berrih-Aknin, S., Spong, S., Nokelainen, P., Cottrez, F., Marinkovich, M.P., Bernard, A. (2004) Mature human thymocytes on laminin-5 with activation of metalloproteinase-14 and cleavage of CD44. *J Immunol* 172:1397-1406.

Wang, Y., Xu, H., Ueda, Y., Shimasaki, M., Wang, E. (2007) Activation ratio of MMP-2 and expression of MT1-MMP are correlated in thymic epithelial tumors. *Pathology* 39:486-490.

Westermarck, J. Kähäri, V. (1999) Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 13:781-792.

Wilson, C.L., Matrisian, L.M. (1996) Matrilysin: an epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions. *Int J Biochem Cell Biol* 28:123-136.

Witt, C.M., Robey, E.A. (2005) Thymopoiesis in 4 dimensions. *Semin Immunol* 17:95-102.

Yamamoto, H., Vinitketkumnuen, A., Adachi, Y., Taniguchi, H., Hirata, T., Miyamoto, N., Noshō, K., Imsumran, A., Fujita, M., Hosokawa, M., Hinoda, Y., Imai, K. Association of matrilysin-2 (MMP-26) expression with tumor progression and activation of MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 25:2353-2360.