

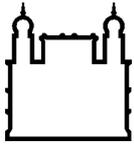
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

ANÁLISE DO EFEITO DA DESNUTRIÇÃO NO MICROAMBIENTE
TÍMICO DE CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM
LEISHMANIA (LEISHMANIA) INFANTUM

JONATHAN DURÃES DA SILVA

Rio de Janeiro
Dezembro de 2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

JONATHAN DURÃES DA SILVA

Análise do efeito da desnutrição no microambiente tímico de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum*

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

Orientadora: Prof. Dra. Patricia Cuervo Escobar

RIO DE JANEIRO
Dezembro de 2021

Durães da Silva, Jonathan.

Análise do efeito da desnutrição no microambiente tímico de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum* / Jonathan Durães da Silva. - Rio de Janeiro, 2021.

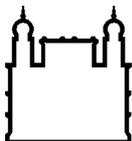
106 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2021.

Orientador: Patrícia Cuervo Escobar.

Bibliografia: f. 95-105

1. Leishmaniose Visceral. 2. Desnutrição. 3. Timo. 4. *Leishmania infantum*. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: JONATHAN DURÃES DA SILVA

**ANÁLISE DO EFEITO DA DESNUTRIÇÃO NO MICROAMBIENTE TÍMICO DE
CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM *LEISHMANIA (LEISHMANIA)*
*INFANTUM***

ORIENTADORA: Profa. Dra. Patricia Cuervo Escobar

Aprovado em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Alda Maria Da-Cruz - Presidente (IOC/FIOCRUZ)

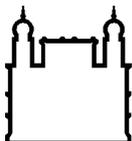
Prof. Dr. Vinicius Cotta de Almeida (IOC/FIOCRUZ)

Profa. Dra. Juliana Perrone B. de Menezes Fullam (IGM/FIOCRUZ)

Prof. Dr. Rodrigo Caldas Menezes (INI/FIOCRUZ)

Profa. Dra. Clarissa Menezes Maya Monteiro (IOC/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 07 de Dezembro de 2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado acadêmico em Biologia Celular e Molecular de **Jonathan Durães da Silva**, sob orientação da Dr^a. Patrícia Cuervo Escobar. Ao sétimo dia do mês de dezembro de dois mil e vinte e um, realizou-se às treze horas e trinta minutos, de forma síncrona remota, o exame da dissertação de mestrado acadêmico intitulada: “**Análise do efeito da desnutrição no microambiente tímico de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum***”, no programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Farmacologia e Imunologia, na linha de pesquisa: Mecanismos Imunológicos Envolvidos na Patologia de Doenças Autoimunes Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Alda Maria da Cruz – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Vinícius Cotta de Almeida– IOC/FIOCRUZ, Dr^a. Juliana Perrone Bezerra de Menezes – IGM/FIOCRUZ, e como suplentes: Dr^a. Clarissa Menezes Maya Monteiro- IOC/FIOCRUZ e Dr. Rodrigo Caldas Menezes - INI/FIOCRUZ. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovação da defesa da dissertação de mestrado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós- Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Presidente da Banca atesta a decisão e a participação do aluno e de todos o membros da banca de forma síncrona remota. A Coordenadora do Programa Dr^a. Leila de Mendonça Lima, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 7 de dezembro de 2021.

Dr^a. Alda Maria da Cruz (Presidente da Banca) :

Dr^a. Leila de Mendonça Lima (Coordenadora do Programa):

Dedico esta dissertação aos meus avós paternos, Irene e Severino, por todo apoio, carinho e paciência que me permitiram chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Patricia Cuervo, que sempre acreditou na minha capacidade técnica e científica, até mesmo nos momentos em que eu duvidava disso. Além de todos os ensinamentos relacionados à pesquisa científica, os debates e discussões acerca do projeto, e auxílio nos momentos de dificuldades enfrentadas durante os experimentos, agradeço também pelo apoio emocional. Com certeza levarei esses ensinamentos para o resto da minha vida.

À Dra. Fernanda Morgado, pela ajuda durante os experimentos das análises de Imuno-histoquímica/Histologia.

À Dra. Flavia L. Ribeiro Gomes, pela colaboração, ajuda e sempre boa disposição com os ensaios de imunofenotipagem celular e na análise dos resultados de citometria de fluxo.

Ao Dr. Wilson Savino e à Dra. Daniella Áreas Mendes da Cruz, do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, pela colaboração, discussões e orientações para o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Andrea Henrique Pons e a equipe da Plataforma de Citometria de Fluxo do IOC, especialmente a Daniela, pelo auxílio com a montagem do painel de anticorpos usados e ajuda com o equipamento onde foram realizadas as aquisições de células.

Aos membros do Laboratório de Pesquisas em Leishmanioses (LPL), Dra. Elisa Cupolillo, Dr. Renato Porrozzzi, Dra. Mariana Boite, Dra. Luíza Pereira, Virginia Andrade, Caroline Batista, Erika Costa, Marne Coimbra, Khaled Courabi, Carlos Somarribas, Camila Braga, Bruna Dias, Tainã Souza, e em especial aos meus colegas Renata Nascimento, Filipe Lima, Vanessa Susan, Nathalia Pinho, pelo convívio diário no laboratório e por todas as ajudas prestadas durante este período.

Aos membros da CLIOC-LPL Eduardo Paez, Henrique da Silva, Rosane Temporal, Hellen Ramos por todo o auxílio variado do dia a dia.

A todos os pesquisadores da FIOCRUZ que contribuíram de forma direta ou indireta com o meu enriquecimento acadêmico e científico durante as disciplinas da pós-graduação e seminário discente.

À FIOCRUZ, pela sua rede de plataformas e biotérios, com diversos laboratórios e equipamentos onde pude realizar os experimentos dessa dissertação, como a plataforma de PCR em tempo real, a plataforma de citometria de fluxo e a plataforma de bioensaios e triagem de fármacos.

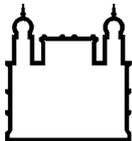
Às diversas instituições de fomento (CNPq, FAPERJ, COLCIENCIAS, FIOCRUZ) que viabilizaram financeiramente a execução desta dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro em forma de bolsa.

Aos meus amigos, em especial Renata Vasconcelos, Clara Carneiro, Thayssa Gomes, Lucas Milioni que mesmo com a distância, sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e ajudando a superar cada obstáculo que aparecia durante o curso do mestrado.

À minha família, por todo o suporte emocional e apoio incondicional que me permitiram terminar e chegar até esse momento.

“Os benefícios da ciência não são para os cientistas, e sim para humanidade.”
(Louis Pasteur)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

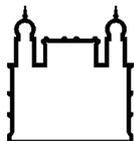
ANÁLISE DO EFEITO DA DESNUTRIÇÃO NO MICROAMBIENTE TÍMICO DE CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM *LEISHMANIA (LEISHMANIA) INFANTUM*

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Jonathan Durães da Silva

Camundongos desnutridos e infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum* sofrem drástica atrofia tímica acompanhada de diminuição nos níveis de quimiocinas e citocinas, mas a capacidade migratória de timócitos frente a estímulo quimiotático *ex vivo* é preservada. Além disso, a análise histopatológica do timo revelou que, enquanto os camundongos bem-nutridos infectados (CPI) mostraram um aumento na zona cortical tímica, os camundongos desnutridos e infectados (LPi) exibiram uma redução significativa da razão córtex:medula. Em conjunto, esses resultados indicam que o microambiente tímico, e não a migração celular *per se*, está comprometido nesses animais. Para avaliar essa hipótese, analisamos os efeitos da desnutrição em componentes da matriz extracelular tímica e nas subpopulações de timócitos em camundongos BALB/c infectados com *L. infantum*. Observamos níveis significativamente aumentados de fibronectina, laminina e MMP-10 na região cortical tímica. Visto que essa desregulação pode resultar em, (i) alterações nas subpopulações de timócitos, (ii) defeitos na migração intratímica de timócitos em desenvolvimento e/ou (iii) emigração de células T imaturas para periferia, analisamos por citometria de fluxo as subpopulações de células T no timo e em sangue periférico, avaliamos a presença de células duplo positivas (DP) na região medular tímica e analisamos os níveis de quimiocinas envolvidas com a atração de células T maduras do córtex para a medula (CCL21) e da medula para a periferia (S1P₁-S1P). Observamos uma redução no número absoluto de células DP em animais LP e LPi, enquanto na região medular tímica e no sangue periférico desses animais essas células estão aumentadas. Além disso, observamos que os níveis de CCL21 estão reduzidos significativamente em animais desnutridos (LP) e desnutridos e infectados (LPi) devido à desnutrição. Análise imunohistoquímica revelou um aumento significativo dos níveis de S1P₁ no córtex tímico de camundongos desnutridos (LP e LPi) ao passo que os níveis do seu ligante S1P em sangue periférico estavam reduzidos somente nos animais infectados (CPI e LPi). Além disso, observamos que a desnutrição favorece o aumento significativo da carga parasitária no timo em comparação a animais bem nutridos infectados (CPI), e que animais CPI apresentam aumento significativo de células T CD4⁺ efetoras (CD44⁺CD62^l) e recém ativadas (CD44⁺CD62^lCD69⁺), enquanto animais LPi não exibem esse aumento. Em conjunto, esses resultados sugerem que a desnutrição induz um microambiente tímico disfuncional onde a diferenciação, seleção e maturação de timócitos estão comprometidas e impactariam negativamente na saída de células T maduras para a periferia e no controle da proliferação do parasito em órgãos linfoides secundários como o baço, que de fato apresenta aumento precoce da carga parasitaria, agravando/acelerando os eventos imunopatológicos na leishmaniose visceral em indivíduos desnutridos e resultando, portanto, em formas mais graves da doença.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ANALYSIS OF MALNUTRITION EFFECT ON THE THYMIC MICROENVIRONMENT OF BALB/c MICE INFECTED WITH *LEISHMANIA (LEISHMANIA) INFANTUM*

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

Jonathan Durães da Silva

Malnourished mice infected with *Leishmania (Leishmania) infantum* suffer drastic thymic atrophy accompanied by decreased levels of chemokines and cytokines, but the thymocytes migratory capacity against chemotactic stimuli *ex vivo* is preserved. Besides, histopathological analysis revealed that while well-nourished infected mice (CPI) show an increase in the thymic cortical zone, malnourished-infected mice (LPi) exhibited a significant reduction in the cortex:medulla ratio. Together, those results indicate that thymic microenvironment, instead of cell migration *per se*, is compromised in malnourished animals. To evaluate this hypothesis, we analyzed the effects of malnutrition on the thymic extracellular matrix components and thymocytes subpopulations in BALB/c mice infected with *L. infantum*. First, we observed significantly increased levels of fibronectin, laminin and MMP-10 in the cortical region of malnourished animals. Since these alterations may involve changes in thymocytes subpopulations, defects in thymocytes migration and/or emigration of immature T cells to the periphery, we analyzed thymic T cells subpopulations, verified the presence of double-positive (DP) T cells in the medullary thymic region and peripheral blood, and analyze the levels of molecules involved in mature T cells attraction from cortex to medulla (CCL21), or from the thymic medulla to periphery (S1P₁-S1P). We observed reduction of DP cells in LP and LPi animals, while these cells are increased in the medullary region and in the peripheral blood of these animals. Furthermore, we observed significant reduction of CCL21 levels in LP and LPi animals. Immunohistochemistry analysis showed increased S1P₁ levels in the cortical region of malnourished mice (LP and LPi) while its ligand S1P was reduced in peripheral blood of infected animals (CPI and LPi). Malnutrition also induced a significant increase in the thymic parasite load compared to well-nourished infected animals (CPI). Moreover, effector (CD44⁺CD62^l) and newly activated CD4⁺ T cells (CD44⁺CD62^l-CD69⁺) increased in CPI animals whereas LPi animals did not exhibit this increase. These results suggest that malnutrition induces a dysfunctional thymic microenvironment where the differentiation, selection and maturation of thymocytes is compromised. Such defects may negatively impact the exit of mature T cells to the periphery and the control of parasite load in secondary lymphoid organs such as the spleen, aggravating/accelerating the immunopathological events in visceral leishmaniasis in malnourished mice and resulting in severe forms of the disease.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| Resumo..... | x |
| Abstract..... | xi |
| Índice de Figuras..... | xiv |
| Lista de Tabelas..... | xvi |
| Lista de Quadros..... | xvii |
| Lista de Siglas e Abreviaturas..... | xviii |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 20 |
| 1.1 Leishmanioses..... | 20 |
| 1.2 Leishmaniose Visceral..... | 22 |
| 1.3 Curso da infecção na leishmaniose visceral experimental..... | 24 |
| 1.4 Resposta imune na leishmaniose visceral..... | 26 |
| 1.5 Desnutrição..... | 31 |
| 1.5.1 Efeitos da desnutrição proteico-calórica na imunidade..... | 34 |
| 1.5.2 Desnutrição e leishmaniose visceral..... | 35 |
| 1.5.3 Efeitos da desnutrição em órgãos linfoides..... | 36 |
| 1.6 Timo..... | 37 |
| 1.6.1 Desenvolvimento de linfócitos T no timo..... | 40 |
| 1.6.2 Microambiente tímico..... | 44 |
| 1.7 Justificativa..... | 46 |
| 2. OBJETIVOS..... | 48 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 48 |
| 2.2 Objetivos Específicos..... | 48 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 49 |
| 3.1 Cultura de Parasitos..... | 49 |
| 3.2 Modelo experimental de desnutrição e infecção..... | 49 |
| 3.3 Quantificação de hormônios..... | 51 |
| 3.4 Quantificação da glicemia dos camundongos..... | 52 |
| 3.5 Análise imuno-histoquímica..... | 52 |
| 3.6 Marcação de linfócitos T duplo positivos na medula tímica por imunofluorescência..... | 53 |
| 3.7 Imunofenotipagem de linfócitos T..... | 53 |
| 3.8 Quantificação da carga parasitária no timo e baço..... | 54 |

| | |
|---|------------|
| 3.9 Dosagem de CCL21 e S1P..... | 55 |
| 3.10 Análise estatística..... | 55 |
| 4. RESULTADOS..... | 56 |
| 4.1 A desnutrição proteico-calórica diminui o peso corporal dos camundongos e altera significativamente os níveis séricos de IGF-1, leptina e corticosterona..... | 56 |
| 4.2 A desnutrição favorece o aumento da carga parasitária no timo..... | 59 |
| 4.3 A desnutrição induz aumento na deposição de laminina, fibronectina no timo de camundongos BALB/c infectados com <i>L. infantum</i> | 59 |
| 4.4 O aumento na deposição de laminina, fibronectina no timo de camundongos desnutridos e infectados é acompanhado por aumento na expressão de MMP10..... | 63 |
| 4.5 Animais desnutridos e desnutridos e infectados apresentam níveis reduzidos de CCL21 no timo..... | 65 |
| 4.6 Tanto a desnutrição quanto a infecção alteram as subpopulações de linfócitos T no timo..... | 66 |
| 4.7 A subpopulação de timócitos DN1 é aumentada em animais infectados com <i>L. infantum</i> , mas diminuída nos animais desnutridos infectados..... | 69 |
| 4.8 Animais desnutridos infectados (LPi) apresentam aumento de células T duplo positivas no compartimento medular tímico..... | 71 |
| 4.9 Animais desnutridos e desnutridos e infectados apresentam aumento significativo na expressão do receptor S1P ₁ | 73 |
| 4.10 Animais infectados (CPi e LPi) apresentam redução significativa dos níveis de S1P..... | 74 |
| 4.11 Células T duplo positivas tendem a aumentar no sangue periférico de animais desnutridos..... | 75 |
| 4.12 A desnutrição e a infecção alteram as subpopulações de células T efetoras no timo..... | 77 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 79 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 93 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 95 |
| 8. ANEXOS..... | 106 |
| 8.1 Anexo I. Declaração da Comissão de Ética para Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz..... | 106 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1.1- Ciclo de vida de <i>Leishmania infantum</i> | 21 |
| Figura 1.2- Incidência de Leishmaniose visceral no mundo..... | 23 |
| Figura 1.3- Prevalência da desnutrição no mundo..... | 31 |
| Figura 1.4- Evolução da fome no Brasil: porcentagem da população afetada pela insegurança alimentar grave entre 2004 e 2020 – macrorregiões..... | 33 |
| Figura 1.5. Relação entre a desnutrição, imunidade e infecção..... | 34 |
| Figura 1.6- Estágios de desenvolvimento de linfócitos T no timo..... | 43 |
| Figura 3.1- Desenho experimental do modelo de infecção e desnutrição..... | 49 |
| Figura 4.1- Avaliação do peso corporal durante o curso experimental..... | 54 |
| Figura 4.2- Consumo de ração durante o curso experimental..... | 55 |
| Figura 4.3- Quantificação dos níveis de glicose em sangue periférico de animais desnutridos e infectados com <i>L. infantum</i> | 55 |
| Figura 4.4- Níveis de leptina, IGF-1, corticosterona e carga parasitária esplênica em animais desnutridos e infectados com <i>L. infantum</i> | 56 |
| Figura 4.5- Quantificação da carga parasitária em camundongos BALB/c infectados com <i>L. infantum</i> | 57 |
| Figura 4.6- Imuno-histoquímica para fibronectina nas regiões do córtex e medula do timo de camundongos BALB/c desnutridos e infectados com <i>L. infantum</i> | 58 |
| Figura 4.7- Quantificação do percentual de área marcada para fibronectina no timo de camundongos BALB/c..... | 59 |
| Figura 4.8- Imuno-histoquímica para laminina nas regiões do córtex e medula do timo de camundongos BALB/c desnutridos e infectados com <i>L. infantum</i> | 60 |
| Figura 4.9- Quantificação do percentual de área marcada para laminina no timo de camundongos BALB/c..... | 61 |
| Figura 4.10- Imuno-histoquímica para MMP10 nas regiões do córtex e medula do timo de camundongos BALB/c desnutridos e infectados com <i>L. infantum</i> | 62 |
| Figura 4.11- Quantificação de MMP-10 no timo de camundongos BALB/c..... | 63 |
| Figura 4.12- Níveis de quimiocina CCL21 no fluido intersticial tímico de camundongos BALB/c..... | 64 |

| | |
|---|----|
| Figura 4.13. Subpopulações de células T no timo de camundongos BALB/c desnutridos e infectados com <i>L. infantum</i> | 66 |
| Figura 4.14- Número absoluto de subpopulações de timócitos duplo negativos (DN) no timo de camundongos BALB/c..... | 68 |
| Figura 4.15- Análise de células T duplo positivas na região medular de camundongos BALB/c desnutridos e infectados com <i>Leishmania infantum</i> | 69 |
| Figura 4.16- Quantificação de timócitos CD4 ⁺ CD8 ⁺ na região medular de camundongos BALB/c infectados com <i>L. infantum</i> | 70 |
| Figura 4.17- Imuno-histoquímica para S1P ₁ nas regiões do córtex e medula do timo de camundongos BALB/c..... | 72 |
| Figura 4.18- Análise da expressão de S1P ₁ no córtex e na medula de camundongos BALB/c..... | 73 |
| Figura 4.19- Níveis de esfingosina-1-fosfato (S1P) em sangue periférico de camundongos BALB/c..... | 74 |
| Figura 4.20- Análise das subpopulações de células T em sangue periférico de camundongos BALB/c..... | 75 |
| Figura 4.21- Análise das subpopulações de células T efetoras (CD44 ⁺ CD62I ⁻) e recém ativadas (CD44 ⁺ CD62I ⁻ CD69 ⁺) no timo de camundongos BALB/c desnutridos e infectados com <i>L. infantum</i> | 77 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 4.1- Número absoluto de timócitos em camundongos BALB/c desnutridos e infectados com <i>L. infantum</i> | 65 |
|--|----|

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1.1- Número de casos confirmados notificados no SINAN no período de 2016 a 2019..... | 24 |
| Quadro 1.2- Tipos celulares presentes no timo..... | 38 |
| Quadro 3.1- Composição das dietas isocalóricas fornecidas aos camundongos BALB/c..... | 48 |
| Quadro 3.2- Painel de anticorpos utilizado para imunofenotipagem de subpopulações de linfócitos T..... | 52 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- APC.** Célula Apresentadora de Antígeno
- BSA.** Soro Albumina Bovino
- CCL21.** Quimiocina (motivo C-C) ligante 21
- CCL5.** Quimiocina (motivo C-C) ligante 5
- cTEC.** Célula Epitelial Tímica cortical
- CXCL10.** Quimiocina (motivo C-X) ligante 10
- CXCL12.** Quimiocina (motivo C-X) ligante 12
- CXCL9.** Quimiocina (motivo C-X) ligante 9
- CXCR4.** Receptor de Quimiocina tipo 4
- CXCR7.** Receptor de Quimiocina tipo 7
- DC.** Célula Dendrítica
- DN.** Duplo Negativo
- DNA.** Ácido Desoxirribonucleico
- DP.** Dupla Positiva
- FAO.** Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
- GLP-1.** Peptídeo semelhante ao glucagon-1
- HIV.** Vírus da Imunodeficiência Humana
- IFN- γ .** Interferon gama
- IGF-1.** Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
- IL 1.** Interleucina 1
- IL 10.** Interleucina 10
- IL 7.** Interleucina 7
- IL-12.** Interleucina 12
- LV.** Leishmaniose Visceral
- MEC.** Matriz Extracelular
- MHC.** Complexo Principal de Histocompatibilidade
- MMP.** Metaloproteinase
- mTEC.** Célula Epitelial Tímica medular
- OMS.** Organização Mundial da Saúde
- PBS.** Solução Salina Tamponada
- qPCR.** Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
- RNA.** Ácido Ribonucleico
- RNI.** Intermediários Reativos do Nitrogênio

ROS. Espécies Reativas do Oxigênio

S1P. Esfingosina-1-fosfato

S1P₁. Receptor de esfingosina-1-fosfato

SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SISVAN. Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional

SP. Simples positiva

SPHK1. Esfingosina quinase 1

TCR. Receptor de Célula T

TE. Célula T efetora

TEC. Célula Epitelial Tímica

TNC. Célula “*Nurse*” do Timo

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

O termo leishmaniose agrupa um conjunto de doenças tropicais e subtropicais causadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*. Dentre as formas clínicas existentes, a Organização Mundial da Saúde (OMS) destaca, principalmente, as seguintes formas: Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV). As doenças causadas por esses protozoários intracelulares são consideradas pela OMS como zoonoses, contudo, em algumas regiões, a transmissão entre humanos se dá sem participação de outros mamíferos, caracterizando assim uma antroponose. Além disso, a leishmaniose é considerada uma das doenças tropicais negligenciadas mais importantes encontrando-se, atualmente, entre as 6 endemias consideradas prioritárias no mundo, representando assim um grave problema de saúde mundial (WHO, 2021).

Durante seu ciclo de vida, *Leishmania* apresenta diversas formas evolutivas dentre as quais duas se destacam: uma forma flagelada móvel denominada promastigota, a qual está presente no vetor hematófago e uma forma amastigota, com o flagelo internalizado, presente nas células do hospedeiro vertebrado, sendo os fagócitos profissionais, como células dendríticas e macrófagos, as principais células infectadas (Figura 1.1). Esses parasitas são transmitidos através da picada das fêmeas de insetos do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia* durante o repasto sanguíneo (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017). Nesses vetores, o parasito sofre diversas mudanças morfológicas que culminam na forma evolutiva infectante, a promastigota metacíclica (Figura 1.1) (BATES, 2018). Múltiplos repastos sanguíneos são críticos para o sucesso da infecção no vetor e para o desenvolvimento do estágio infectivo dos parasitos (SERAFIM; INIGUEZ; OLIVEIRA, 2020). A infecção se inicia quando o vetor regurgita a forma infectante na pele do hospedeiro vertebrado e o sucesso dessa infecção depende de fatores que incluem componentes da microbiota intestinal do vetor e proteínas presentes na saliva do flebotomíneo (BATES, 2018), assim como de fatores do parasita incluindo proteofosfoglicanos e moléculas secretadas através de exossomos (ATAYDE *et al.*, 2016).

No hospedeiro vertebrado acontecem interações mediadas através da ligação das promastigotas com receptores presentes na membrana de fagócitos que

facilitam sua internalização em vacúolos parasitóforos (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017). Dentro desse vacúolo, os parasitos sofrem diferenciação para forma amastigota, sem flagelo aparente, e continuam a se multiplicar, por divisão binária, até romper a membrana dos fagócitos. A partir dessa lise, amastigotas são liberadas e fagocitadas por novas células que foram recrutadas ao local da infecção, perpetuando assim a infecção no hospedeiro vertebrado (MCGWIRE & SATOSKAR, 2014).

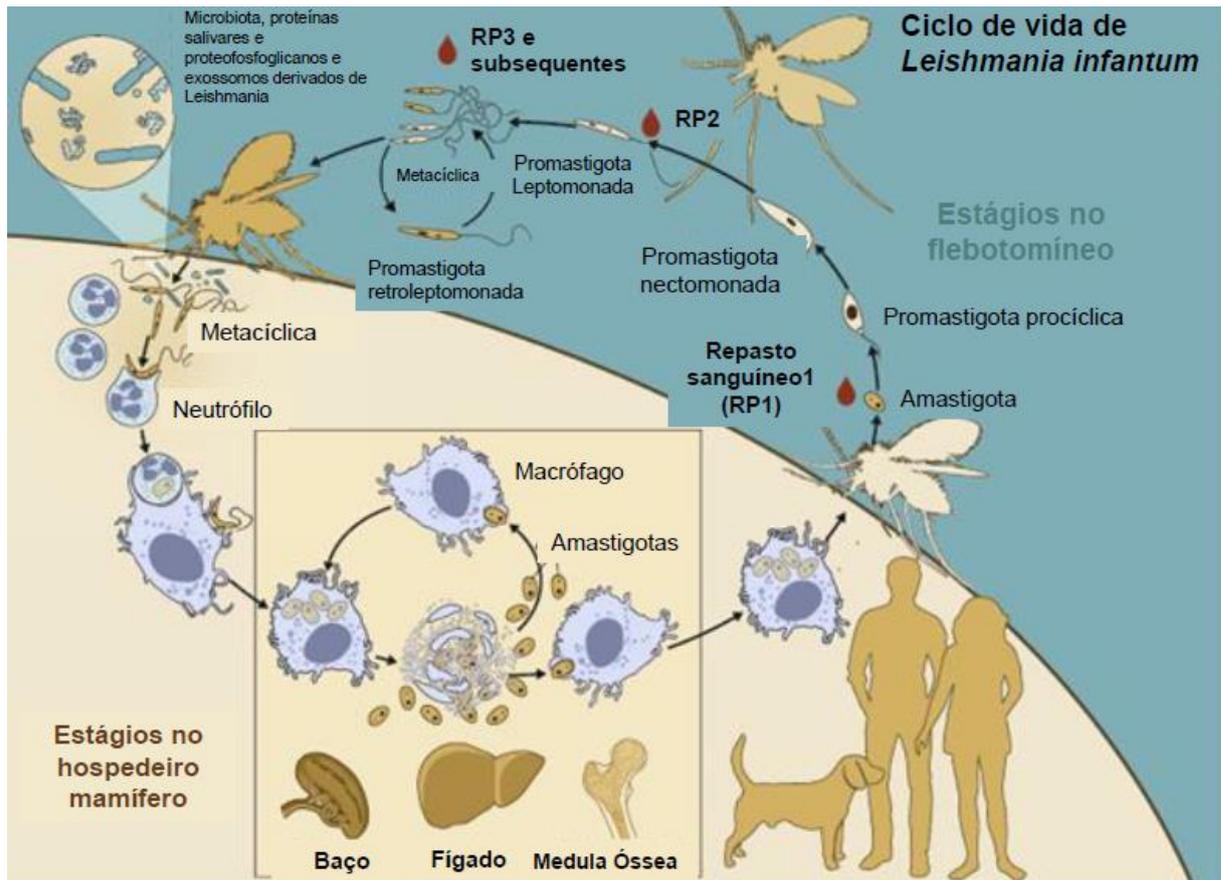


Figura 1.1- Ciclo de vida de *Leishmania infantum*. A figura mostra o ciclo de vida de uma das espécies causadoras da leishmaniose visceral. Inicialmente o inseto vetor se alimenta de um hospedeiro infectado e durante o repasto sanguíneo ingere células infectadas com as formas amastigotas. No inseto vetor o parasito sofre diferenciação para formas evolutivas flageladas e replicativas até atingir a forma infectante para os hospedeiros vertebrados que são as promastigotas metacíclicas (não replicativas). No hospedeiro vertebrado, essas promastigotas infectam células do sistema imune inato como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, onde novamente se diferenciam para forma amastigota, podendo infectar diversos órgãos como fígado, baço e medula óssea. Adaptado de: (SERAFIM; INIGUEZ; OLIVEIRA, 2020)

1.2 Leishmaniose visceral (LV)

A LV é causada por parasitos das espécies *L. donovani* e *L. infantum* (NICOLLE, 1908), mas há casos reportados causados também por *L. tropica* (CHAPPUIS et al., 2007). No Brasil, a espécie responsável pelos casos de LV é *L. infantum* e duas espécies de vetores estão relacionadas com sua transmissão: *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). O primeiro caso registrado da doença no Brasil foi no ano de 1913, quando Migone, no Paraguai, durante uma necropsia de um paciente do Mato Grosso, identificou a presença do agente infeccioso (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A LV é uma doença que, se não tratada, pode levar a óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Estima-se que a incidência mundial de LV está em torno de 50.000~90.000 casos, com um quadro de óbitos que chega a quase 6.000 mortes por ano (DNDI, 2020). No ano de 2019, 95% dos novos casos da doença reportados à OMS estavam concentrados em 10 países: Brasil, China, Etiópia, Índia, Iraque, Kênia, Nepal, Somália, Sudão e Sudão do Sul (WHO, 2021) (Figura 1.2). A LV é considerada de importância para a saúde pública mundial em decorrência da sua alta incidência e letalidade, especialmente em crianças desnutridas, pacientes não tratados, e sua gravidade em portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Contudo, é uma doença classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como “negligenciada”, pois afeta principalmente populações mais pobres e vulneráveis em países com baixo desenvolvimento socioeconômico especialmente da África, Ásia, América Latina e Caribe. Além disso, por não apresentar perspectivas de lucro, as indústrias farmacêuticas não têm interesse no desenvolvimento de quimioterápicos para o combate da LV (CHAPPUIS et al., 2007). Atualmente, os fármacos que são utilizados para o tratamento dessa doença incluem a miltefosina, anfotericina B e o glucantime (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014)..

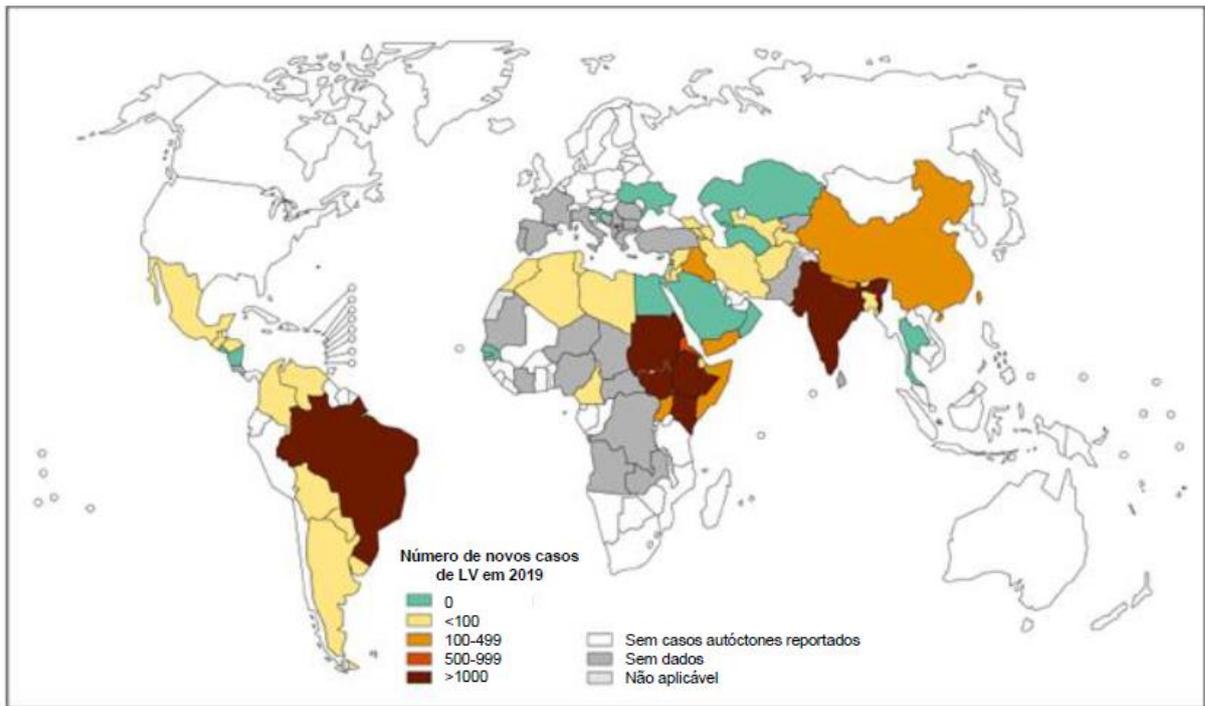


Figura 1.2- Incidência de Leishmaniose visceral no mundo. O mapa mostra a incidência dos casos de leishmaniose visceral no ano de 2019. Na coloração vermelha-escura observa-se os países que apresentam a incidência de mais de mil casos reportados, onde consegue-se observar o Brasil fazendo parte das nações onde mais casos da doença são reportados. Adaptado de: (WHO, 2021).

Na América Latina, a doença vem sendo notificada desde o México até o norte da Argentina. Cabe destacar que, mesmo com um número alto de casos subnotificados, o Brasil é responsável por cerca de 90% dos casos de LV no continente (MARCONDES & ROSSI, 2013). A doença tem sido descrita em vários municípios do país, predominantemente em ambientes rurais. Contudo, atualmente são registrados casos em centros urbanos, como por exemplo nas cidades de Rio de Janeiro (RJ) e em diversos outros centros urbanos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Hoje em dia, a maioria dos casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde se distribui de ordem decrescente nas seguintes regiões do Brasil: Nordeste, Sudeste, Norte, Centro-oeste e Sul (Quadro 1.1).

Quadro 1.1- Número de casos confirmados notificados no SINAN no período de 2016 a 2019.

| Ano Notificação | Região Norte | Região Nordeste | Região Sudeste | Região Sul | Região Centro-Oeste | Total |
|-----------------|--------------|-----------------|----------------|------------|---------------------|-------|
| 2016 | 622 | 1828 | 756 | 17 | 232 | 3455 |
| 2017 | 861 | 2199 | 1096 | 17 | 283 | 4456 |
| 2018 | 836 | 2197 | 604 | 15 | 199 | 3851 |
| 2019 | 541 | 1603 | 456 | 16 | 211 | 2827 |
| Total | 2860 | 7827 | 2912 | 65 | 925 | 14589 |

Adaptado de: Ministério da Saúde - Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Disponível em: www.portalsinan.saude.gov.br/. Acessado em: novembro/2021. Não existem dados públicos no SINAN sobre 2020.

A infecção com espécies de *Leishmania* viscerotrópicas é assintomática na maioria das vezes, entretanto alguns pacientes manifestam alguns sintomas moderados ou transitórios como: diarreia, tosse seca, adinamia, febre leve, sudorese e discreta hepatoesplenomegalia (QUEIROZ et al., 2004). Quando não tratados adequadamente, os sintomas podem evoluir para a forma grave doença, forma essa cujos sintomas são caracterizados por intensa hepatoesplenomegalia, febre, dor, perda de peso, icterícia e em fases mais tardias da doença os pacientes podem apresentar edema e ascite (BADARÓ et al., 1986). Um estudo de caso-controle realizado no Brasil demonstrou a LV como síndrome de resposta inflamatória sistêmica, sendo as infecções bacterianas e sangramento os dois principais desfechos associados aos pacientes com LV que foram a óbito (COSTA et al., 2010).

1.3 Curso da infecção na leishmaniose visceral experimental

Como mencionado anteriormente, a LV é causada particularmente pelas espécies *L. donovani* e *L. infantum*. Os principais sítios de infecção com esses parasitos são o baço e o fígado (KAYE et al., 2004). A maior parte do conhecimento que se detém sobre mecanismos envolvidos na resposta imunológica na LV é oriunda de estudos realizados em modelos animais, devido à dificuldade de realizar a coleta de amostras em humanos (KAYE et al., 2004). Dentre os modelos de animais experimentais pode-se citar camundongos, hamsters, cães e primatas não humanos (LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014). Apesar das vantagens em se utilizar modelos animais para o estudo, nenhum deles reproduz fielmente o

desfecho da infecção humana por *Leishmania* (LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014). Dentre os fatores que contribuem para essas diferenças destacam-se a rota de infecção, a natureza e quantidade do inóculo, assim como a cepa do parasita (LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014).

Em modelos experimentais de LV que utilizam camundongos, sabe-se que o resultado da infecção é determinado geneticamente. Em geral, camundongos (*Mus musculus*) são conhecidos por controlarem a infecção por *L. infantum* e *L. donovani*, sendo assim considerados modelos resistentes. Essa resistência tem sido associada ao gene *Slc11a1*, também conhecido como *Nramp1*, responsável por codificar um transportador de íons metálicos divalentes que regula a homeostase do ferro em macrófagos, evitando que seja usado pelos parasitas no interior do vacúolo parasitóforo, controlando assim a replicação precoce de amastigotas (LIPOLDOVÁ & DEMANT, 2006).

As linhagens de camundongos que possuem mutações no gene *Slc11a1*, como é o caso dos camundongos BALB/c e C57BL/6, não conseguem controlar a proliferação inicial do parasita no fígado, mas com cerca de 8-12 semanas controlam a infecção mediante a formação de granulomas. A maioria das cepas de camundongos que apresentam mutações nesse gene desenvolvem mecanismos imunológicos adquiridos para controlar o crescimento do parasita no fígado em estágios posteriores da infecção (NIETO *et al.*, 2011). Cepas com mutações no gene *Slc11a1* apresentam cerca de 50 vezes mais amastigotas no fígado quando comparado com as cepas selvagens (LIPOLDOVÁ & DEMANT, 2006). É importante ressaltar que a resistência natural independe de células T e de outros aspectos da imunidade adquirida (KAYE; SCOTT, 2011).

Camundongos, então, são considerados modelos adequados para estudar a infecção subclínica ou resolutive. Nesse contexto, BALB/c e C57BL/6 são considerados suscetíveis no à *L. donovani* ao passo que camundongos SV/129 são considerados resistentes (LIPOLDOVÁ & DEMANT, 2006). Por essa razão, BALB/c e C57BL/6 são comumente utilizados em estudos experimentais. Também foi corroborado que camundongos BALB/c são suscetíveis à infecção com *L. infantum*, SV/129 são resistentes e C57BL/6 apresentam um fenótipo de infecção intermediário entre a susceptibilidade do primeiro e a resistência do segundo (PÉREZ-CABEZAS *et al.*, 2019). A infecção nesses animais em geral não é fatal, mas a imunopatologia dos tecidos infectados apresenta alguma similaridade com o

espectro de sintomas clínicos relatados em pacientes com LV (FALEIRO *et al.*, 2014).

O hamster dourado sírio (*Mesocricetus auratus*) é conhecido por ser suscetível à infecção por *L. donovani* e *L. infantum*. Além disso, ele é considerado um dos melhores modelos para se estudar a LV devido ao fato de reproduzir as características clínicas e patológicas da doença em humanos (LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014). Durante a progressão da LV em hamsters, apesar da grande ativação da resposta imune, sobretudo a resposta Th1, observa-se uma replicação descontrolada do parasito no fígado, baço, e medula óssea. A infecção leva a um comprometimento gradual da resposta proliferativa aos antígenos do parasita. Esse comprometimento em parte é atribuído à incapacidade de células apresentadoras de antígeno (APCs) em estimular células T específicas, assim como a produção de TGF-B que desencadeia a apoptose de linfócitos e a regulação negativa da atividade de proteína quinase C (PKC) (NIETO *et al.*, 2011).

Os hamsters apresentam vários sinais clínicos de LV como hipergamaglobulinemia, hepatoesplenomegalia, anemia e caquexia, que são semelhantes aos sintomas observados na doença canina e humana (NIETO *et al.*, 2011). Além disso, os hamsters apresentam expressão reduzida do gene que codifica iNOS, que por consequência pode levar a baixos níveis de óxido nítrico (NO), portanto, prejudicando o mecanismo pelo qual o macrófago consegue responder contra o parasito (NIETO *et al.*, 2011). Entretanto, apesar de ser um bom modelo para estudar a LV, é importante salientar que esse modelo possui algumas limitações como a escassez de reagentes específicos, como anticorpos, disponíveis para estudar o papel da resposta imune na patologia da doença.

1.4 Resposta imune na leishmaniose visceral

Apesar da imunologia e imunopatologia da leishmaniose em humanos, cães e em modelos experimentais murinos serem amplamente estudadas, a resposta frente à infecção é complexa e ainda há vários aspectos pouco compreendidos (KAYE & AEBISCHER, 2011).

A disseminação do parasito no hospedeiro é resultante de uma resposta imune ineficaz contra o parasito. Essa ineficiência é caracterizada por um desequilíbrio da resposta imune que passa a ser dominada pelo aumento de

citocinas regulatórias como IL-10 e TGF- β , as quais afetam diretamente na resposta imune celular anti-*Leishmania* (GOLLOB et al., 2014).

A resposta imune inata participa na resistência à LV, controlando a proliferação do parasito durante os estágios iniciais da infecção e direcionando o recrutamento de células. Além disso, promove o desenvolvimento do microambiente de citocinas no qual as células T específicas do parasita são iniciadas (PERUHYPE-MAGALHÃES *et al.*, 2005). O início da resposta inflamatória ocorre a partir do momento que o inseto vetor infectado regurgita os parasitos e esses penetram na derme, onde se observa o recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o sítio de infecção. Ainda no local da infecção, células apresentadoras de antígeno (APC), as quais incluem células dendríticas e macrófagos, secretam interleucina-12 (IL-12). Esta citocina induz a produção de interferon gama (IFN- γ) por células T CD4⁺ e NK que por consequência aumentam a atividade microbicida de macrófagos e células dendríticas (KAYE; SCOTT, 2011). O IFN- γ confere uma resposta protetora devido a sua função na ativação do macrófago no perfil clássico M1, no qual observa-se a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), particularmente óxido nítrico (NO) os quais resultam na morte intracelular de amastigotas (KAYE & SCOTT, 2011).

Outro mecanismo pelo qual o macrófago consegue resolver a infecção com *Leishmania* envolve a ativação de inflamassomas. Os inflamassomas consistem em complexos de proteínas com domínio de ligação de nucleotídeos e repetições ricas em leucina (NLRs), os quais são formados no citoplasma de células do sistema imune inato a partir da detecção de micro-organismos ou sinais de dano pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRR's) (ZAMBONI; SACKS, 2019). Inflamassomas são críticos para o desfecho da leishmaniose (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2013) e o NLRP3, que está envolvido na detecção e restrição da infecção por parasitas (ZAMBONI & LIMA-JUNIOR, 2015), é o mais estudado. Recentemente foi mostrado que as moléculas de LPG presentes na superfície dos parasitos ativam indiretamente a caspase-11 que desencadeia a ativação do inflamassoma NLRP3 resultando na restrição da multiplicação intracelular do parasito (DE CARVALHO *et al.*, 2019).

As DCs presentes na derme têm papel fundamental na apresentação e ativação de células da resposta imune adquirida (T CD4⁺ e T CD8⁺), entretanto, a função das células T CD8⁺ na resposta contra *Leishmania* parece ser dual

(TSAGOZIS; KARAGOUNI; DOTSIKA, 2005). Existem estudos que indicam a importância desse tipo celular no controle da infecção experimental por *L. major* (MÜLLER *et al.*, 1993). Recentemente foi observado que a subpopulação de células T CD8⁺ estava aumentada e havia alta produção de granzima B em pacientes curados da infecção com *L. donovani* (KAUSHAL *et al.*, 2014). A granzima B é uma serino-protease presente em grânulos de linfócitos T citotóxicos que é internalizada na células infectadas (SUSANTO; TRAPANI; BRASACCHIO, 2012). Quando presente no citoplasma da célula-alvo, a granzima B é capaz de induzir apoptose por meio da ativação de caspases 3, 6 e 7 (SUSANTO; TRAPANI; BRASACCHIO, 2012). Por outro lado, embora na LV experimental as células T CD8⁺ contribuam para o controle do parasita, na LV humana as células T CD8 esplênicas são predominantemente anérgicas/exaustas, ao passo que sistemicamente é observada uma mistura de células anérgicas e células citotóxicas, o que em conjunto afeta a capacidade das células T CD8⁺ de contribuir para a resposta imune protetora (GAUTAM *et al.*, 2014).

Em geral, a suscetibilidade à LV está associada à diminuição da imunidade mediada por células T tipo 1, com diminuição dos níveis de IFN- γ e IL-12, e aumento de IL-4 e IL-10. A LV também é caracterizada pela ativação policlonal de células B, e o aparecimento de sintomas clínicos depende de um balanço entre a carga parasitária e a resposta mediada por células (KAYE; SCOTT, 2011).

Como mencionado anteriormente, o controle da infecção na LV depende de uma resposta imune mediada por células bem-sucedida com altos níveis de IFN- γ e IL-12 que resultam na ação microbicida mediada por óxido nítrico (BACELLAR *et al.*, 2000). Adicionalmente, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), uma citocina crucial da cascata inflamatória, é fundamental para o controle inicial da infecção com *L. donovani* e resolução durante LV experimental (TUMANG *et al.*, 1994). Uso de bloqueadores de TNF- α resultam em reativação da doença com apresentações atípicas (BOSCH-NICOLAU *et al.*, 2019). Por outro lado, na susceptibilidade a LV, citocinas como IL-27 e IL-21 têm sido associadas à expansão de células produtoras de IL-10 no baço de pacientes com a doença, contribuindo com os efeitos supressivos da resposta imune mediados por esta citocina (ANSARI *et al.*, 2011; NYLÉN; SACKS, 2007).

Em camundongos, nas semanas iniciais após infecção via intravenosa, os parasitas se multiplicam rapidamente no fígado. No fígado, as principais células

infectadas pelo parasito são as células de Kupffer, que são os macrófagos residentes no tecido hepático. A eliminação dos parasitas nesse órgão, em grande parte se deve à formação de uma resposta granulomatosa (LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014; POULAKI; PIPERAKI; VOULGARELIS, 2021). As células T natural killers invariantes (iNKT) desempenham papel importante na formação inicial do granuloma. Essas células reconhecem moléculas de lipofosfoglicano (LPG), presentes abundantemente na superfície dos parasitos, através do receptor de célula T (TCR). Esse reconhecimento desencadeia a produção precoce de IFN- γ . Além disso, as células iNKT secretam várias citocinas e quimiocinas, como CXCL-10, o que promove a atração de células T, assim como a maturação de granulomas. Os granulomas são formados por um núcleo central de células de Kupffer envolto por um anel externo de linfócitos T e outras células do sistema imune. O granuloma permite a concentração local de citocinas inflamatórias, que melhoram a ativação de mecanismos leishmanicidas nas células de Kupffer incluindo a produção de ROS e NO (FALEIRO *et al.*, 2014).

Ainda no granuloma, a IL-12 produzida por macrófagos ativados induz a produção de IFN- γ por células linfoides presentes na estrutura, aumentando a resposta contra os parasitos. O TNF- α também desempenha papel importante na regulação inicial da montagem dos granulomas (KAYE *et al.*, 2004). Os granulomas hepáticos alcançam sua maturação completa em torno de 2 a 4 semanas após a infecção e, até a oitava semana de infecção, a carga parasitária reduz significativamente. Apesar do fígado controlar bem a infecção, é importante salientar que não há uma completa resolução. Acredita-se que parasitas residuais no fígado possam ativar uma resposta imune duradoura, o que pode fornecer proteção a longo prazo contra reinfecções (STANLEY; ENGWERDA, 2007).

Em contraste ao que acontece no fígado, a infecção no baço de camundongos não é auto-resolutiva, pois a resposta imune local não consegue eliminar os parasitos e, com a persistência desses no baço, a infecção se torna crônica (KAYE *et al.*, 2004). Após a infecção via intravenosa, grande parte dos parasitas inoculados (95%) são fagocitados por 3 subpopulações de macrófagos presentes no baço, os macrófagos da polpa vermelha, macrófagos da zona marginal (MZM) e macrófagos metalofílicos marginais (MMM) (GORAK; ENGWERDA; KAYE, 1998). O fator regulador de interferon- γ participa na regulação da morte de *L. donovani*, sobretudo no fagossomo de macrófagos MMMs e MZMs infectados pelo parasito. Além disso, o

controle do parasito nesses macrófagos pode envolver outros mecanismos que não dependem de NO (PHILLIPS *et al.*, 2010). Após essa infecção inicial, DCs maduras chegam à bainha linfóide periarteriolar e produzem IL-12 dando início à resposta de células T. As DCs podem fagocitar restos de parasitas presentes na zona marginal ou fagocitar macrófagos contendo parasitas. Durante a infecção, o baço passa por um processo de desorganização da sua arquitetura. Inicialmente, a polpa branca esplênica apresenta-se com folículos linfóides aumentados, no entanto, à medida que a doença progride, esses folículos são rompidos, fazendo com que se perca os limites dos compartimentos de polpa branca, onde a zona marginal (ZM) se torna menos evidente (HERMIDA *et al.*, 2018). Nas formas graves de LV, o baço apresenta atrofia da polpa branca, e pode-se observar a presença de plasmócitos que substituem as populações residentes da polpa vermelha (HERMIDA *et al.*, 2018).

A ativação de células T CD4⁺ pode ser detectada no primeiro dia pós infecção e o *pool* de células T CD4⁺ específicas contra o parasita aumenta durante as primeiras semanas, o que contribui para o surgimento da esplenomegalia. A sinalização de IL-12 em células T CD4⁺ promove a translocação de STAT4 para o núcleo e culmina na indução do fator de transcrição *T-bet* e regulação positiva do receptor de IL-12 para iniciar a diferenciação dessa célula para o perfil Th1 (STANLEY; ENGWERDA, 2007). Na fase aguda da infecção, o baço consegue eliminar os parasitas, porém com o decorrer das semanas a resposta imune já não é suficiente para eliminar o parasita. Na terceira semana após a infecção, a carga parasitária no baço começa a aumentar, o que sinaliza para o início da fase crônica da doença (FALEIRO *et al.*, 2014).

A sobrevivência do parasita depende de mecanismos de evasão do sistema imune, como por exemplo pela modulação da atividade microbicida de macrófagos por meio da produção de TGF- β com inibição da ação de IFN- γ , diminuição na expressão de moléculas de MHC classe II e diminuição da produção de NO. Como mencionado anteriormente, a IL-10 produzida por macrófagos também contribui para sobrevivência de *Leishmania* pela inibição da produção de citocinas como IL-1b, IL-6, IL-8 e TNF- α , assim como reduz a função de APC dessas células (MONTES DE OCA; ENGWERDA; KAYE, 2020).

1.5 Desnutrição

A OMS define a desnutrição como uma deficiência, excesso, ou desequilíbrio no consumo de energia e/ou nutrientes específicos em relação às necessidades de um indivíduo. O termo “desnutrição” abrange dois grupos com condições totalmente distintas, onde uma das condições é a subnutrição e a outra é o sobrepeso/obesidade. Com relação à subnutrição, pode se apresentar de duas formas clássicas: (i) desnutrição proteico-calórica, quando não há consumo suficiente de comida e como consequência, há menor peso em relação à altura corporal e/ou menor altura em relação à idade e está associada com o aumento de risco de contrair doenças infecciosas; (ii) desnutrição por micronutrientes, quando há deficiência de vitaminas e/ou minerais específicos na dieta (WHO, 2021);

A desnutrição afeta todos países, e estima-se que 462 milhões de adultos no mundo estão desnutridos ao passo que na população infantil com idade inferior a 5 anos, esse número chega a 195 milhões (WHO, 2021). Outro dado alarmante mostra que ~45% das mortes de crianças menores de 5 anos estão relacionadas à desnutrição, sendo esse impacto maior em países mais pobres (WHO, 2021). De acordo com relatório da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), o continente Africano continua liderando na taxa de prevalência de indivíduos subnutridos no mundo representando cerca de 19,1%, seguido do continente Asiático e do continente Latino Americano (8,3 e 7,4%, respectivamente) (FAO, 2020) (Figura 1.3).

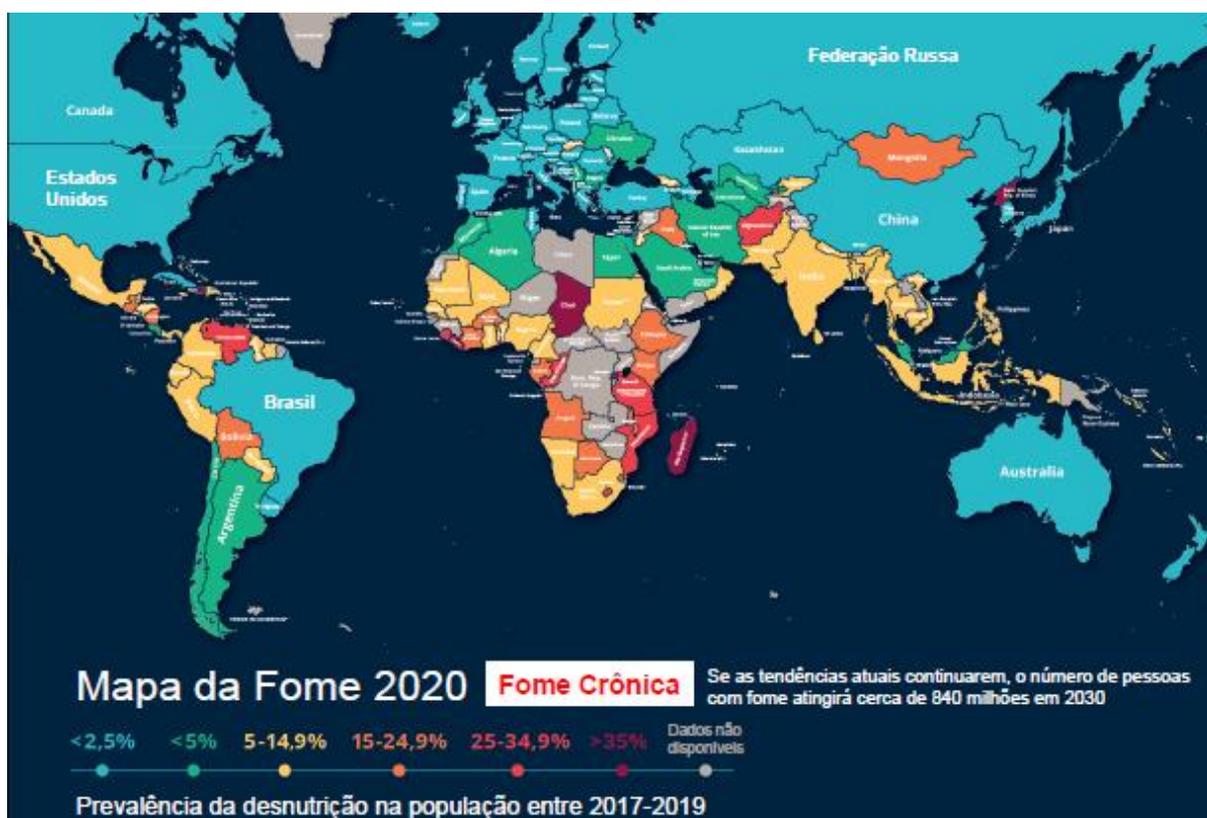


Figura 1.3- Prevalência da desnutrição no mundo. A figura mostra o mapa da fome no mundo elaborado pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação com os dados de prevalência da fome de 2017 a 2019. Os números de 2020 não estão considerados nesse mapa. Desde 2014 e até 2019 o Brasil estava fora desse mapa, mas dados indicam que país voltou ao mapa em 2021. Tomado de: (FAO,2020).

De acordo com a FAO, muito antes da pandemia de COVID-19, o mundo já estava longe de cumprir o compromisso de acabar com a fome e a desnutrição em todas as suas formas até 2030. Agora a pandemia tornou isso mais difícil. A avaliação global da insegurança alimentar e desnutrição para 2020 mostra que a fome mundial aumentou e a prevalência da desnutrição (PoU) subiu mais 4% em apenas um ano. O relatório da FAO calcula que entre 720 e 811 milhões de pessoas no mundo passaram fome em 2020, aumentando em cerca de 161 milhões o número de pessoas que passaram fome em comparação a 2019. Na América Latina e no Caribe foram afetadas pela fome em 2020 14 milhões de pessoas a mais do que em 2019 (FAO, 2021). Cerca de 12% da população mundial (~1 bilhão de pessoas) sofreu de insegurança alimentar grave em 2020. A pandemia aumentou a prevalência das diferentes formas de desnutrição no mundo e calcula-se que seus efeitos serão duradouros, como já visto em 2021. A desigualdade de renda é uma das principais causas da PoU (FAO, 2021). Contudo, o índice de desnutrição

calculado com base no PoU pela FAO não é o mais adequado para aferir realidade dos brasileiros.

Dados do Inquérito Nacional sobre Insegurança Alimentar no Contexto da Pandemia da Covid-19 no Brasil, elaborado pela Rede Brasileira de Pesquisa em Soberania e Segurança Alimentar e Nutricional - Penssan, mostram que o Brasil retrocedeu 15 anos em cinco, voltando a ter a fome como problema estrutural. Os resultados desse inquérito mostram que, em 2020, a Insegurança Alimentar e a fome no Brasil retornaram aos patamares próximos aos de 2004 (Figura 1.4). O sucesso, obtido entre 2004 e 2013, na garantia do direito humano à alimentação adequada e saudável foi anulado para parcela significativa da população brasileira a partir de 2014 e a insegurança alimentar grave aumentou em 27,6% ao ano entre 2018 e 2020 (REDE PENSSAN, 2021).

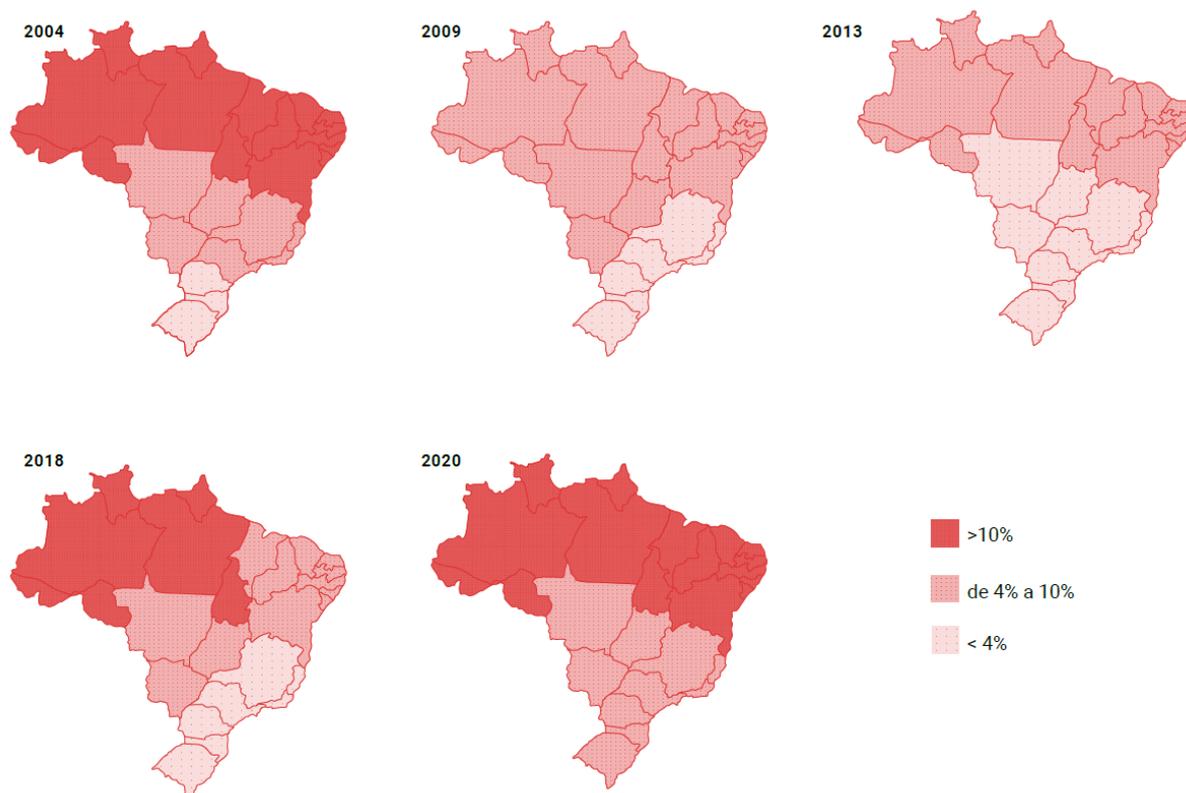


Figura 1.4- Evolução da fome no Brasil: porcentagem da população afetada pela insegurança alimentar grave entre 2004 e 2020 - macrorregiões. A figura mostra que, em 2020, a Insegurança Alimentar e a fome no Brasil retornaram aos patamares próximos aos de 2004. Fonte: Dados reanalisados para a escala de oito itens, a partir das pesquisas: [1] Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios 2003-2004 (IBGE); [2] Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios 2008-2009 (IBGE); [3] Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios 2013-2014 (IBGE); [4] Pesquisa de Orçamentos Familiares 2017-2018 (IBGE); [5] VigiSAN Inquérito SA/IA – Covid-19, Brasil, 2020. Tomado de: Relatório sobre Insegurança Alimentar e Covid-19 no Brasil, 2021. Disponível em: http://olheparaafome.com.br/VIGISAN_Inseguranca_alimentar.pdf.

Entre as diferentes formas de desnutrição, a desnutrição proteico-calórica, que é basicamente o resultado da falta de comida, é um grave problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, sendo responsável por mais de 50% de mortalidade na população infantil menor de 5 anos (MALAFAIA, 2009).

1.5.1 Efeitos da desnutrição proteico-calórica na imunidade

Notavelmente, existe uma relação dinâmica entre infecção, nutrição e imunidade (BRUNETTO et al., 2007). A desnutrição é uma doença de caráter sistêmico que afeta diversos órgãos incluindo órgãos linfoides primários e secundários, e em consequência, prejudicando o sistema imunológico dos indivíduos, principalmente de crianças que não possuem o sistema imune completamente formado. Com essa imunossupressão, infecções oportunistas são favorecidas, e as doenças assim adquiridas resultam em perda de energia que culmina em um déficit no aprendizado e produção reduzida que geram pobreza e consequentemente insegurança alimentar e violência, alimentado assim o ciclo vicioso entre desnutrição, infecção e imunidade (SCHAIBLE & KAUFMANN, 2007) (Figura 1.5).

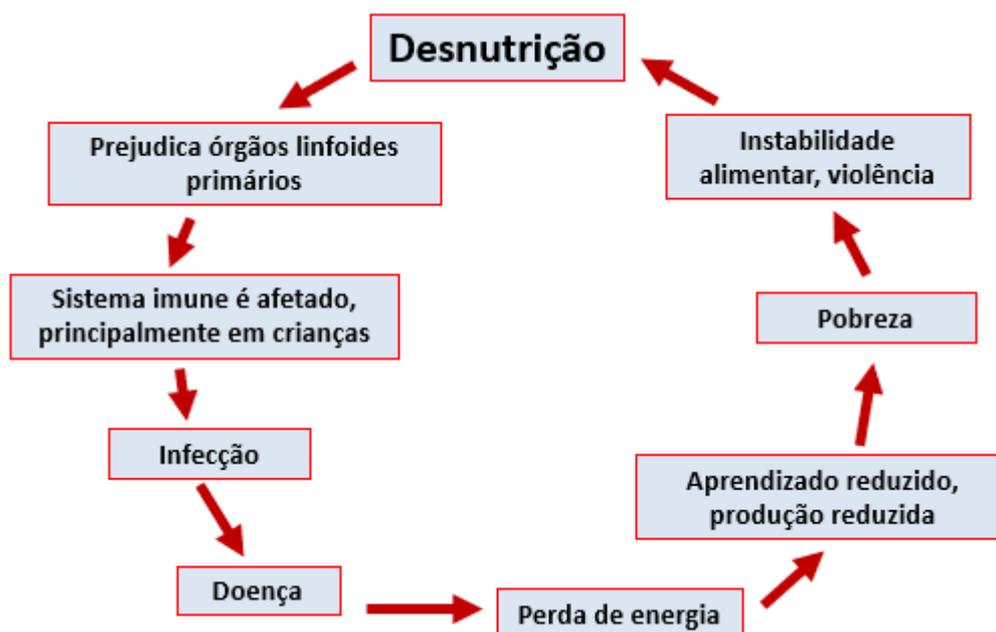


Figura 1.5. Relação entre a desnutrição, imunidade e infecção. O esquema mostra a relação entre a desnutrição, infecção, pobreza. Adaptado de: SCHAIBLE; KAUFMANN, 2007.

Os efeitos da desnutrição proteico-calórica tendem a ser tecido-específicos e podem também ser generalizados caso a desnutrição não seja revertida. Grandes períodos de privação alimentar acarretam uma alta nos processos catabólicos devido a mobilização de aminoácidos que são utilizados na síntese de DNA, RNA e de proteínas (KLASING, 2007). A resposta a infecções também demanda esses processos para proliferação celular e síntese de moléculas envolvidas na resposta imune. Tendo em vista que a resposta imune é totalmente dependente da replicação celular e da síntese de compostos proteicos ativos, a desnutrição claramente tem um efeito negativo sobre a imunidade. Assim, a desnutrição é uma das causas mais frequentes de deficiência imune secundária e de consequente susceptibilidade para infecções em humanos (SCHAIBLE & KAUFMANN, 2007).

1.5.2 Desnutrição e Leishmaniose Visceral

A desnutrição proteico-calórica é reconhecida e apontada pela OMS como um fator de risco para o desenvolvimento de formas graves da LV (CERF *et al.*, 1987; WHO, 2010). Além disso, muitos autores mencionam que o déficit nutricional afeta diversos mecanismos imunológicos como a função fagocítica, e a produção de anticorpos e citocinas (SCHAIBLE & KAUFMANN, 2007; MALAFAIA, 2009; CARRILLO *et al.*, 2014; PAE & WU, 2017). Em um inquérito epidemiológico nos hospitais do município de Campo Grande – MT, foi observado que nos casos de LV em adultos que evoluíram a óbito, 32,7% dos pacientes apresentavam desnutrição como a principal comorbidade (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Esses dados confirmam que a desnutrição é um fator de risco para o desenvolvimento da LV tanto em crianças como em adultos (DIRO *et al.*, 2015; MENGESHA *et al.*, 2014).

Em estudos utilizando modelo de desnutrição e infecção com *L. donovani* verificou-se que a desnutrição levou a uma falha na função de barreira dos linfonodos e por consequência antecipou a visceralização do parasito (ANSTEAD *et al.*, 2001). Além disso, em camundongos desnutridos e infectados com *L. donovani* foi observado que a visceralização precoce é devida à redução de células fagocíticas nos linfonodos (IBRAHIM *et al.*, 2013). Também foi encontrada uma redução no número de células dendríticas residentes da pele drenadas para os

linfonodos satélites, assim como desregulação na expressão de quimiocinas e receptores envolvidos na migração das DC para os linfonodos (IBRAHIM *et al.*, 2014).

Utilizando um modelo de desnutrição proteica e infecção com *L. infantum* em hamsters foi verificado que os animais que receberam dietas hipoproteicas apresentaram no hemograma um número de reduzido de monócitos, granulócitos e linfócitos, especialmente, linfócitos TCD4⁺ e linfócitos B (CARRILLO *et al.*, 2014). Outro estudo utilizando modelo de desnutrição proteico-calórica demonstrou que camundongos desnutridos imunizados com antígeno de *L. chagasi* associado a saponina, quando desafiados, apresentaram carga parasitária aumentada no baço quando comparados com animais que receberam dieta controle e foram imunizados com o mesmo antígeno com saponina, mostrando o impacto da desnutrição na resposta imune (MALAFAIA *et al.*, 2009). Em outro trabalho, foi observado que camundongos BALB/c desnutridos e infectados com *L. chagasi*, após 4 semanas de infecção apresentaram redução no peso do fígado e baço, e isso era acompanhado por aumento da carga parasitária esplênica. Ademais, os animais desnutridos e infectados apresentavam alterações em parâmetros bioquímicos como concentração de glicose e albumina. Quando esses animais foram desafiados com antígeno de *L. chagasi*, a produção de IFN- γ por células do baço era significativamente menor em relação aos camundongos do grupo controle (SERAFIM *et al.*, 2010).

A partir de analogia da classificação antropométrica de desnutrição humana, Anstead e colaboradores propuseram uma escala murina de desnutrição baseada no peso para idade. Nessa escala, o peso dos camundongos desnutridos foi dividido pelo peso esperado baseado nos camundongos que receberam a dieta controle, e o produto dessa divisão foi multiplicado por 100%. De acordo com essa escala, quando o percentual de peso esperado fica entre 75% a 90% é considerado uma desnutrição leve, caso esse percentual fique entre 60% a 75%, a desnutrição é considerada moderada e quando menor que 60% a desnutrição é considerada grave (ANSTEAD *et al.*, 2001).

1.5.3 Efeitos da desnutrição em órgãos linfoides

Devido à sua ação sistêmica, a desnutrição afeta diversos órgãos, especialmente órgãos linfoides como timo, baço, e medula óssea. Nosso grupo, interessado em entender os efeitos da desnutrição proteica no curso da infecção e

resposta imune na LV, estabeleceu um modelo de desnutrição proteica e infecção com *L. infantum* o qual tem permitido descrever alguns mecanismos celulares e moleculares dos efeitos da desnutrição sobre o timo e o baço (CUERVO-ESCOBAR *et al.*, 2014) e como eles incidem na resposta ao parasito. No timo, em particular, observamos que camundongos desnutridos apresentaram drástica atrofia tímica traduzida em significativa perda de peso do órgão e reduzida celularidade, principalmente devida à diminuição da população de células T duplo positivas, somada a alterações significativas nas subpopulações T CD4⁺ e CD8⁺ (CUERVO-ESCOBAR *et al.*, 2014). Também observamos que os níveis de quimiocinas e citocinas tais como CCL5, CXCL12, CXCL9, CXCL10, IL-1 e IL-10 estavam significativamente reduzidas nos timos desses animais, sugerindo defeitos na migração celular intratímica. Contudo, ensaios funcionais mostraram que a capacidade de migração *ex vivo* dos timócitos em resposta a estímulos quimiotáticos estava preservada, sugerindo que o microambiente tímico dos animais desnutridos e infectados, e não a capacidade migratória das células *per se*, é particularmente comprometido pela desnutrição (LOSADA-BARRAGÁN *et al.*, 2017). Interessantemente, identificamos a presença do parasita no timo infectando células nesse microambiente (LOSADA-BARRAGÁN *et al.*, 2017). Essas alterações correlacionaram-se positivamente com uma carga parasitaria esplênica precocemente aumentada nesses animais e com uma diminuição de citocinas pró-inflamatórias no soro. Esses resultados nos estimularam a estudar dos efeitos deletérios da desnutrição sobre no microambiente tímico e suas consequências na resposta à infecção com *L. infantum*, tema desta dissertação, e por essa razão nas seguintes secções serão descritas em mais detalhes algumas das características desse órgão linfoide.

1.6 Timo

O nome da glândula timo é derivado da palavra grega *θυμός* (thumos), que significa “alma”, e durante séculos acreditou-se que a alma estava localizada nesta parte do corpo (ZDROJEWICZ; PACHURA; PACHURA, 2016). O timo é um órgão linfoide primário, no qual os precursores hematopoiéticos derivados da medula óssea entram em processo de diferenciação que resulta na geração de células T $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ maduras. Após seleção, maturação e desenvolvimento, as células maduras

sairão do timo para colonizar órgãos linfoides secundários, onde proverão imunidade contra antígenos específicos (ALBANO *et al.*, 2019).

O timo é um órgão bilobado situado no mediastino anterior; onde cada lobo é dividido em diversos lóbulos por septos fibrosos e cada lóbulo, por sua vez, é dividido em duas regiões bem distintas: o córtex, onde se encontram os linfócitos T em diferenciação, e a medula, onde são encontrados os linfócitos maduros (SAVINO & DARDENNE, 2010). Esse órgão linfoide primário se desenvolve e cresce até os 3 anos de idade. Após atingir seu peso máximo, o timo involui, a partir da adolescência, devido à influência dos hormônios sexuais presentes na circulação sanguínea. A involução tímica é um dos fatores mais importantes que contribui para redução da resposta imune com o passar da idade. Esse processo contribui para um declínio na produção de células T indiferenciadas, que culmina em um limitado repertório de receptores de células T (TCR) (ZDROJEWICZ; PACHURA; PACHURA, 2016). Um terceiro compartimento pode ser encontrado no timo, chamado de espaço perivascular (EVP), esta região é fisicamente separada do epitélio tímico e conforme o envelhecimento tímico, o EVP aumenta e substitui progressivamente o epitélio tímico (FLORES *et al.*, 1999).

Na região cortical encontram-se as células epiteliais corticais (cTEC), as quais secretam IL-7, uma importante interleucina requerida para o início do desenvolvimento dos timócitos (TAKAHAMA, 2006). Além disso, as cTECs expressam uma variedade de antígenos próprios que são apresentados pelo complexo MHC, o qual determina a diversidade do repertório de células T através da seleção positiva (ALBANO *et al.*, 2019). Ainda no córtex, encontram-se as células “nurse” do timo (TNCs), que são células epiteliais especializadas, que expressam citoqueratinas 5 e 8. Essas células conseguem incorporar linfócitos em vacúolos citoplasmáticos especializados desempenhando um papel importante no desenvolvimento de células T e restrição de MHC (GUYDEN *et al.*, 2015; NAKAGAWA *et al.*, 2012). A medula tímica contém corpúsculos de Hassall que são células epiteliais reticulares eosinofílicas dispostas concentricamente contendo querato-hialina e feixes de fibras citoplasmáticas (ALBANO *et al.*, 2019; TAKAHAMA, 2006). Essas células se diferenciam das células epiteliais medulares tímicas (mTEC), após a inativação do gene regulador autoimune (AIRE) (ALBANO *et al.*, 2019). As mTEC expressam um conjunto diferente de autoantígenos produzindo um repertório de células T autotolerantes pela seleção negativa de células T

autorreativas que se ligam com alta afinidade aos autoantígenos (WATANABE *et al.*, 2005). Outras células também são encontradas no timo como células B, células NK, células iNKT, macrófagos, células dendríticas do tipo I e do tipo II. No quadro 1.2 estão sumarizadas algumas das populações de células presentes no microambiente tímico.

Quadro 1.2- Tipos celulares presentes no timo. Adaptado de ALBANO *et al.*, 2019.

| Tipo celular | Fenótipo |
|--|--|
| Macrófagos Dendríticos | CD45 ⁺ , F4/80 ⁺ , Mac-2 ⁺ |
| Células Dendríticas do Tipo 1 | CD11c ^{high} , MHC II ⁺ , CD45RA ⁻ , CD8α ⁺ |
| Células Dendríticas do Tipo 2 | CD11c ^{high} , MHC II ⁺ , CD45RA ⁻ , SIRP α ⁺ |
| Células NK | CD127 ⁺ |
| Células B | CD19 ⁺ |
| cTEC | CD45 ⁻ , EpCAM ⁺ , Ly51 ⁺ , K8 ⁺ , K5 ⁻ , K14 ⁻ |
| mTEC | mTECsCD45 ⁻ , EpCAM ⁺ , Ly51 ^{-low} , CD80 ^{high} , K8 ⁻ , K5 ⁺ , K14 ⁺ |
| Célula “nurse” do timo | K5 ⁺ , K8 ⁺ , pH91 ⁺ |
| Célula iNKT | CD1d-restrito às células NK |
| Células Duplo Positivas | CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺ |
| Células Duplo Negativas 1 | CD44 ⁺ CD25 ⁻ |
| Células Duplo Negativas 2 | CD44 ⁺ CD25 ⁺ |
| Células Duplo Negativas 3 | CD44 ⁻ CD25 ⁺ |
| Células Duplo Negativas 4 | CD44 ⁻ CD25 ⁻ |
| Células Simples Positivas CD4⁺ | CD3 ⁺ , CD4 ⁺ |
| Células Simples Positivas CD8⁺ | CD3 ⁺ , CD8 ⁺ |

1.6.1 Desenvolvimento de linfócitos T no timo

Existem pelo menos dois modos de entrada de células T progenitoras ao timo para iniciar o seu desenvolvimento: (i) uma via que independe de vascularização, a qual provavelmente ocorre durante estágios iniciais da embriogênese; e (ii) uma via dependente de vascularização, que ocorre nas fases finais da embriogênese e no período pós-natal (TAKAHAMA, 2006). As células progenitoras linfoides oriundas da medula óssea entram no timo através da junção córtico-medular, sendo a partir desse momento chamadas de timócitos duplo negativos (DN), pois ainda não expressam os co-receptores CD4 e CD8, nem o receptor de célula T (TCR). Em seguida, esses timócitos DN migram pelo córtex em direção à região subcapsular do

timo. Durante essa etapa, o processo de migração dos timócitos DN é regulado por sinais de receptores de quimiocinas CXCR4 e CCR7 (KONDO; OHIGASHI; TAKAHAMA, 2018). O CXCR4 é um receptor de quimiocina expresso na membrana de timócitos DN responsável pela migração desses timócitos da junção córtico-medular para região subcapsular do córtex, enquanto seu ligante, CXCL12, é produzido e secretado por cTECs. Outros receptores e ligantes também estão envolvidos nessa migração, como é o caso de CCR9 e CCL25, sendo o receptor expresso em timócitos DN2-DN3 e o seu ligante produzido por cTECs. Além destes, o receptor CCR7 (expresso em timócitos DN) e seus ligantes CCL19 e CCL21 (produzidos por cTECs), mas em menor quantidade, parecem estar envolvidos nessa migração para região mais externa do córtex (TAKAHAMA, 2006).

Durante essa migração na área cortical, os timócitos DN sofrem quatro estágios de diferenciação: DN1 (CD44⁺CD25⁻), DN2 (CD44⁺CD25⁺), DN3 (CD44⁻CD25⁺), DN4 (CD44⁻CD25⁻). No decorrer do estágio DN2 inicia-se o processo de recombinação do receptor de célula T (TCR), sendo formados inicialmente os timócitos com linhagem $\gamma\delta$. Enquanto isso, na etapa posterior (DN3) ocorre a recombinação V-DJ do locus da cadeia β do TCR, onde culmina na expressão de um pré-TCR (KOCH; RADTKE, 2011). A partir desse momento ocorre a seleção que consiste na indução de apoptose das células que apresentam um rearranjo inadequado do TCR, selecionando positivamente as células que obtiveram êxito durante o processo de recombinação do TCR (LESCALE & DERIANO, 2017). Essas células que conseguiram sobreviver a esse processo deixam de expressar o receptor CD25, o que caracteriza a subpopulação DN4. Em seguida, os timócitos DN4 se diferenciam em células T Duplo Positivas (DP), que expressam concomitantemente os co-receptores CD4 e CD8 e iniciam sua migração para a região medular tímica em resposta às quimiocinas CCL19 e CCL21 secretadas pelas mTECs.

Durante a migração para medula, na junção cortiço medular, as células DP interagem com células estromais, as quais são responsáveis por apresentar peptídeos complexados a proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (THAPA; FARBER, 2019). Nessa etapa ocorre novamente uma nova seleção, sendo denominada de seleção positiva, onde sobrevivem os timócitos que reconhecem com baixa afinidade os peptídeos presentes no complexo MHC das células epiteliais corticais. Caso o timócito reconheça um MHC do tipo I, o timócito

deixa de expressar CD4, passando a ser uma célula T simples positiva (SP) CD8⁺. No entanto, se o timócito reconhece um MHC do tipo II, ele deixa de expressar CD8, passando a ser uma célula T simples positiva (SP) CD4⁺(TAKAHAMA, 2006).

As células SP aumentam a expressão de CCR7, receptor que responde a estímulo quimiotático produzido na medula pelas células mTECs (quimiocinas CCL21, CCL19) e, portanto, as células SP migram para essa região. Ainda na região medular, é observado um subtipo celular de células tímicas epiteliais medulares (mTEC), que possuem a função especial de apresentar antígenos próprios para as células T em desenvolvimento e na deleção de células T autorreativas, sendo, assim, responsáveis pelo fenômeno de autotolerância do sistema imune, impedindo então o escape de células T autorreativas para a periferia onde poderiam desencadear processos autoimunes (KOZAI *et al.*, 2017; TAKAHAMA, 2006).

As mTECs conseguem expressar antígenos próprios tanto do timo como de outros tecidos. Elas realizam esse processo por meio do gene AIRE que controla a expressão de vários antígenos próprios. As células T que conseguem sobreviver a esse fenômeno de seleção negativa passam a expressar o receptor de esfingosina-1-fosfato do tipo 1 (S1P₁), caracterizando a célula como um linfócito T maduro (BAEYENS *et al.*, 2015). S1P₁ é um receptor de superfície acoplado à proteína G que regula a migração de timócitos maduros para periferia mediante o gradiente de um esfingolípido presente no sangue, a esfingosina-1-fosfato (S1P) (ALLENDE *et al.*, 2004), o que acaba resultando na saída de células T SP maduras que serão responsáveis por povoar os órgãos linfoides secundários, como baço e linfonodos (Figura 1.6).

Tem sido reportado que após o amadurecimento e saída das células T SP existe um fenômeno de re-circulação de linfócitos através do timo (PABST, 2019). Diversas observações, em diferentes espécies, da entrada de linfócitos T periféricos ao timo bem como de linfócitos B, têm levantado a hipótese de que o timo além de ser um órgão linfoide primário, está bem integrado no tráfego de linfócitos (PABST, 2019). Um possível significado fisiológico para essa re-entrada no timo poderia ser que os antígenos presentes nas células T migrantes possam contribuir para indução da tolerância adquirida a antígenos estranhos, especialmente a aloantígenos (SPRENT; SURH, 2009).

O tráfego de linfócitos entre sangue e os tecidos linfoides secundários e vice-versa se faz importante para respostas imunes adequadas (KRÜGER; MOOREN,

2007). Esse tráfego permite então o contato entre as células de defesa com peptídeos antigênicos em órgãos linfoides secundários. A transmigração dessas células ocorre através da interação da célula T com mediadores presentes no endotélio. Inicialmente acontece o rolamento dessas células por interações com proteínas da família das selectinas, a E-selectina (CD62E), P-selectina (CD62P) e a L-selectina (CD62L), sendo os dois primeiros presentes em células endoteliais, enquanto a L-selectina está presente na membrana de linfócitos T maduros. O próximo passo envolve a adesão firme dos linfócitos por integrinas (KRÜGER; MOOREN, 2007).

Uma vez que o patógeno tenha sido processado por células apresentadoras de antígeno (APCs) residentes do tecido periférico, estas células apresentam os peptídeos antigênicos para as células T naive que conseguiram migrar do sangue para o tecido (KRÜGER; MOOREN, 2007). Nesse momento ocorre então o primeiro contato que dará origem a uma célula T efetora ativada. Há 3 sinais importantes para ativação da célula T, o primeiro sinal envolve a interação entre o TCR do linfócito T com o complexo peptídeo+MHC da célula dendrítica (DC). No segundo sinal ocorre transcorre outra interação que é considerada como co-estimulatórias, como CD80/CD86 com o CD28 da célula T (ABBAS et. al 2015). Enquanto isso, no terceiro sinal, com o reconhecimento do antígeno pelos linfócitos T, ocorre a expressão de CD40L, sendo esse marcador ligante do receptor CD40 nas APCs tornando essas células mais competentes em realizar a ativação de células T (ABBAS et. al 2015).

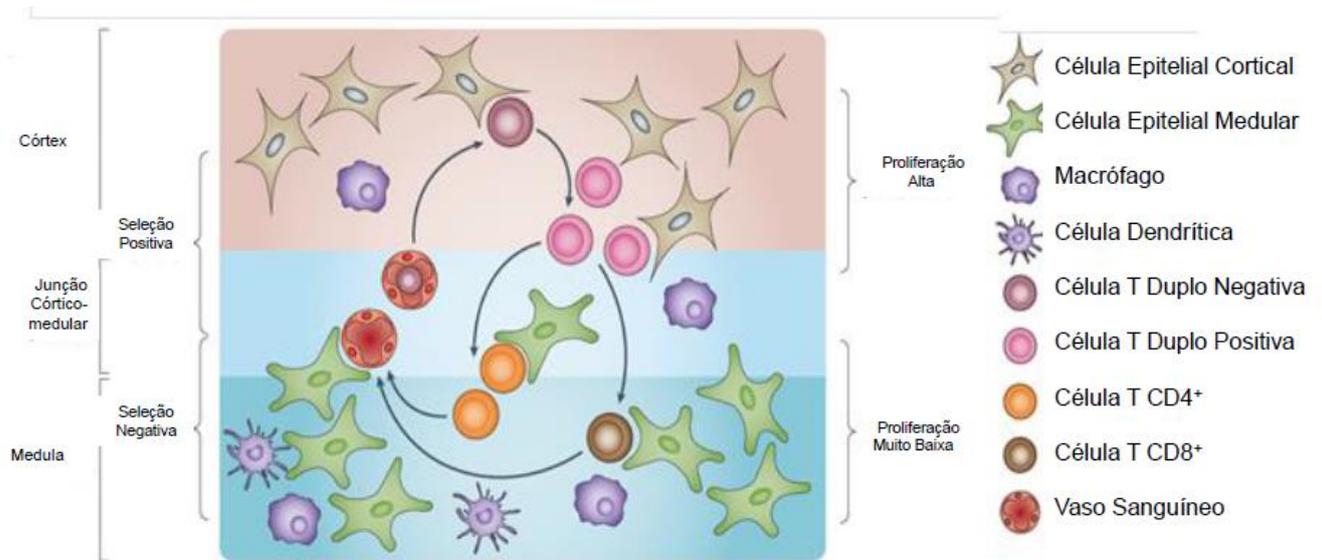


Figura 1.6- Estágios de desenvolvimento de linfócitos T no timo. As células progenitoras oriundas da medula óssea entram no timo por meio dos vasos presentes na junção córtico-medular, onde passam a ser chamadas de tímócitos duplo negativos (DN). Durante sua migração pelo córtex se diferenciam em estágios DN1, DN2, DN3 e DN4 sendo diferenciadas pela expressão de receptores CD44 e CD25. No estágio DN3 acontece a expressão da cadeia β do receptor de célula T, progredindo para o desenvolvimento de células T duplo positivas (DP). Após a seleção positiva, as células que agora são simples positivas (SP, CD4⁺ ou CD8⁺) migram para a medula onde serão novamente selecionadas através da seleção negativa para exclusão dos linfócitos que reconhecem antígenos próprios, ou seja, células autorreativas. As células que sobreviveram a esta última seleção passam a expressar o receptor de esfingosina-1-fosfato do tipo 1 (S1P₁) e migram para periferia mediante o gradiente de concentração do ligante (S1P) no sangue. Adaptado de: (SAVINO *et al.*, 2016).

1.6.2 Microambiente tímico

O desenvolvimento dos tímócitos ocorre à medida que as células migram nos lóbulos tímicos e essa migração acontece a partir da interação das células com distintos componentes estruturais e moleculares do microambiente tímico. Esse microambiente é formado por células epiteliais tímicas (TEC), componentes de matriz extracelular (MEC), macrófagos, células dendríticas e fibroblastos, metaloproteínas, citocinas, quimiocinas e outras proteínas solúveis (GAMEIRO *et al.*, 2010).

O microambiente tímico controla os processos de maturação, proliferação, diferenciação e seleção positiva e negativa das células T. A correta migração dos tímócitos depende, além das quimiocinas, da interação com componentes da MEC, como fibronectina, laminina, e colágeno tipo IV que são secretadas por células estromais do epitélio tímico e que interagem com receptores específicos

expressados por timócitos (COTTA- DE- ALMEIDA VINÍCIUS *et al.*, 2003; GAMEIRO *et al.*, 2010).

Utilizando um modelo de infecção por *Trypanosoma cruzi*, Cotta-de-Almeida e colaboradores observaram um aumento na deposição de fibronectina na matriz extracelular tímica, associado com aumento no percentual de células T imaturas (CD4⁺CD8⁺) no sangue periférico (COTTA- DE- ALMEIDA *et al.*, 2003). Tendo em vista que as interações mediadas por fibronectina e laminina dirigem passos importantes no desenvolvimento de células T no timo, incluindo os eventos de seleção, os autores sugeriram que as células T imaturas não estariam sofrendo apoptose durante o processo de seleção negativa que ocorre na região cortical do timo e estariam saindo imaturas para a periferia (COTTA- DE- ALMEIDA *et al.*, 2003). Além disso, a expressão e deposição de laminina e seus respectivos receptores pode ser modulada também durante a infecção por *T. cruzi* (SAVINO *et al.*, 2015). Também tem sido observado que a MEC tímica em indivíduos desnutridos apresenta mudanças no padrão de expressão de proteínas tanto colágenas, assim como não colágenas (LYRA *et al.*, 1993). Além disso, foi observada uma correlação positiva entre o grau de atrofia tímica com a intensidade de marcação de proteínas de membrana basal (LYRA *et al.*, 1993). Entretanto, o papel dessas moléculas no timo na leishmaniose visceral não tem sido descrito.

As metalopeptidases de matriz (MMPs) compõem uma família de enzimas de degradação da MEC que são encontradas em diversas condições patológicas e fisiológicas (LAGENTE & BOICHOT, 2010). Estas enzimas são classificadas em vários grupos, de acordo com a especificidade do substrato que degradam, os quais incluem: (i) as colagenases (MMP1, MMP8, MMP13) que são capazes de clivar as fibras de colágeno; (ii) as gelatinases (MMP2 e MMP9) que clivam o colágeno tipo IV da membrana basal; (iii) estromelinas (MMP3, MMP10 e MMP11), que são capazes de degradar fibronectina, laminina e proteoglicanos (MORRISON *et al.*, 2009).

Já foi observando o remodelamento da matriz extracelular tímica por aumento de MMPs em outros modelos de infecção, como por exemplo com *Plasmodium berghei* (LIMA *et al.*, 2012). Na leishmaniose visceral canina, tem sido descrito o aumento de MMP2 e MMP9 tanto na pele, como em fluido cerebrospinal dos animais, no entanto, o papel dessas metaloproteinases no timo dos cães não tem sido estudado (MARANGONI *et al.*, 2011; JACINTHO *et al.*, 2018). Em baço de cães

naturalmente infectados com *L. infantum* foi descrito que o aumento da deposição de enzimas envolvidas no remodelamento de matriz extracelular (MMP-9 e ADAM-10) estava associado com a desorganização da polpa branca esplênica que era também acompanhada pelo aumento na deposição de proteínas da MEC (fibronectina, laminina e colágeno) (DA SILVA *et al.*, 2018).

1.7 Justificativa

Devido à sua ação sistêmica, a desnutrição afeta diversos órgãos, especialmente órgãos linfoides como timo, baço, e medula óssea. Nosso grupo, interessado em entender os efeitos da desnutrição proteica no curso da infecção e resposta imune na LV, estabeleceu um modelo de desnutrição proteica e infecção com *L. infantum* o qual tem permitido descrever alguns mecanismos celulares e moleculares dos efeitos da desnutrição sobre o timo e o baço (CUERVO-ESCOBAR *et al.*, 2014) e como eles incidem na resposta ao parasito. No timo, em particular, observamos que camundongos desnutridos apresentaram drástica atrofia tímica traduzida em significativa perda de peso do órgão e reduzida celularidade, principalmente devida à diminuição da população de células T duplo positivas, somada a alterações significativas nas subpopulações T CD4⁺ e CD8⁺ (CUERVO-ESCOBAR *et al.*, 2014). Também observamos que os níveis de quimiocinas e citocinas tais como CCL5, CXCL12, CXCL9, CXCL10, IL-1 e IL-10 estavam significativamente reduzidas nos timos desses animais, sugerindo defeitos na migração celular intratímica. Contudo, ensaios funcionais mostraram que a capacidade de migração *ex vivo* dos timócitos em resposta a estímulos quimiotáticos estava preservada, sugerindo que o microambiente tímico dos animais desnutridos e infectados, e não a capacidade migratória das células *per se*, é particularmente comprometido pela desnutrição (LOSADA-BARRAGÁN *et al.*, 2017). Interessantemente, identificamos a presença do parasita no timo infectando células nesse microambiente (LOSADA-BARRAGÁN *et al.*, 2017). Essas alterações correlacionaram-se positivamente com uma carga parasitaria esplênica precocemente aumentada nesses animais e com uma diminuição de citocinas pró-inflamatórias no soro. Esses resultados nos estimularam a estudar dos efeitos deletérios da desnutrição sobre no microambiente tímico e suas consequências na resposta à infecção com *L. infantum*.

Em estudos anteriores do nosso grupo observamos alterações histopatológicas no timo de animais desnutridos com aumento da região medular em detrimento da região cortical quando comparados com animais controle (LOSADA-BARRAGÁN *et al.*, 2019). Análises proteômicas mostraram que essas alterações estavam acompanhadas por modificação significativa na abundância de fatores solúveis que são secretados via exossomos no microambiente tímico, sugestivo de defeitos na comunicação intratímica mediada por estas microvesículas em animais desnutridos. Além disso, observamos uma significativa redução de moléculas envolvidas em migração e diferenciação celular como galectina-1, fator von Willebrand, Rho GDP-*dissociation inhibitor* 1 e 2, fator de diferenciação 1 e transgelin-2. Além disso observamos aumento de proteínas relacionadas com β -oxidação de ácidos graxos e ciclo de Krebs, sugerindo um microambiente tímico quiescente não proliferativo, o que de fato foi corroborado pela diminuição da detecção de Ki67 nos timócitos (LOSADA-BARRAGÁN *et al.*, 2019). Em conjunto esses resultados compõem um cenário onde fatores estruturais e solúveis do microambiente tímico são afetados pela desnutrição.

Esse cenário descrito acima permitiu elaborar a hipótese abordada nesta dissertação. Propomos que a desnutrição proteica modifica a abundância e distribuição de proteínas de matriz extracelular tímica, prejudicando a correta migração, localização e maturação de linfócitos T, bem como a correta saída de células imunocompetentes para a periferia e colonização de órgãos linfoides secundários, com consecutiva perda do controle da proliferação parasitária no baço, acelerando e agravando o desfecho clínico da LV.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar os efeitos da desnutrição proteica no remodelamento estrutural do microambiente tímico envolvendo moléculas de matriz extracelular e suas consequências na distribuição e localização de subpopulações de linfócitos T no órgão em um modelo murino de infecção com *Leishmania infantum*.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a expressão de componentes de matriz extracelular (MEC) tímica em animais desnutridos e infectados;
- Quantificar a expressão da quimiocina CCL21, e do esfingolípido S1P e seu receptor, S1P₁ envolvidos na migração intratímica e para a periferia de células T maduras;
- Analisar a presença de células T imaturas do timo na periferia;
- Quantificar a carga parasitária no timo;
- Avaliar a presença de células T ativadas no microambiente tímico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado de acordo com as recomendações do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório dos Institutos Nacionais de Saúde de Estados Unidos - Oitava Edição. Além disso, todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Fiocruz (CEUA, licença L-032/18) (Anexo 8.1). A cepa de *L. infantum* utilizada neste trabalho (MCAN/BR/2000/CNV-FEROZ) é mantida pela Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC). De acordo com a Legislação Brasileira de Biodiversidade, esse estudo foi registrado no SisGen (AA2236F).

3.1 Cultura de Parasitos

A cepa MCAN/BR/2000/CNV-FEROZ foi caracterizada e mantida infectiva por passagens em hamster pela CLIOC. Os parasitos foram condicionados a 25 °C em meio bifásico (NNN-Schneider acrescido com 10% de soro fetal bovino, SFB), em seguida foram cultivados a 25 °C em meio líquido Schneider (LGC Biotecnologia®) contendo 10% SFB e coletados na fase estacionária da curva de crescimento a partir de centrifugação a 1800 g por 10 minutos. Posteriormente, os parasitos foram lavados duas vezes com PBS (Sigma®), e por fim foram ressuspensos em PBS e contados na câmara de Neubauer.

3.2 Modelo experimental de desnutrição e infecção

Para realização das análises do presente trabalho foram utilizados camundongos BALB/c machos que foram desmamados aos 21 dias após seu nascimento. Esses animais foram aclimatados durante uma semana ao novo formato e conteúdo nutricional da dieta controle usada no experimento. Nesse período, os camundongos receberam uma dieta com teor de 14% de proteína (MP Biomedicals®, Inc., EUA, Catálogo Nº. 960258). Os camundongos foram mantidos em ciclo luz/escuridão de 12/12h. Na sequência, os animais foram divididos de forma aleatória em 2 grupos: um deles foi alimentado com a dieta controle (CP, *control protein*) e o outro com uma dieta contendo 4% de proteína (MP Biomedicals®, Inc., EUA, Catálogo Nº. 960254) (LP, *low protein*). As duas dietas eram isocalóricas, cada uma fornecendo 3,7 Kcal/g. Vide composição das dietas no Quadro 3.1.

Os camundongos tiveram livre acesso à água e comida. Em seguida, após 7 dias de dieta, cada grupo de animais (CP e LP) foi novamente dividido em dois subgrupos: um deles foi infectado por via intravenosa na veia caudal, com 1×10^7 promastigotas de *L. infantum*, ao passo que o outro recebeu solução salina (PBS). Portanto, foram formados quatro grupos de análise: (i) animais alimentados com 14% de proteína (CP); (ii) animais alimentados com 4% de proteína (LP); (iii) animais alimentados com 14% de proteína e infectados com *L. infantum* (CPi); e (iv) animais alimentados com 4% de proteína e infectados com *L. infantum* (Lpi) (Figura 3.1). A infecção transcorreu durante 14 dias. O peso corporal foi registrado a cada três dias desde o início do experimento, contudo os camundongos foram monitorados diariamente durante os 21 dias do experimento. Após 14 dias pós-infecção, no 21º dia do experimento, os camundongos foram eutanasiados e o timo e o baço foram coletados e processados para serem analisados posteriormente. Foram feitos 2 experimentos independentes cada um com um N total de 24 animais (n=6 por grupo), totalizando 48 animais (12 por grupo).

Quadro 3.1- Composição das dietas isocalóricas fornecidas aos camundongos BALB/c.

| INGREDIENTES | DIETA CONTROLE (14% de proteína) | DIETA BAIXA EM PROTEÍNA (4% de proteína) |
|-------------------------------------|---|---|
| Caseína | 13.79310% | 4.59771% |
| Amido de Milho | 15.00000% | 15.00000% |
| Sacarose | 55.10345% | 63.10345% |
| Óleo de Milho | 4.86207% | 4.95403% |
| Massa não nutritiva Alphacel | 6.24138% | 7.34481% |
| Mistura Mineral AIN-76 | 4.00000% | 4.00000% |

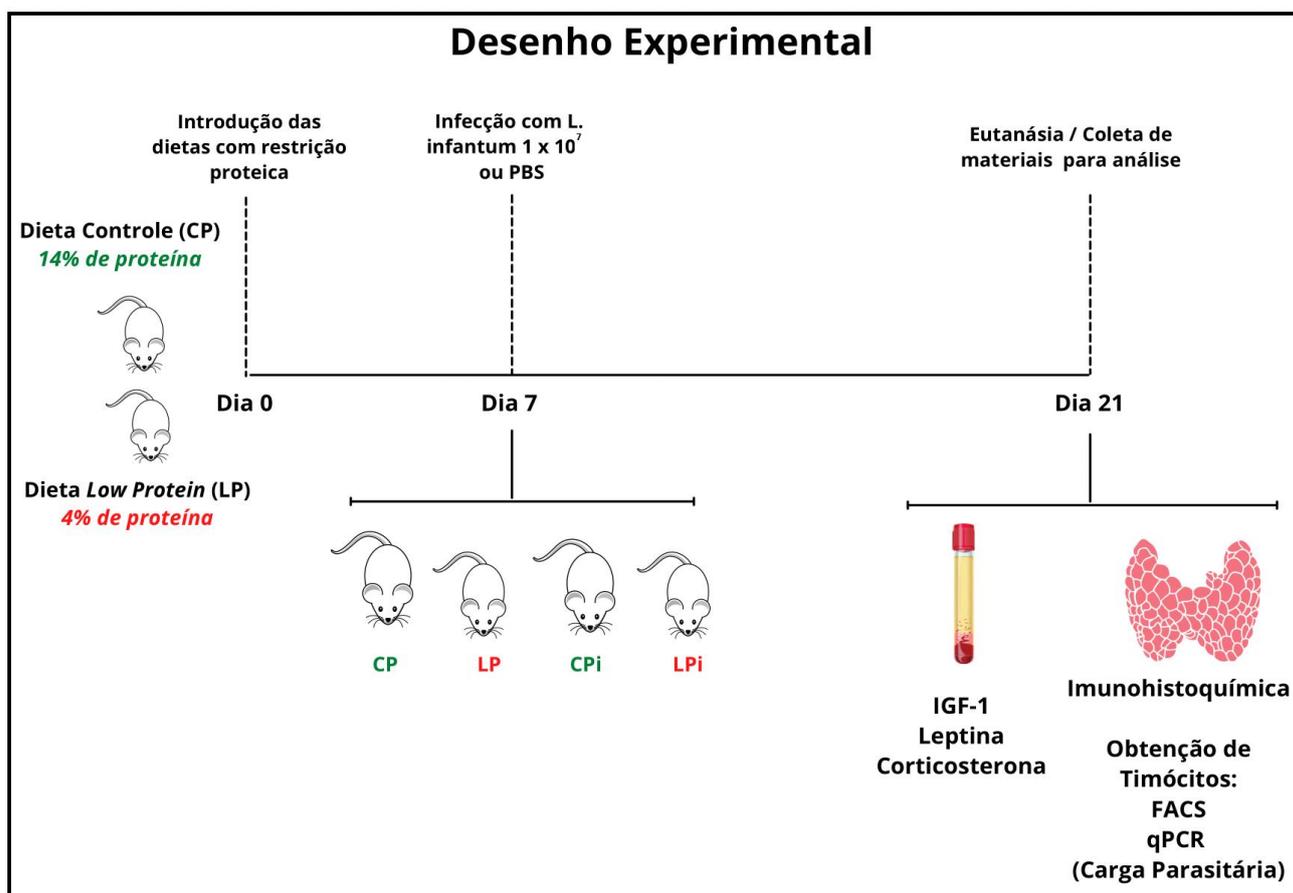


Figura 3.1- Desenho experimental do modelo de infecção e desnutrição. Os camundongos BALB/c machos foram divididos de forma aleatória em 2 grupos: um deles foi alimentado com a dieta controle (14%) e a outra metade recebeu a dieta *low protein* (4%). No 7º dia ocorreu a infecção com dose de 1×10^7 promastigotas de *L. infantum* ou PBS formando 4 grupos de análise (CP, LP, CPi e LPi). No 21º dia ocorreu a eutanásia e coleta do material biológico para os estudos de marcadores hormonais no sangue e de imuno-histoquímica, FACS e qPCR a partir de timócitos. CP: animais alimentados com dieta de 14% de proteína; LP: animais alimentados com dieta de 4% de proteína; CPi: animais alimentados com 14% de proteína e infectados com *L. infantum*; LPi: animais alimentados com dieta de 4% de proteína e infectados com *L. infantum*.

A partir da remoção de cada timo, aferiu-se o peso do mesmo com o auxílio de uma balança de precisão. Logo após a mensuração do peso dos órgãos, esses foram divididos em dois segmentos, o primeiro conservado em meio Tissue-Tek O.C.T.(Sakura®) e armazenado e identificado em compartimento contendo gelo seco, e o segundo fragmento foi depositado em tubo falcon contendo 2 ml de solução PBS+BSA 2% (Sigma) estéril gelada e em seguida os tubos foram preservados em gelo até a extração das células.

3.3 Quantificação de hormônios

Com o intuito de analisar os níveis de hormônios relacionados com desnutrição e, assim, validar o nosso modelo experimental, os níveis de IGF-1 total e

leptina foram medidos no soro dos animais por ensaios de ELISA (R&D Systems, Mineápolis, EUA; Cat. MG100 e MOB00B, respectivamente) de acordo com os protocolos preconizados pela fabricante. Para leitura de absorbância das placas, foi utilizado o equipamento FlexStation III Molecular Devices da plataforma de Bioensaios e triagem de fármacos do IOC. Os ensaios de medição de corticosterona foram feitos em colaboração com o Dr. Vinicius de Frias Carvalho do Laboratório de Inflamação do IOC.

3.4 Quantificação da glicemia dos camundongos BALB/c

No dia da eutanásia foi realizado a coleta de sangue dos animais para dosagem de glicose em sangue periférico. Para isso foi utilizado o Kit Accu-Chek Active® da empresa Roche seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante.

3.5 Análise imuno-histoquímica

Para quantificar e analisar a distribuição de moléculas de matriz extracelular bem como de moléculas envolvidas na emigração de células T maduras foram utilizados ensaios de imuno-histoquímica. Em detalhes, os blocos que continham os fragmentos de timo foram cortados em secções de 5µM e logo em seguida foram montados em lâminas sinalizadas (Starfrost®) e imediatamente foram fixadas por meio de solução de acetona 100% (Merck). Estas lâminas foram processadas pela técnica de imuno-histoquímica como descrito anteriormente (MIRANDA *et al.*, 2011). Resumidamente, após a hidratação em PBS, inibição da peroxidase endógena e inibição de ligações específicas com BSA 0,04% (Merck), os cortes foram incubados com os anticorpos primários para detecção de laminina (1/100), fibronectina (1/100), MMP-10 (1/200) e S1P₁ (1/500) por 18 horas à 4 °C. O controle da reação foi realizado pela supressão do anticorpo primário em pelo menos um dos cortes teciduais. Em seguida, os cortes foram novamente lavados com PBS e submetidos a incubação com anticorpo secundário biotilado anti-IgG de coelho (1/500) e posteriormente com o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (1/500). A revelação foi realizada utilizando o kit AEC® (Invitrogen, Massachusetts, EUA) para as marcações de proteínas de MEC e Kit DAB® (ABCCAM, Cambridge, UK) para marcação de S1P₁ seguindo as recomendações dos fabricantes. A revelação foi realizada acompanhada da visualização da marcação em microscópio de luz, onde a

reação foi interrompida com água destilada. Após isso as lâminas foram montadas utilizando meio de montagem Ultramount® (Dako). Os resultados foram expressos em percentual de área marcada. Foram avaliados no mínimo 5 campos em aumento de 400x tanto na região cortical como na área medular. As marcações foram quantificadas através do programa Image J (NIH, USA).

3.6 Marcação de linfócitos T duplo positivos na medula tímica por imunofluorescência

As lâminas contendo os cortes de timo foram preparadas de maneira semelhante como citado no item 3.5. Em seguida, as lâminas foram hidratadas em PBS e na sequência foi realizado bloqueio das ligações inespecíficas com BSA 0,04% (Merck). Os cortes foram incubados com anticorpos primários anti-CD4 (Bioss Antibodies) e anti-CD8 (GeneTex) por 1 hora à 25 °C. O controle da reação foi realizado pela supressão do anticorpo primário em pelo menos um dos cortes teciduais. Em seguida foram novamente lavados com PBS e submetidos a incubação com anticorpos secundários anti-IgG de coelho e anti-IgG de rato (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA), conjugados com Alexa Fluor 488 e Alexa Fluor 594, respectivamente. Após nova lavagem com PBS, as lâminas foram montadas utilizando meio de montagem Fluoromount-G™ com DAPI (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA). Os resultados foram expressos em número de células positivas por mm². Foram avaliados no mínimo 5 campos em aumento de 400x na região medular.

3.7 Imunofenotipagem de linfócitos T

A quantificação e imunofenotipagem das subpopulações de timócitos e linfócitos T, bem como de linfócitos T efetores foi feita por citometria de fluxo em colaboração com a Dra. Flávia Lima Ribeiro-Gomes e seguindo protocolos previamente descritos (LOSADA-BARRAGÁN *et al.*, 2017). Em resumo, para obtenção dos timócitos foram realizadas lavagens delicadas do timo com injeção de PBS+BSA 2% e massagem com o auxílio de uma pinça. Posteriormente as células foram coletadas por centrifugação, ressuspendidas em PBS+BSA 2% e contadas com auxílio de hemocitômetro.

Para análise de subpopulações de células T no sangue periférico, foram recolhidas alíquotas de sangue dos camundongos, as quais foram submetidas a lise utilizando tampão de lise de hemácias (RBC buffer Lysis) durante 5 min e por fim, foram realizadas lavagens com PBS+Soro Fetal Bovino 5%. Um milhão de células (1×10^6 células) foi usado para marcação com os anticorpos primários conforme o painel de representado na quadro 3.2. A aquisição das células (10.000 eventos) foi realizada no citômetro de fluxo Cytoflex (Beckman Coulter, Califórnia, USA) da Plataforma de citometria de fluxo do IOC. A análise off-line dos dados foi realizada com auxílio do software FlowJo versão 10.0

Quadro 3.2- Painel de anticorpos utilizado para imunofenotipagem de subpopulações de linfócitos T.

| Marcador | Reatividade | Fluorocromo | Fabricante |
|------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| TCRβ | Anti-mouse | PE | Biolegend |
| CD4 | Anti-mouse | Alexa Fluor 700 | Biolegend |
| CD8 | Anti-mouse | PE-Cy7 | Ebioscience |
| CD25 | Anti-mouse | PerCP | Biolegend |
| CD44 | Anti-mouse | FITC | Biolegend |
| CD62I | Anti-mouse | BV605 | Biolegend |
| CD69 | Anti-mouse | APC | Biolegend |

3.8 Quantificação da carga parasitária no timo e no baço

A detecção e quantificação de parasitos no timo foi realizada mediante PCR quantitativa em tempo real (qPCR), seguindo protocolos previamente descritos (CUERVO-ESCOBAR *et al.*, 2014; LOSADA-BARRAGÁN *et al.*, 2016, 2017). Resumidamente, O DNA foi extraído do órgão usando kit comercial (QIAamp®, Qiagen) e ressuspendido em 100 μ l de tampão Tris-EDTA. A carga parasitária foi estimada usando o kDNA como alvo e o gene *ubiquitin C* (UBC) foi usado para normalizar à concentração de DNA murino em cada amostra. Foi utilizado o sistema Taqman para detecção de um fragmento de 74 bp de uma região do minicírculo com a seguinte sequência de primers e sonda: (i) kDNA-1F (5'-TGTTGGTTGTGTGACTTTA-3'); (ii) kDNA-2R (5'-CATCCCACCAGACTAATC-3');

(iii) (FAM-5'- CTCCACCAGGCTCCAACC-3'-MGB). Para o gene normalizador (UBC) foi utilizado o seguinte par de primers: forward 5'-CTGTGAGAGCCGTGGATATTGG-3' e reverse 5'- GCACTTCCGTCTTTTCAGCAAA-3'). O perfil térmico da reação consistiu em 50 ° C por 2 min, 95 ° C por 10 min, 45 ciclos a 95 ° C por 15 s e 60 ° C por 1 min. A reação de qPCR foi feita no equipamento ViiA7 (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA) da plataforma de PCR em tempo real do IOC.

3.9 Dosagem de CCL21 e S1P

Foram utilizados kits de ELISA comerciais para quantificar os níveis de CCL21 (Mouse CCL21/6Ckine Quantikine ELISA Kit R&D Systems, Mineápolis, EUA; Cat. M6C00) e S1P (Mouse Sphingosine-1-Phosphate (S1P) ELISA Kit Cat: MBS3805114, Mybiosource, San Diego, EUA) em fluido intersticial tímico. Foram seguidos os protocolos preconizados por cada um dos fabricantes. Para leitura de absorbância das placas, foi utilizado o equipamento FlexStation III Molecular Devices da plataforma de Bioensaios e Triagem de Fármacos do IOC. Para obtenção do fluido intersticial, foram realizadas lavagens delicadas do timo com injeção de PBS+BSA 2% e massagem com o auxílio de uma pinça, o fluido obtido a partir dessas lavagens foi utilizado na dosagem de CCL21 e S1P.

3.10 Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism® 6.0. Para significância da carga parasitária foi utilizado teste *t* de Student. Para verificar se as diferenças observadas entre os grupos tinham significância estatística e também avaliar a potencial interação entre as duas condições estudadas (desnutrição e infecção), foi realizada uma análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida do teste *pos-hoc* de Tukey. Devido a característica do teste estatístico, resultados significantes foram separados por sistema alfabético onde a letra **a** representa significância devido a dieta, **b** significância devido a infecção e **c** significância devido a interação entre dieta e infecção. Os dados foram representados por média ± SEM.

4. RESULTADOS

4.1. A desnutrição proteico-calórica diminui o peso corporal dos camundongos e altera significativamente os níveis séricos de IGF-1, leptina e corticosterona

Durante o curso do experimento, o peso dos animais foi aferido a cada 3 dias. A diferença de peso corporal entre os grupos CP e LP foi significativa a partir do terceiro dia de dieta ($p < 0,001$) (Figura 4.1), e essa diferença foi aumentando ao longo do período de estudo. No dia da infecção, os camundongos LP tinham 17,5 % menos peso ($p < 0,0001$) quando comparados com os animais do grupo CP. De acordo com a escala de desnutrição murina proposta por Anstead e colaboradores (2001), com base na relação peso-idade (“Weight-for-age”, WA), o nosso modelo apresentava no sétimo dia um estado de desnutrição leve. No dia final de experimento (21º), os animais LP apresentaram uma significativa perda de peso, equivalente a 28,5% menos de peso corporal em comparação com os camundongos CP no mesmo dia ($p < 0,0001$), indicando desnutrição moderada a grave.

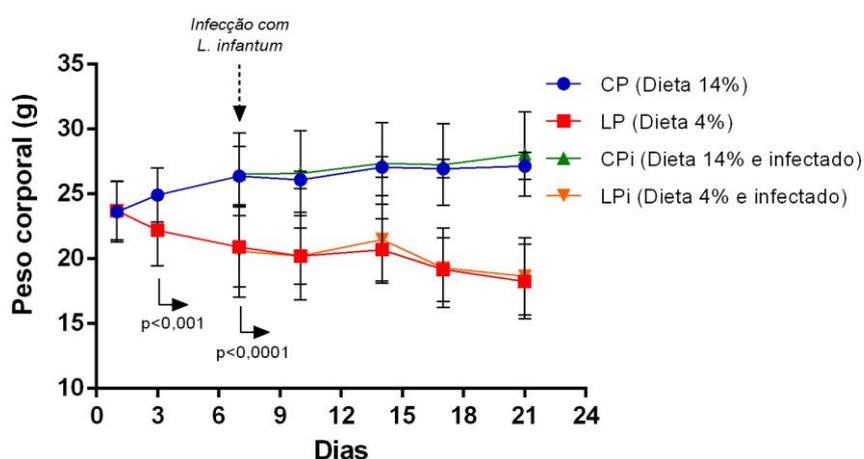


Figura 4.1- Avaliação do peso corporal de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* durante o curso experimental. Camundongos BALB/c machos foram alimentados com uma dieta contendo 14% (n=24, CP) ou 4% (n=24, LP) de proteína durante 21 dias. No sétimo dia, a metade dos animais foi infectado com *L. infantum* e a outra metade recebeu uma injeção de solução salina. O peso corporal foi registrado a cada três dias e expresso como média \pm SEM; n=12 em cada grupo. A significância da diferença observada no dia três foi determinada pelo teste *t* de Student. CP: animais alimentados com dieta de 14% de proteína; LP: animais alimentados com dieta de 4% de proteína; CPi: animais alimentados com 14% de proteína e infectados com *L. infantum*; LPi: animais alimentados com dieta de 4% de proteína e infectados com *L. infantum*.

Para avaliar o consumo das dietas nos diferentes grupos de animais, as rações foram pesadas a cada três dias em concomitância ao acompanhamento do peso corporal dos animais. Observamos que os animais que receberam a dieta contendo

somente 4% de proteína (LP e LPi) consumiram mais ração, aproximadamente o dobro, do que os animais que receberam a dieta que continha 14% de proteína (CP e CPi) (Figura 4.2).

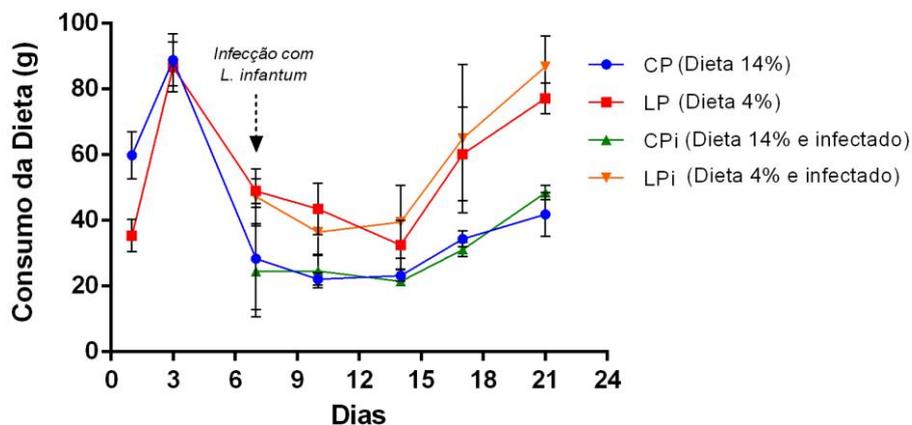


Figura 4.2- Consumo de ração de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* durante o curso experimental. A figura mostra os valores, em gramas, do consumo de ração, de acordo com o peso aferido (n=12 animais por grupo). CP: animais alimentados com dieta de 14% de proteína; LP: animais alimentados com dieta de 4% de proteína; CPi: animais alimentados com 14% de proteína e infectados com *L. infantum*; LPi: animais alimentados com dieta de 4% de proteína e infectados com *L. infantum*.

No dia da eutanásia foi realizada análise dos níveis de glicose dos animais com o intuito de verificar se existiam diferenças entres os grupos, visto que os animais alimentados com dieta de 4% de proteína consumiram mais ração e essa dieta, para fornecer a mesma quantidade de calorias apresenta um teor maior de carboidratos. No entanto, não observamos diferenças significativas nos níveis de glicose entre os grupos (CP, LP, CPi e LPi) (Figura 4.3).

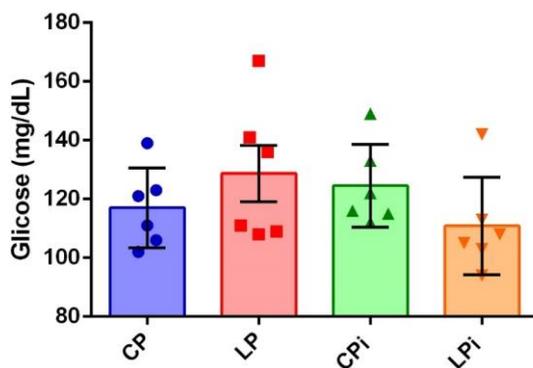


Figura 4.3- Quantificação dos níveis de glicose em sangue periférico de animais desnutridos e infectados com *L. infantum*. A glicose foi aferida, ao final do experimento, no 21º dia usando o kit comercial Accu-Chek Active® (Roche). O gráfico representa a média ± SEM; n=6 animais por grupo.

Marcadores hormonais de desnutrição como leptina e IGF-1 foram também avaliados no nosso modelo. A quantificação por ELISA dos níveis de leptina e IGF-1,

mostraram que estas moléculas estavam diminuídas significativamente tanto em animais desnutridos (LP) como em animais desnutridos e infectados (LPi) (Figura 4.4). Em contrapartida, os níveis de corticosterona, um marcador de estresse, encontravam-se significativamente aumentados nesses animais (Figura 4.4). Para confirmar a positividade e quantificar a infecção por *L. infantum*, realizamos qPCR para estimar a carga parasitária no baço (Figura 4.4). Animais desnutridos infectados (LPi) apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) na carga parasitária no órgão, quando comparados com animais bem-nutridos infectados (CPi).

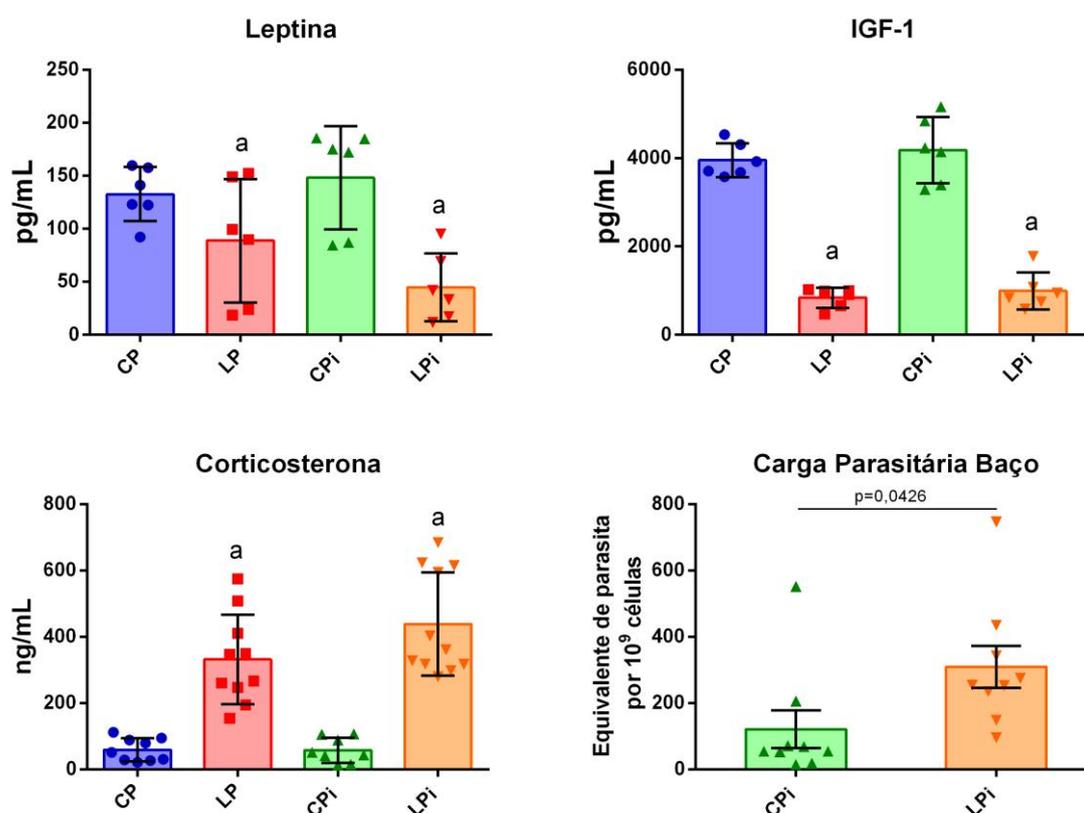


Figura 4.4- Níveis de leptina, IGF-1, corticosterona e carga parasitária esplênica em animais desnutridos e infectados com *L. infantum*. Os gráficos de barras e pontos mostram a a média \pm SD dos níveis de leptina e IGF-1 ($n=6$) e corticosterona ($n=12$). A significância estatística das diferenças devido a dieta (a), infecção (b) ou uma interação entre dieta e infecção (c) foi determinada por Two-way ANOVA ($p < 0,001$). Para carga parasitária ($n=9$), as diferenças estatísticas foram determinadas por teste *t* de Student ($p=0,0426$). CP: animais alimentados com dieta de 14% de proteína; LP: animais alimentados com dieta de 4% de proteína; CPi: animais alimentados com 14% de proteína e infectados com *L. infantum*; LPi: animais alimentados com dieta de 4% de proteína e infectados com *L. infantum*.

4.2 A desnutrição favorece o aumento da carga parasitária no timo

Visto que em trabalhos prévios do grupo identificamos a presença do parasito no timo tanto de animais bem-nutridos como desnutridos (LOSADA-BARRAGÁN *et al.*, 2017), decidimos quantificar a carga parasitária no órgão, através de qPCR, com o intuito de verificar se a desnutrição favorece o aumento da carga parasitária no órgão. A análise revelou que animais desnutridos e infectados (LPi) apresentam aumento significativo do número de equivalentes de parasita no timo ($p < 0,05$) (Figura 4.5).

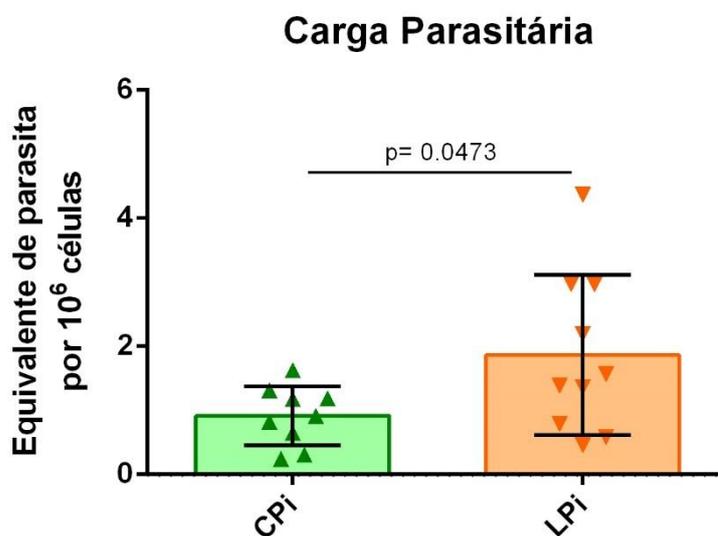


Figura 4.5- Quantificação da carga parasitária no timo de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum*. A análise da carga parasitária (n=9-10) foi feita por qPCR e está representada como a média \pm SD. Diferenças estatísticas foram determinadas por teste *t* de Student ($p=0,0473$). CPI: animais alimentados com 14% de proteína e infectados com *L. infantum*; LPi: animais alimentados com dieta de 4% de proteína e infectados com *L. infantum*.

4.3 A desnutrição induz aumento na deposição de laminina e fibronectina no timo de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum*

Em trabalhos anteriores do grupo observamos uma redução significativa da relação córtex:medula no timo de animais desnutridos e infectados (LOSADA-BARRAGÁN *et al.*, 2019). Para verificar se essas mudanças estruturais na microarquitetura tímica estão associadas a alterações na abundância de moléculas de matriz extracelular, analisamos, por imuno-histoquímica, a expressão de laminina e fibronectina, tanto na região cortical, quanto medular do timo dos animais dos quatro

grupos experimentais. A análise qualitativa das imagens revela um aumento na marcação dessas proteínas no córtex tímico de animais desnutridos e infectados (LPi) (Figura 4.6 e Figura 4.8).

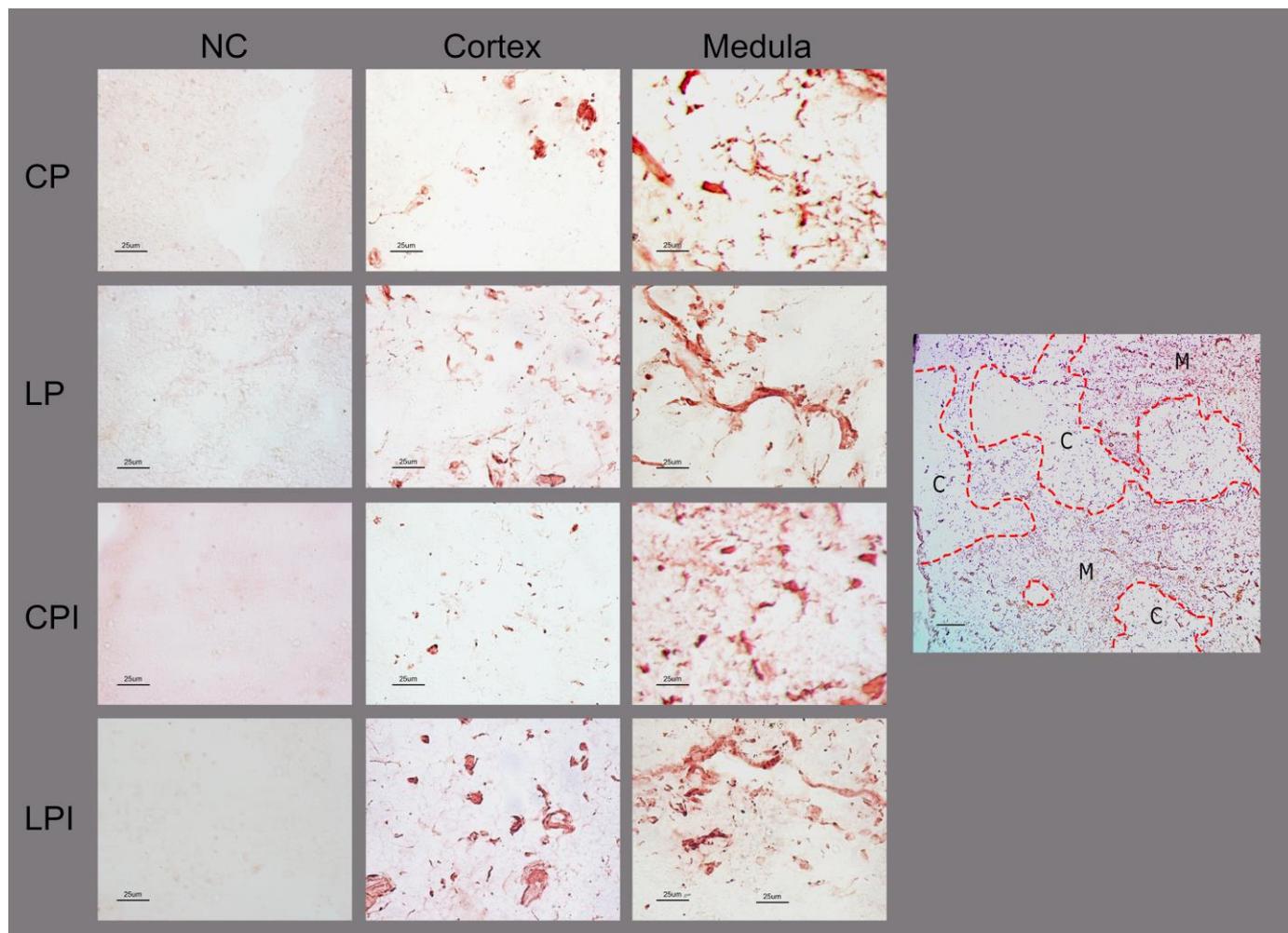


Figura 4.6- Imuno-histoquímica para fibronectina nas regiões do córtex e medula do timo de camundongos BALB/c desnutridos e infectados com *L. infantum*. A figura mostra imagens representativas da marcação para fibronectina. As regiões em vermelho indicam a detecção da proteína com anticorpo anti-fibronectina. Barra: 25 μM. À direita, imagem representativa do timo de um animal controle (CP) com marcação para fibronectina (marrom) mostrando as regiões de córtex (C) e medula (M) delimitadas por traços em vermelho. Barra: 100 μm. CP: animais alimentados com dieta de 14% de proteína; LP: animais alimentados com dieta de 4% de proteína; CPI: animais alimentados com 14% de proteína e infectados com *L. infantum*; LPI: animais alimentados com dieta de 4% de proteína e infectados com *L. infantum*.

A partir das imagens capturadas no microscópio e usando o software Image J, foi possível determinar o percentual de área marcada nos diferentes grupos experimentais. Observamos que os animais LP e LPi apresentaram aumento na percentagem de área marcada para fibronectina na região cortical do timo, esse aumento foi estatisticamente significativo e foi devido à desnutrição ($p < 0,05$) (Figura 4.7). Na região medular não observamos diferenças significativas nos níveis de expressão de fibronectina.

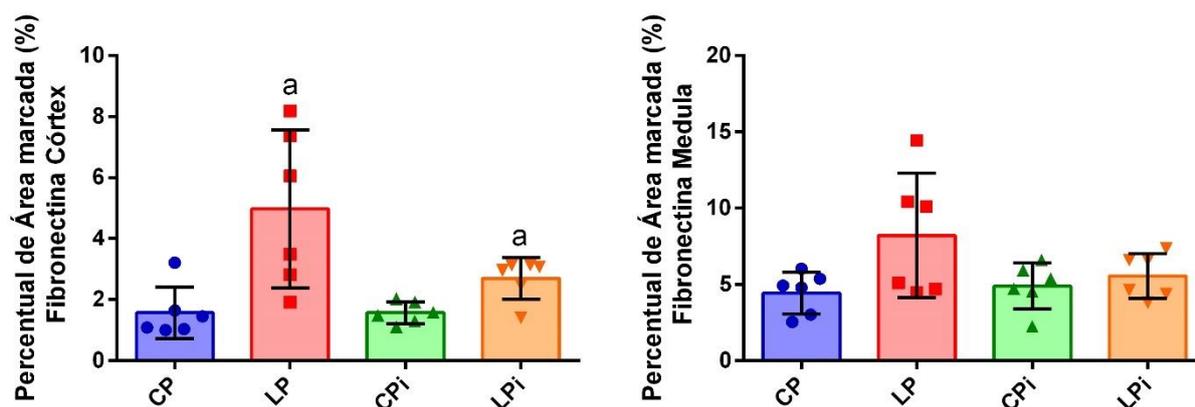


Figura 4.7- Quantificação do percentual de área marcada para fibronectina no timo de camundongos BALB/c. As áreas marcadas do timo foram avaliadas sob um microscópio de luz e quantificadas em pelo menos 5 campos com ampliação de 400x usando o software ImageJ 1.48v (NIH, EUA). Os resultados foram expressos em percentual de área marcada. Os gráficos de barra representam a média \pm SD ($n=6$). A significância estatística das diferenças devido a dieta (a) foi determinada por Two-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). CP: animais alimentados com dieta de 14% de proteína; LP: animais alimentados com dieta de 4% de proteína; CPI: animais alimentados com 14% de proteína e infectados com *L. infantum*; LPi: animais alimentados com dieta de 4% de proteína e infectados com *L. infantum*.

Quando a laminina foi analisada, verificou-se também um aumento significativo na deposição desta proteína na região cortical de animais desnutridos e infectados (LPi) (Figura 4.9). A análise estatística indicou que esse aumento se deu pela interação das duas variáveis: infecção e desnutrição ($p < 0,05$). Na região medular observou-se também um aumento dessa proteína em animais bem nutridos e infectados (CPi), porém, a análise estatística não apontou significância para esse aumento.

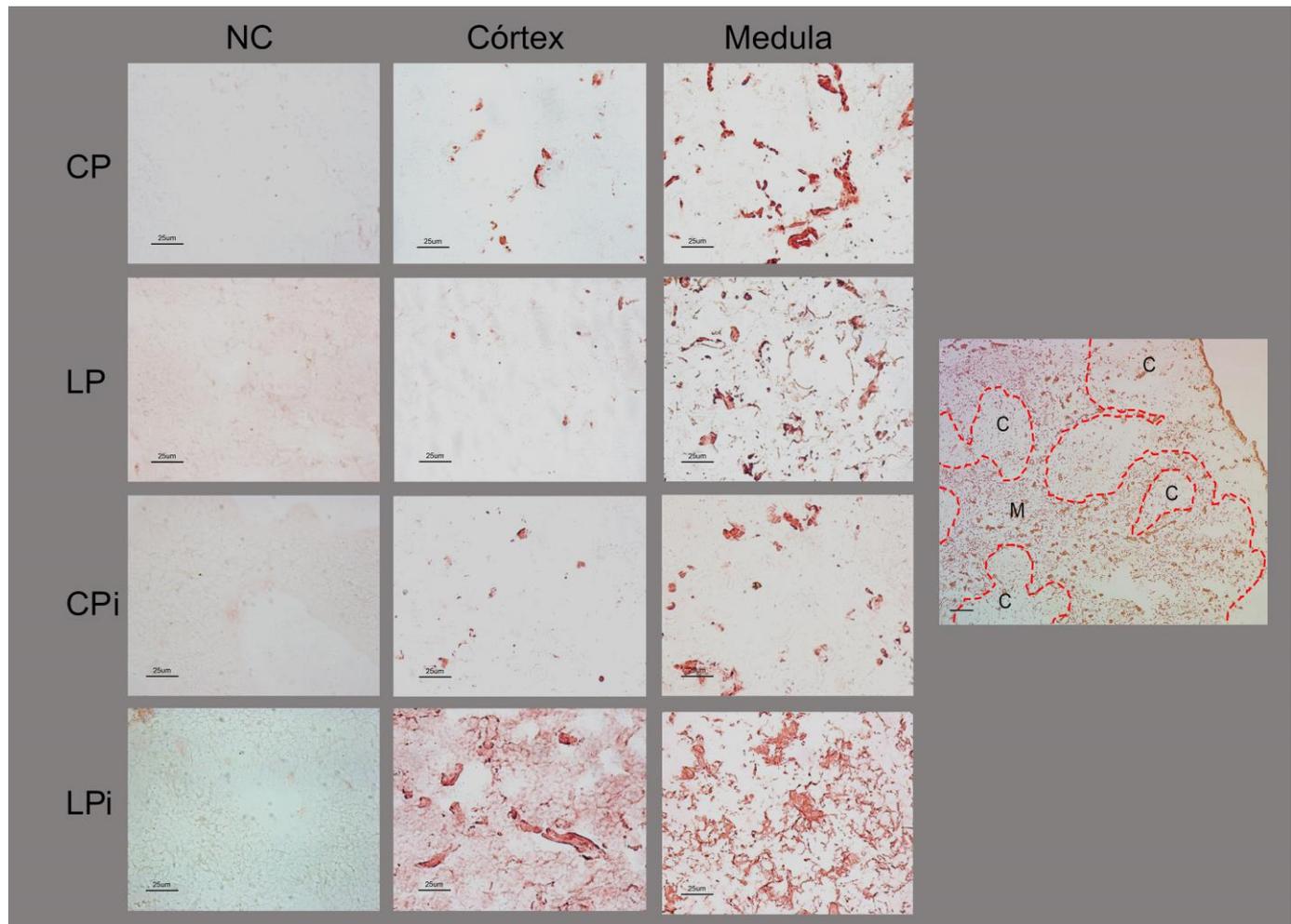


Figura 4.8- Imuno-histoquímica para laminina nas regiões do córtex e medula do timo de camundongos BALB/c desnutridos e infectados com *L. infantum*. A figura mostra imagens representativas da marcação para laminina. As regiões em vermelho indicam a detecção da proteína com anticorpo anti-laminina Barra: 25 µM. À direita, imagem representativa do timo de um animal controle (CP) com marcação para laminina (marrom) mostrando as regiões de córtex (C) e medula (M) delimitadas por traços em vermelho. Barra: 100 µm. CP: animais alimentados com dieta de 14% de proteína; LP: animais alimentados com dieta de 4% de proteína; CPi: animais alimentados com 14% de proteína e infectados com *L. infantum*; LPi: animais alimentados com dieta de 4% de proteína e infectados com *L. infantum*.

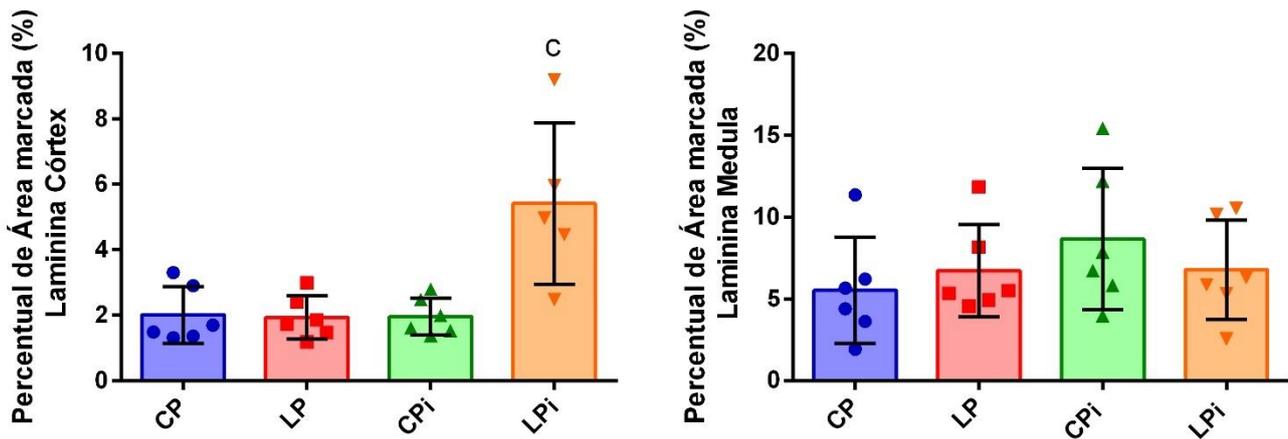


Figura 4.9- Quantificação do percentual de área marcada para laminina no timo de camundongos BALB/c. As áreas marcadas do timo foram avaliadas sob um microscópio de luz e quantificadas em pelo menos 5 campos com ampliação de 400x usando o software ImageJ 1.48v (NIH, EUA). Os resultados foram expressos em percentual de área marcada. Os gráficos de barra representam a média \pm SEM (n=6). Diferenças estatísticas devido a dieta (a), infecção (b) ou uma interação entre dieta e infecção (c) foram determinadas por Two-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). CP: animais alimentados com dieta de 14% de proteína; LP: animais alimentados com dieta de 4% de proteína; CPi: animais alimentados com 14% de proteína e infectados com *L. infantum*; LPi: animais alimentados com dieta de 4% de proteína e infectados com *L. infantum*

4.4 O aumento na deposição de laminina, fibronectina no timo de camundongos desnutridos e infectados é acompanhado por aumento na expressão de MMP10

Levando em consideração os níveis elevados de expressão da fibronectina e laminina na região cortical tímica de animais desnutridos infectados, nos perguntamos se os níveis de MMP-10 também estariam alterados nesses animais. Esta metaloproteína é responsável pela clivagem de proteínas da MEC, particularmente fibronectina e laminina, e exerce um papel fundamental na remodelação de tecidos. A avaliação qualitativa da expressão de MMP-10 no timo desses animais revelou um aumento na expressão da enzima na região cortical de animais desnutridos (LP) e desnutridos e infectados (LPi) (Figura 4.10).

Em seguida quantificamos o percentual de área marcada para MMP-10, em ambas as regiões, cortical e medular, do timo desses camundongos. Interessantemente, o aumento observado na expressão dessa metaloproteína na região cortical de animais LP e LPi foi significativo e foi devido à desnutrição ($p < 0,001$). Já os animais bem-nutridos e infectados não sofreram nenhuma alteração (Figura 4.11).

Enquanto à região medular, não observamos diferenças significativas nos níveis de expressão dessa enzima (Figura 4.11).

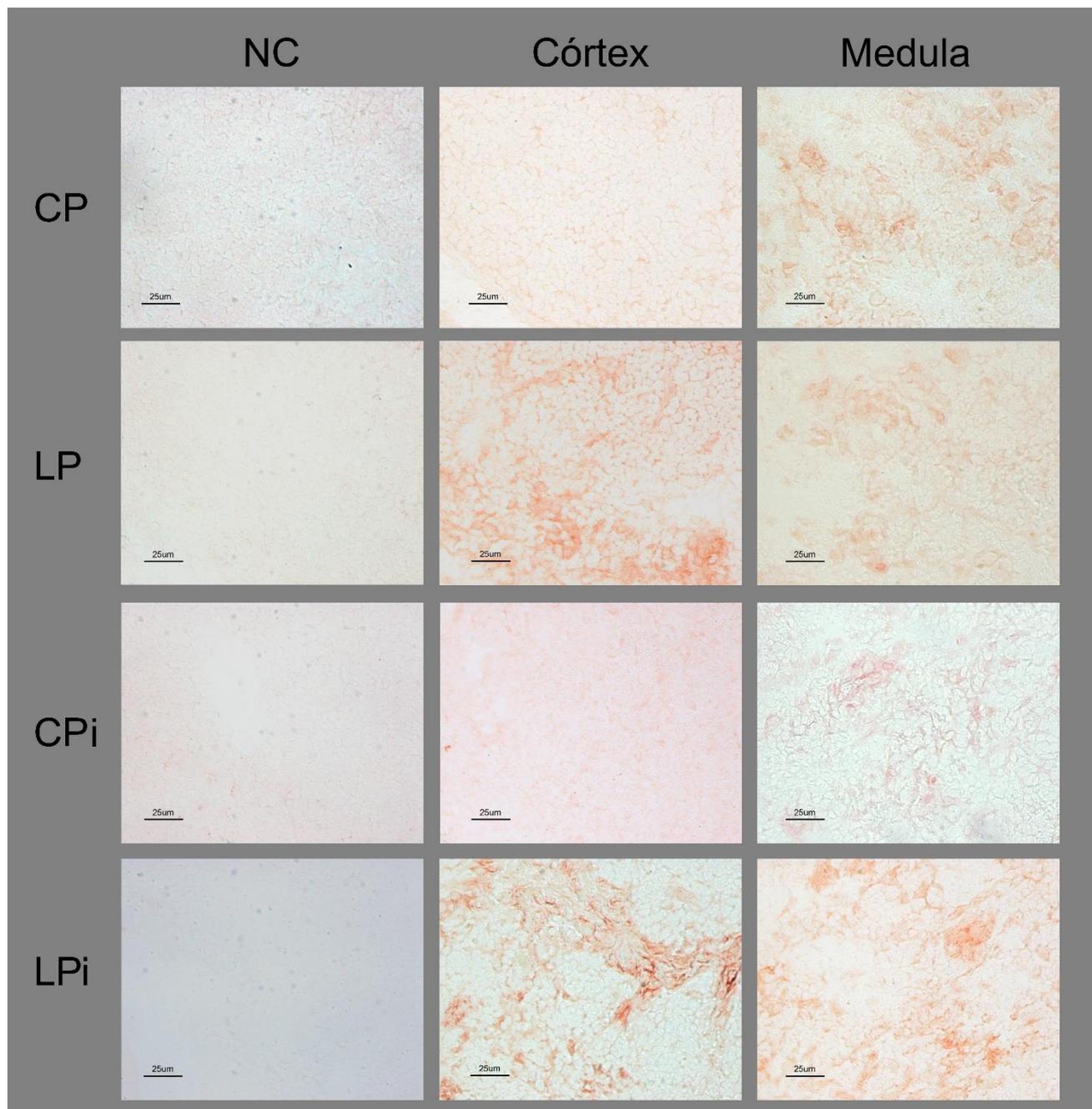


Figura 4.10- Imuno-histoquímica para MMP10 nas regiões do córtex e medula do timo de camundongos BALB/c desnutridos e infectados com *L. infantum*. A figura mostra imagens representativas da marcação para MMP10. As regiões em vermelho indicam a detecção da proteína com anticorpo anti-MMP10. CP: animais alimentados com dieta de 14% de proteína; LP: animais alimentados com dieta de 4% de proteína; CPi: animais alimentados com 14% de proteína e infectados com *L. infantum*; LPi: animais alimentados com dieta de 4% de proteína e infectados com *L. infantum*. Barra: 25µM.

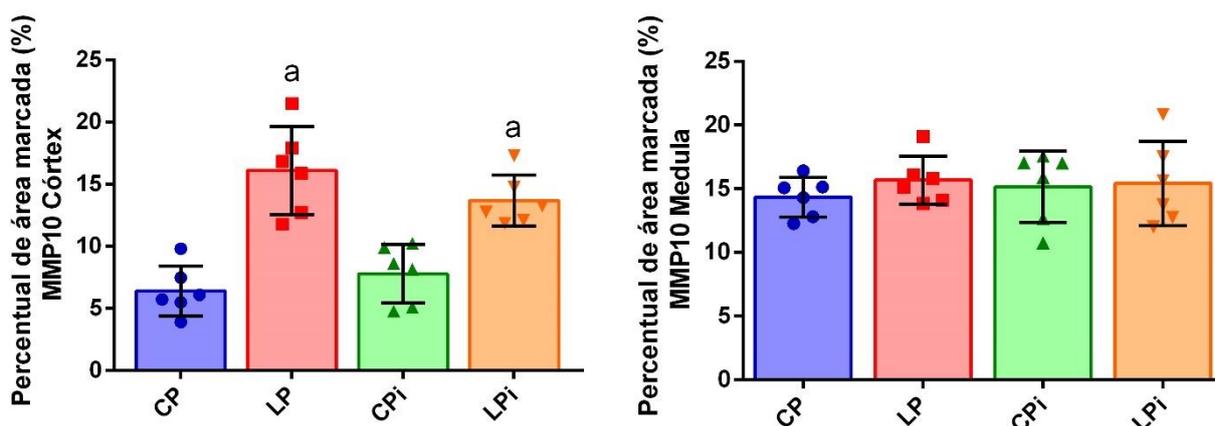


Figura 4.11- Quantificação de MMP-10 no timo de camundongos BALB/c desnutridos e infectados com *L. infantum*. As áreas marcadas do timo foram avaliadas sob um microscópio de luz e quantificadas em pelo menos 5 campos com ampliação de 100x e outros 5 campos a 400x usando o software ImageJ 1.48v (NIH, EUA). Os resultados foram expressos em percentual de área marcada. Os gráficos de barra representam a média \pm SD (n=6). Diferenças estatísticas devido a dieta (a) foram determinadas por Two-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). CP: animais alimentados com dieta de 14% de proteína; LP: animais alimentados com dieta de 4% de proteína; CPI: animais alimentados com 14% de proteína e infectados com *L. infantum*; LPi: animais alimentados com dieta de 4% de proteína e infectados com *L. infantum*.

4.5 Animais desnutridos e desnutridos e infectados apresentam níveis reduzidos de CCL21 no timo

Sabendo que o eixo CCL21-CCR7 é fundamental para a migração de timócitos SP do córtex para a medula (UENO *et al.*, 2004) e que a migração de timócitos é mediada pela interação com fibronectina e/ou laminina (SAVINO *et al.*, 2002), à luz dos defeitos observados na microarquitetura tímica de animais desnutridos e infectados, nos perguntamos se a desnutrição poderia também alterar a expressão da quimiocina CCL21 produzida na medula tímica. Esta possibilidade foi reforçada por resultados anteriores do grupo que mostraram que os transcritos para CCR7 estão aumentados em timócitos de animais LP e LPi (LOSADA-BARRAGÁN *et al.*, 2017). Decidimos então analisar, através de ELISA, os níveis de CCL21 no fluído intersticial tímico dos animais. Esta análise revelou uma diminuição significativa nos níveis de CCL21 nos animais desnutridos (LP e LPi) em relação aos grupos controle (Figura 4.12). A concentração dessa quimiocina diminuiu aproximadamente 2X nesses animais.

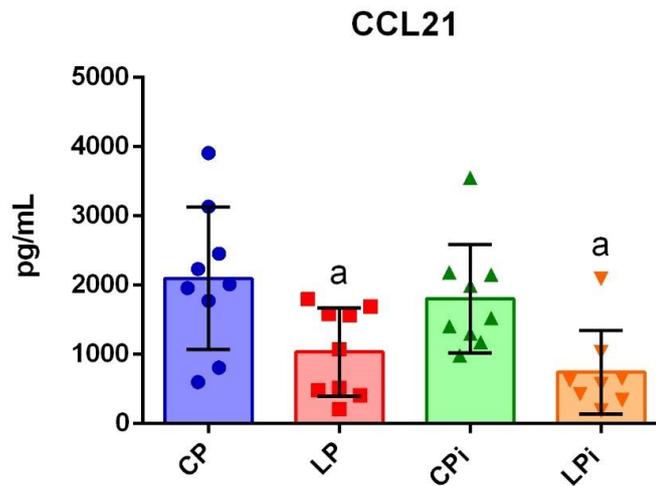


Figura 4.12- Níveis de quimiocina CCL21 no fluido intersticial tímico de camundongos BALB/c. Os níveis foram avaliados em ensaio de ELISA comercial (n=9), conforme as recomendações do fabricante. Diferenças estatísticas devido a dieta (a) foram determinadas por Two-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$). CP: animais alimentados com dieta de 14% de proteína; LP: animais alimentados com dieta de 4% de proteína; CPi: animais alimentados com 14% de proteína e infectados com *L. infantum*; LPi: animais alimentados com dieta de 4% de proteína e infectados com *L. infantum*

4.6 Tanto a desnutrição quanto a infecção alteram as subpopulações de linfócitos T no timo

Tendo em vista que as alterações observadas nas proteínas de matriz extracelular e nos níveis de quimiocinas poderiam estar comprometendo a correta migração intratímica de timócitos e, por consequência, estas células não estariam sofrendo os processos de seleção e maturação de maneira adequada no órgão, decidimos então avaliar as subpopulações de linfócitos T. Em primeiro lugar, os números absolutos de timócitos foram obtidos para cada animal. Em concordância com o descrito anteriormente pelo grupo (CUERVO-ESCOBAR et al., 2014), observamos que os animais desnutridos e desnutridos e infectados (LP e LPi) apresentaram redução significativa do número total de timócitos quando comparados com os animais controle (CP) (Tabela 4.1). Ao passo que a dieta pobre em proteína afeta significativamente o número total de células no timo dos animais, os animais bem-nutridos e infectados com *L. infantum* apresentam um aumento na celularidade tímica (Tabela 4.1). Embora esse aumento não seja significativo estatisticamente, o resultado indica que a infecção induziu um incremento de timócitos e que essa resposta é anulada pela desnutrição.

Tabela 4.1- Número absoluto de timócitos em camundongos BALB/c desnutridos e infectados com *L. infantum*. CP: animais alimentados com dieta de 14% de proteína; LP: animais alimentados com dieta de 4% de proteína; CPI: animais alimentados com 14% de proteína e infectados com *L. infantum*; LPI: animais alimentados com dieta de 4% de proteína e infectados com *L. infantum*. Significância das diferenças foi calculada usando teste de ANOVA a duas vias, *a*: diferença devida à dieta.

| Grupo de Tratamento | Média do No. de timócitos (\pmSD) $\times 10^7$ |
|----------------------------|--|
| CP | 5.68 (\pm 0,65) |
| LP | 2.97 (\pm 1.05) ^a (p=0,0007) |
| CPI | 7.74 (\pm 3.98) |
| LPI | 2.77 (\pm 1.13) ^a (p=0,0007) |

As subpopulações de timócitos também foram analisadas por citometria de fluxo em colaboração com a Dra. Flavia L. Ribeiro-Gomes. A estratégia de *gates* para esta análise é mostrada na figura (Figura 4.13-A).

Os resultados de celularidade mostrados na tabela 4.1 foram usados para normalizar os dados da citometria de fluxo e assim obter o número absoluto das diferentes subpopulações de timócitos analisadas (Figura 4.13-B). Foi possível observar diferenças significativas no número absoluto de todas as subpopulações analisadas entre os grupos experimentais (Figura 4.13-B). Verificou-se que tanto os animais desnutridos (LP), como os desnutridos infectados (LPI) apresentaram redução significativa ($p < 0,001$) nos números absolutos de células T duplo negativas (DN), duplo positivas (DP), CD4⁺ e CD8⁺ (Figura 4.13-B). Essa diferença foi devido à dieta. De forma interessante, observamos um aumento significativo ($p = 0,0014$) no número de células T CD4⁺ em animais bem-nutridos infectados (CPI) devido à infecção. Novamente, essa resposta é anulada pela condição de desnutrição prévia nos animais LPI (Figura 4.13-B).

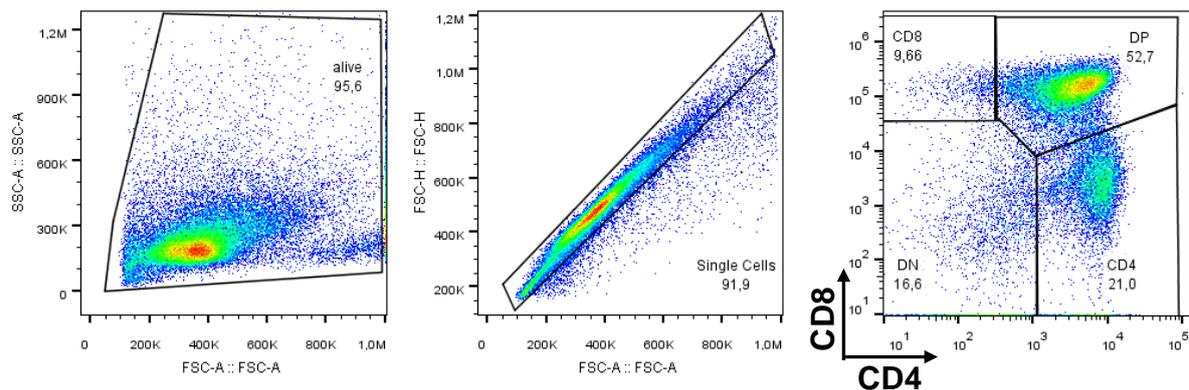
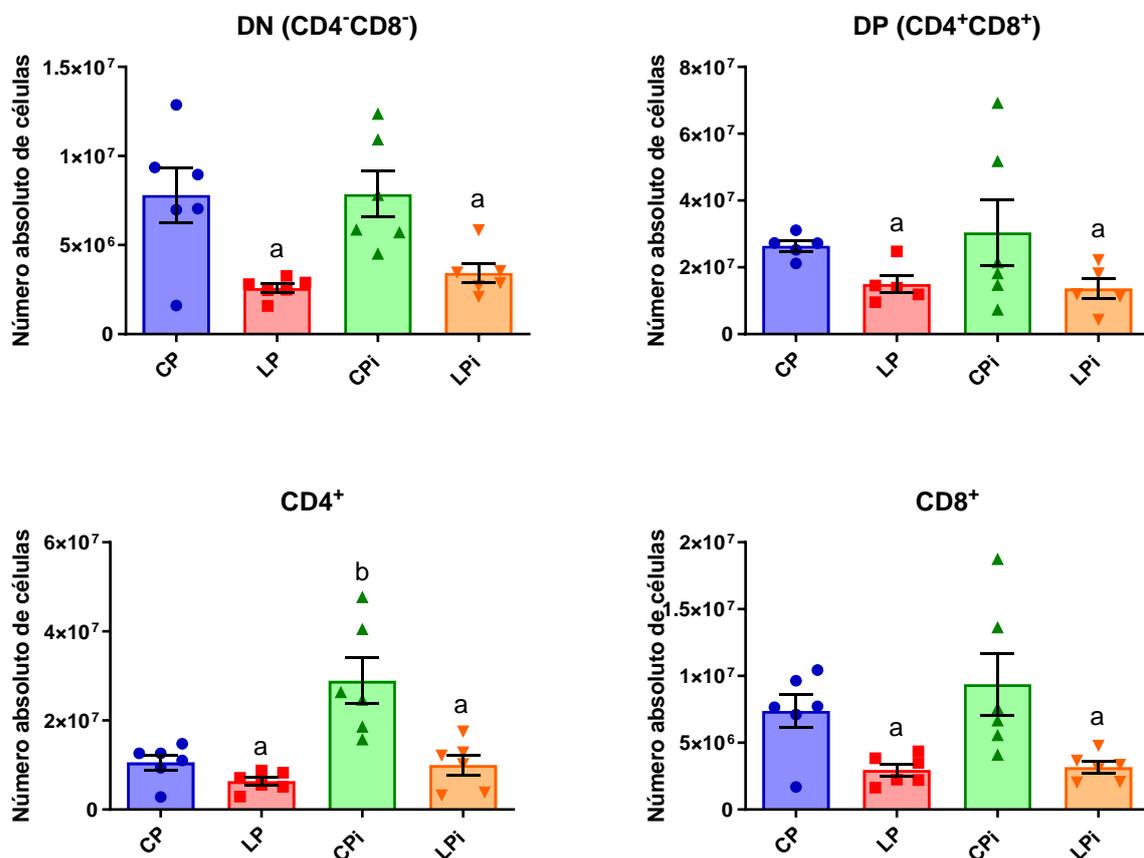
A**B**

Figura 4.13. Subpopulações de células T no timo de camundongos BALB/c desnutridos e infectados com *L. infantum*. (A) Estratégia de *gates* utilizada para selecionar as subpopulações. Foram utilizados anticorpos anti-TCR β (conjugado com PE), anti-CD4 (conjugado com AlexaFluor700) e anti-CD8 (conjugado com APCCy7). (B) Os gráficos de barra representam a média do número absoluto de células \pm SEM (n=5-6). A significância estatística das diferenças devido a dieta (a, $p < 0,001$), ou infecção (b, $p = 0,0014$) foram determinadas por Two-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. CP: animais alimentados com dieta de 14% de proteína; LP: animais alimentados com dieta de 4% de proteína; CPi: animais alimentados com 14% de proteína e infectados com *L. infantum*; LPi: animais alimentados com dieta de 4% de proteína e infectados com *L. infantum*.

4.7 - A subpopulação de timócitos DN1 é aumentada em animais infectados com *L. infantum*, mas diminuída nos animais desnutridos infectados

A partir da diminuição de células DN observada nos animais desnutridos (LP e LPi) nos perguntamos se essa alteração era devida à diminuição de alguma subpopulação de células DN em particular. Tendo em vista que, durante o seu processo de maturação, essas células passam por diferentes estágios denominados DN1, DN2, DN3 e DN4, de acordo com a expressão dos receptores CD44 e CD25, decidimos analisar essas subpopulações por meio de citometria de fluxo e na figura 4.14-A é mostrada a estratégia de *gates* usada para tal análise.

Observamos que tanto a infecção (b, $p < 0,001$) quanto a desnutrição (a, $p < 0,0001$) alteraram significativamente a subpopulação DN1 (Figura 4.14-B); contudo a interação entre as duas variáveis não foi significativa. O teste post-hoc de Tukey revelou que a infecção com *L. infantum* induziu um aumento significativo na subpopulação de timócitos DN1 nos animais bem-nutridos (CPI) em comparação ao controle, enquanto a desnutrição prévia à infecção anulou essa resposta nos animais LPi (Figura 4.14-B). De fato, animais desnutridos, LP e LP, apresentaram redução significativa dessa subpopulação de timócitos em relação aos animais controle e aos animais CPI, respectivamente (Figura 4.14-B). Também observamos que tanto os timócitos DN2 como os DN4 foram significativamente reduzidos pela desnutrição nos animais LP e LPi ($p < 0,001$), ao passo que os DN3 foram diminuídos tanto pela desnutrição (LP) ($p < 0,05$), como pela infecção (CPI e LPi) ($p < 0,001$). (Figura 4.14-B).

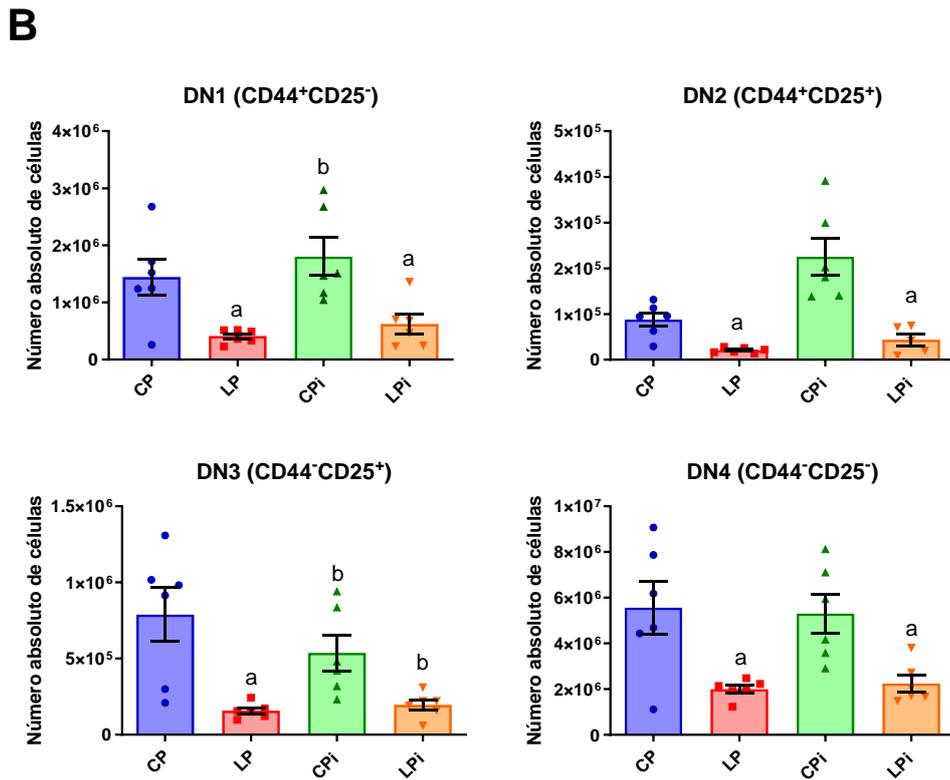
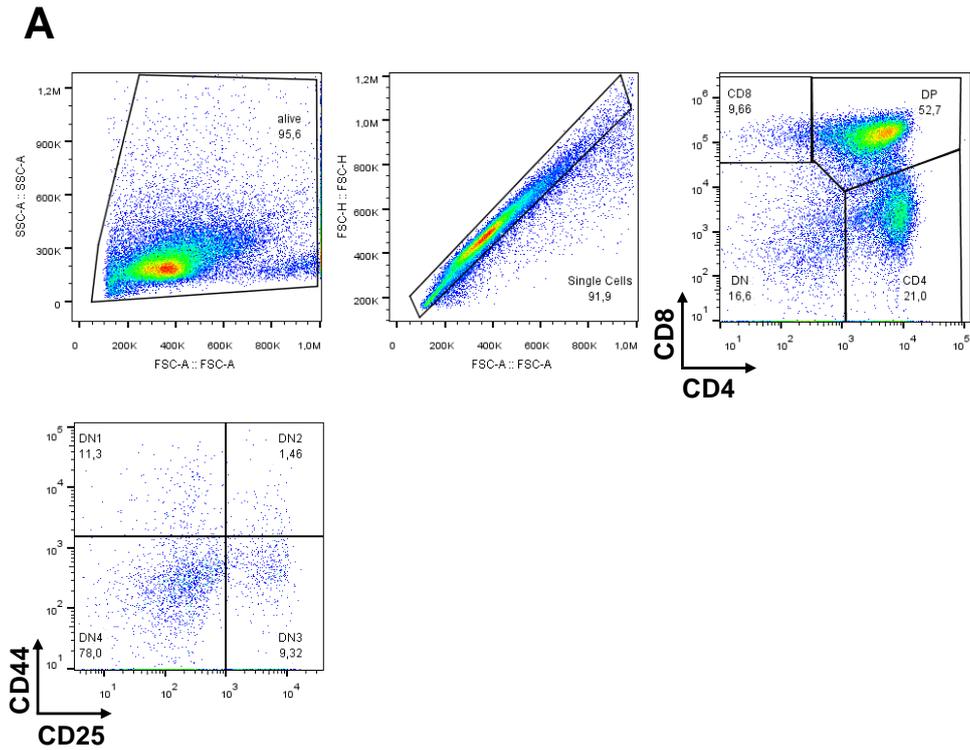


Figura 4.14- Número absoluto de subpopulações de timócitos duplo negativos (DN) no timo de camundongos BALB/c. (A). Estratégia de *gates* utilizada para selecionar as subpopulações DN. **(B).** Os gráficos de barra representam o número absoluto de células \pm SEM ($n=6$). A significância estatística das diferenças observadas devido a dieta (a) ou infecção (b) foram determinadas por Two-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. CP: animais alimentados com dieta de 14% de proteína; LP: animais alimentados com dieta de 4% de proteína; CPI: animais alimentados com 14% de proteína e infectados com *L. infantum*; LPI: animais alimentados com dieta de 4% de proteína e infectados com *L. infantum*.

4.8 Animais desnutridos infectados (LPi) apresentam aumento de células T duplo positivas no compartimento medular tímico

As alterações na expressão de fibronectina e laminina nos animais desnutridos nos levaram a pensar que poderia também estar ocorrendo uma migração precoce de timócitos DP imaturos para a medula sem passar devidamente pelos processos de seleção positiva. Então, decidimos analisar também a frequência de células imaturas (DP) na região medular tímica, uma vez que nessa região espera-se encontrar apenas células T simples positivas. A dupla marcação para CD4⁺ e CD8⁺ foi analisada através de imunofluorescência. A análise qualitativa das imagens obtidas, mostra que animais LP e LPi apresentam tendência no aumento de células T duplo positivas na região medular, quando comparados o grupo controle CP (Figura 4.15).

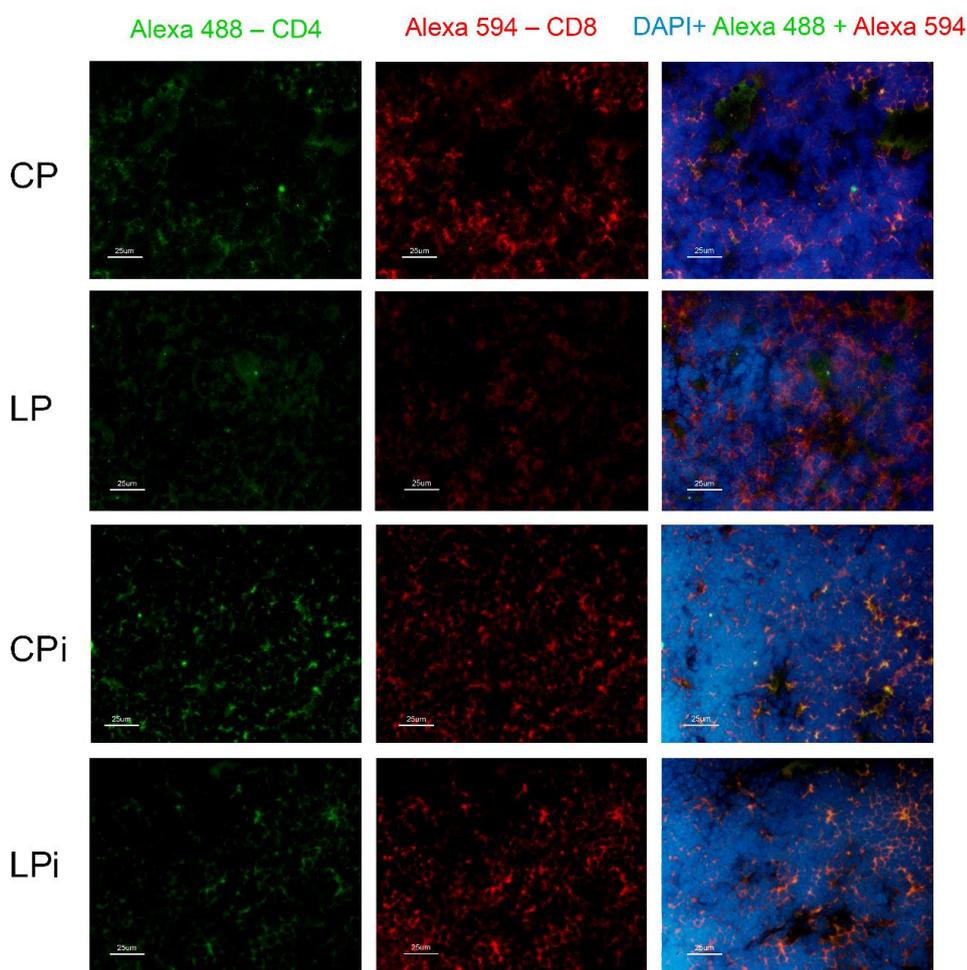


Figura 4.15- Análise de células T duplo positivas na região medular de camundongos BALB/c desnutridos e infectados com *Leishmania infantum*. Imagens representativas de células T CD4⁺ (verde) e T CD8⁺ (vermelho) detectada por imunofluorescência em cortes de timo dos diferentes grupos experimentais. Os núcleos das células foram marcados com DAPI (azul). CP: animais alimentados com dieta de 14% de proteína; LP: animais alimentados com dieta de 4% de proteína; CPi: animais alimentados com 14% de proteína e infectados com *L. infantum*; LPi: animais alimentados com dieta de 4% de proteína e infectados com *L. infantum*. Barra: 25 μM.

Para analisar a frequência dessas células na região medular tímica foi calculada a média do total de células T duplo positivas contadas em 5 campos de cada animal. Observamos um aumento significativo do número dessas células imaturas DP na região medular de camundongos desnutridos infectados (LPi) em comparação a animais bem-nutridos infectados (CPi) (Figura 4.16). Essa diferença significativa foi devido à dieta (a, $p < 0,01$). Esse resultado corroboraria nossa hipótese de que o processo de maturação desses timócitos, que deveria ocorrer na região cortical, está prejudicado e que provavelmente as alterações das proteínas de matriz extracelular estão contribuindo para uma migração prematura de timócitos imaturos para a medula tímica.

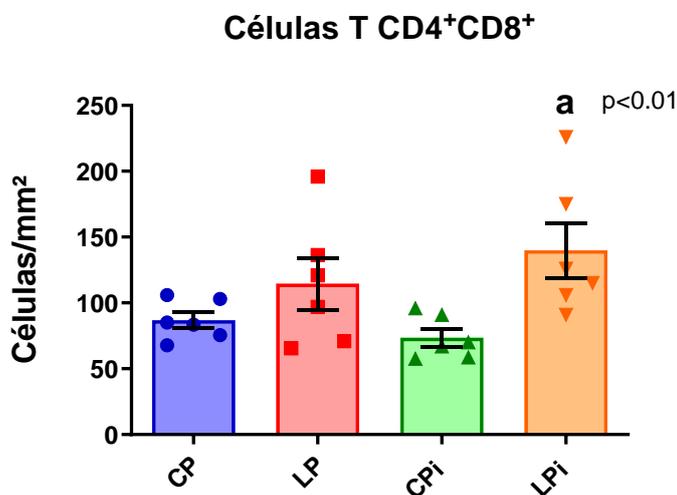


Figura 4.16- Quantificação de timócitos CD4⁺CD8⁺ na região medular de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum*. Dados representam a média do número de células contadas em 5 campos por animal \pm SEM. Cada ponto representa um animal (n=6). Diferenças significativas devido à dieta (a) foram determinadas por Two-way ANOVA. O teste post-hoc de Tukey revelou diferenças significativas entre os grupos CPi e LPi. CPi: animais alimentados com dieta contendo 14% de proteína e infectados com *L. infantum*; LPi: animais alimentados com dieta contendo 4% de proteína e infectados com *L. infantum*.

4.9 Animais desnutridos e desnutridos e infectados apresentam aumento significativo na expressão do receptor S1P₁

A sinalização mediada pelo receptor S1P₁ é essencial para a saída das células T maduras do timo para a periferia. Essa saída obedece à concentração de esfingosina-1-fosfato (S1P) que é o ligante de S1P₁. Já que as células T maduras expressam S1P₁⁺ e, portanto, têm a capacidade de emigrar do timo para o sangue de acordo com o gradiente de concentração de S1P na periferia, nos perguntamos se a desnutrição ou a infecção poderiam alterar os níveis desse receptor no timo dos animais. Análise quantitativa da marcação de S1P₁ mostra que animais desnutridos, LP e LPi, exibem aumento na expressão desse receptor tanto na região cortical, como na região medular quando comparados com o grupo controle (Figura 4.17).

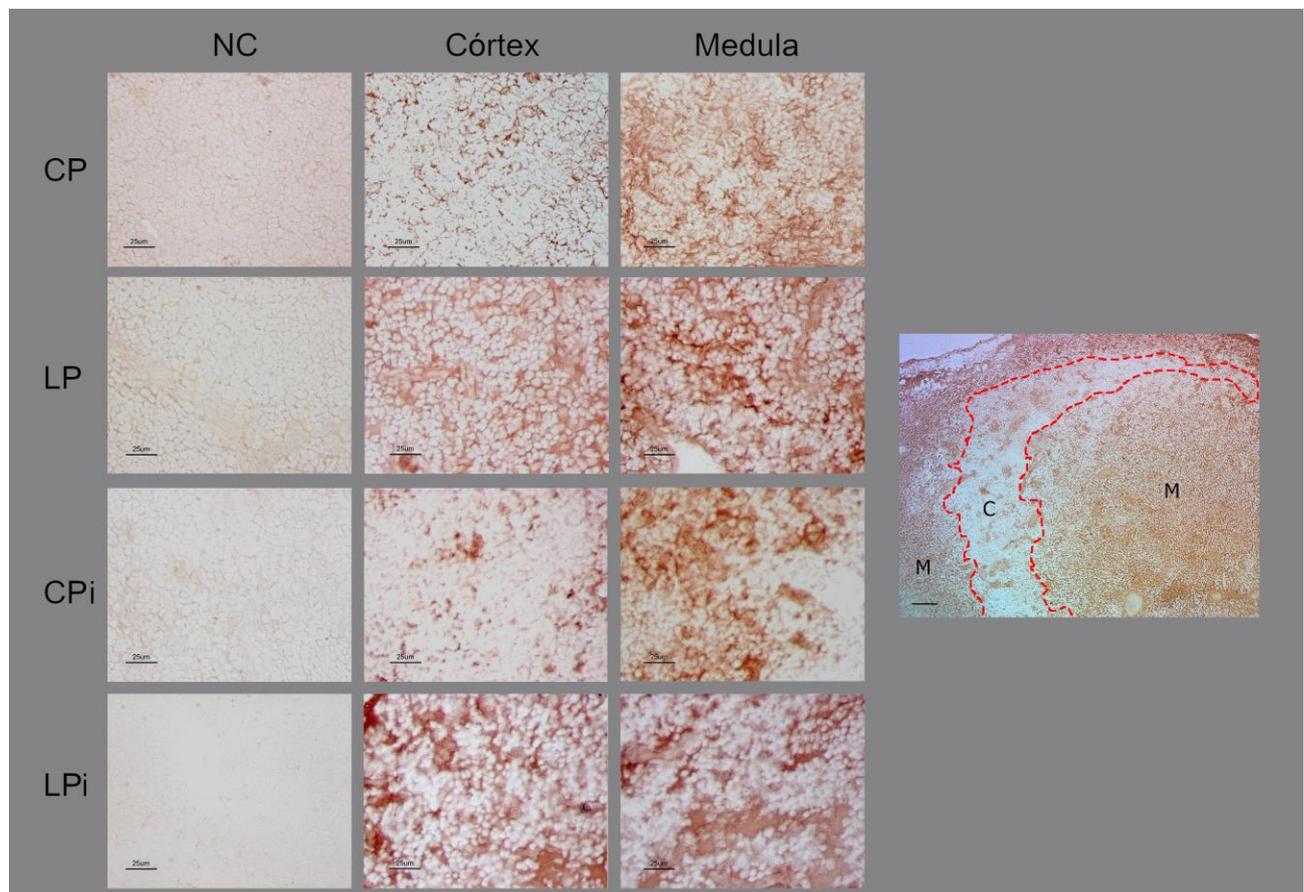


Figura 4.17- Imuno-histoquímica para S1P₁ nas regiões do córtex e medula do timo de camundongos BALB/c. A figura mostra imagens representativas da marcação para I S1P₁. Barra: 25 μM. À direita, imagem representativa do timo de um animal controle (CP) com marcação para S1P₁ (marrom) mostrando as regiões de córtex (C) e medula (M) delimitadas por traços em vermelho. Barra: 100 μm. CP: animais alimentados com dieta de 14% de proteína; LP: animais alimentados com dieta de 4% de proteína; CPI: animais alimentados com 14% de proteína e infectados com *L. infantum*; LPi: animais alimentados com dieta de 4% de proteína e infectados com *L. infantum*.

A análise quantitativa da percentagem de área marcada para S1P₁ revelou que o aumento observado em animais desnutridos, tanto no córtex quanto na medula era estatisticamente significativo. Na região cortical dos animais desnutridos (LP) o aumento de S1P₁ foi devido à desnutrição ($p < 0,0001$) ao passo que nos animais desnutridos infectados (LPi) esse aumento parece ser devido à interação das duas variáveis ($p = 0,04$). Na região medular tímica observamos que o aumento de S1P₁ foi devido à desnutrição tanto em animais LP como LPi ($p = 0,0018$) (Figura 4.18).

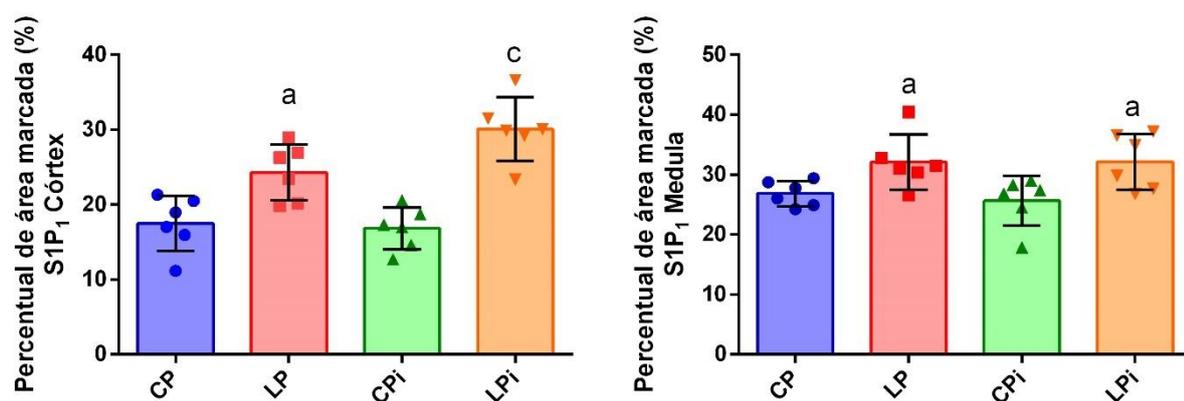


Figura 4.18- Análise da expressão de S1P₁ no córtex e na medula de camundongos BALB/c. As áreas marcadas do timo foram avaliadas sob um microscópio de luz e quantificadas em pelo menos 5 campos por animal com ampliação de 400x usando o software ImageJ 1.48v (NIH, EUA). Os resultados foram expressos em percentual de área marcada. Os gráficos de barra representam a média \pm SD e cada ponto representa um animal ($n=6$). A significância estatística das diferenças entre os grupos foi determinada por Two-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Diferenças estatísticas devido a dieta (a), infecção (b) ou uma interação entre dieta e infecção (c). CP: animais alimentados com dieta de 14% de proteína; LP: animais alimentados com dieta de 4% de proteína; CPI: animais alimentados com 14% de proteína e infectados com *L. infantum*; LPi: animais alimentados com dieta de 4% de proteína e infectados com *L. infantum*.

4.10 Animais infectados (CPI e LPi) apresentam redução significativa dos níveis de S1P

Também analisamos a concentração do ligante de S1P₁ (S1P), no soro dos camundongos, utilizando um kit de ELISA comercial. Interessantemente, de acordo com a análise estatística, os níveis desse esfingolípido foram significativamente reduzidos pela infecção ($p < 0,001$). O teste post-hoc de Tukey revelou diferenças significativas entre os animais desnutridos infectados (LPi) comparados aos desnutridos (LP). Como mencionado, essa diferença foi devida à infecção ($p < 0,001$) (Figura 4.19).

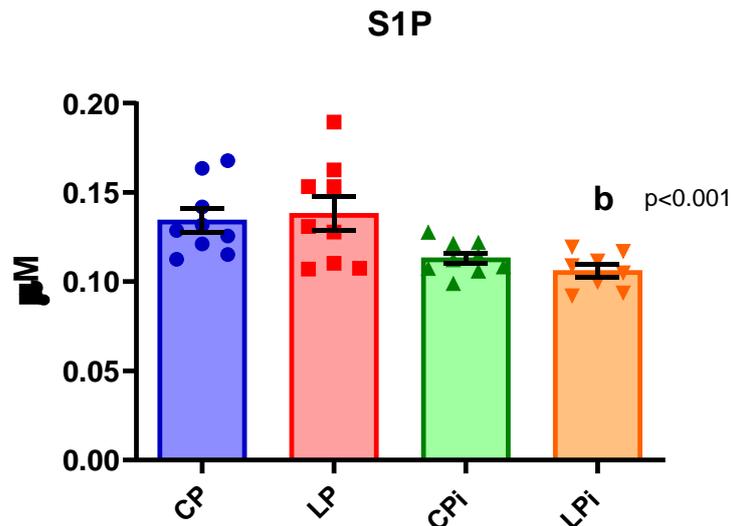


Figura 4.19- Níveis de esfingosina-1-fosfato (S1P) em sangue periférico de camundongos BALB/c. Os níveis foram avaliados em ensaio de ELISA comercial (n=9), conforme as recomendações do fabricante. Diferenças significativas devido a infecção (b) foram determinadas por Two-way ANOVA. O teste post-hoc de Tukey revelou diferenças significativas entre os grupos LP e LPi. CP: animais alimentados com dieta de 14% de proteína; LP: animais alimentados com dieta de 4% de proteína; CPi: animais alimentados com 14% de proteína e infectados com *L. infantum*; LPi: animais alimentados com dieta de 4% de proteína e infectados com *L. infantum*.

4.11 Células T duplo positivas tendem a aumentar no sangue periférico de animais desnutridos

Levando em consideração que (i) o microambiente tímico dos camundongos desnutridos apresenta alterações na expressão de proteínas de MEC, (ii) que animais desnutridos apresentam aumento na percentagem de células T duplo positivas na região medular tímica, e (iii) que o receptor envolvido na emigração de células T do timo está significativamente aumentado nesses animais, levantamos a hipótese de que o timo desses animais estaria exportando um número maior de células imaturas para a periferia e, como consequência, o percentual de células T imunocompetentes na periferia estaria reduzido a ponto de prejudicar a resposta imune necessária para controlar a proliferação do parasita em órgãos linfoides secundários como o baço e linfonodos. Para verificar essa hipótese, analisamos por citometria de fluxo a presença de células T duplo positivas em sangue periférico. A estratégia de *gates* usada nessa análise é apresentada na figura 4.20-A.

Verificou-se que animais desnutridos e desnutridos e infectados apresentam uma tendência ao aumento da frequência dessas células T imaturas (Figura 4.20-B).

Contudo, é importante salientar que esses experimentos necessitam ser repetidos visto que o número de linfócitos TCR β^+ adquiridos no citômetro foi reduzido. Em próximos experimentos será necessário aumentar o número de células adquiridas para verificar se essas diferenças entre os grupos são consistentes e têm significância estatística. Devido à pandemia não pudemos realizar um novo experimento com o modelo animal para incluir ainda nesta dissertação.

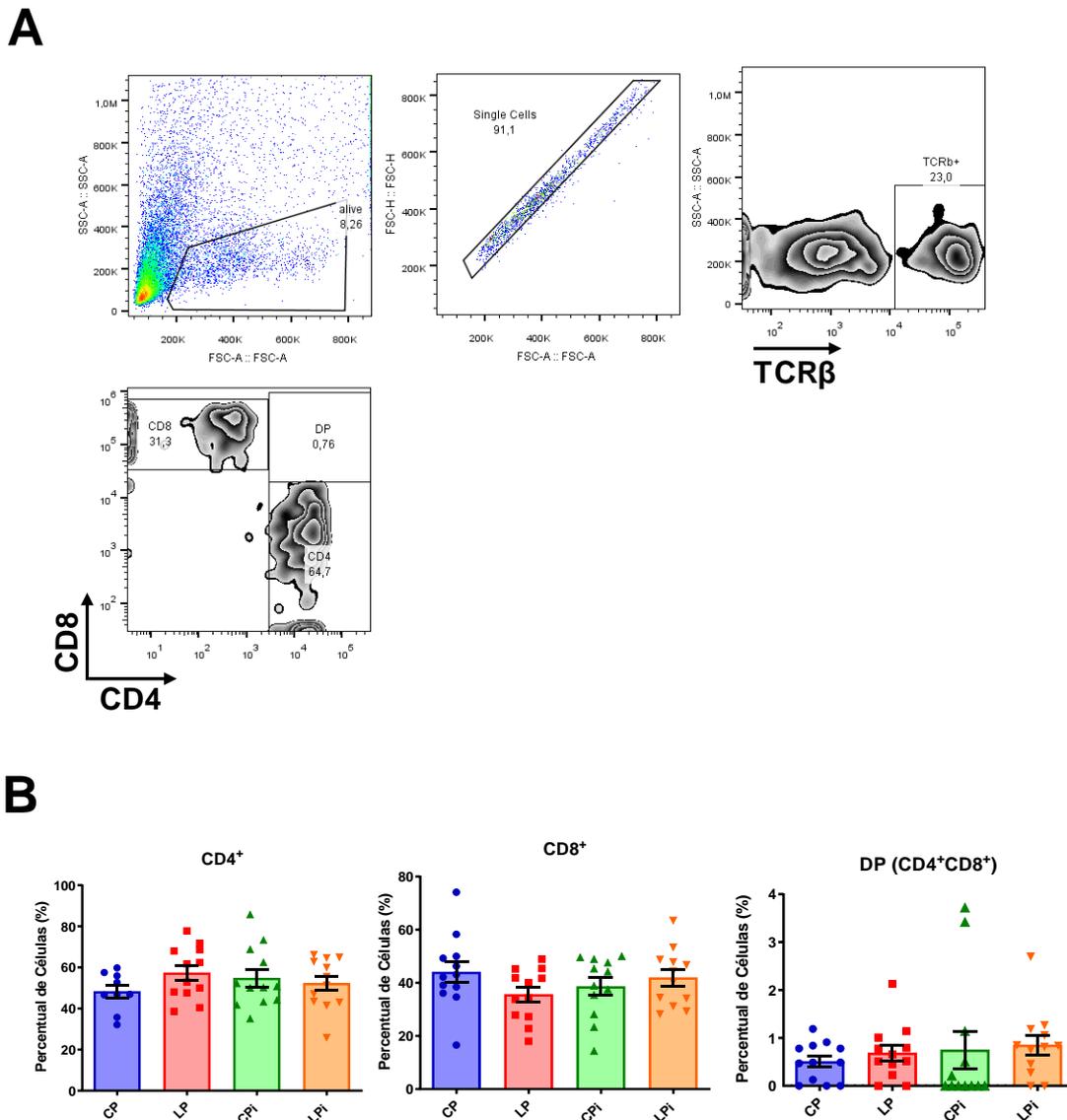


Figura 4.20- Análise das subpopulações de células T em sangue periférico de camundongos BALB/c. (A). Estratégia de *gates* utilizada para selecionar as subpopulações de células T em sangue periférico. **(B).** Os gráficos de barra representam a média do % de células \pm SEM (n=10-12). CP: animais alimentados com dieta de 14% de proteína; LP: animais alimentados com dieta de 4% de proteína; CPi: animais alimentados com 14% de proteína e infectados com *L. infantum*; LPi: animais alimentados com dieta de 4% de proteína e infectados com *L. infantum*.

4.12 A desnutrição e a infecção alteram as subpopulações de células T efetoras no timo

A partir de resultados anteriores do grupo que demonstraram a presença do parasita no timo dos animais infectados (LOSADA-BARRAGÁN *et al.*, 2017), e com nossos resultados que mostram que animais desnutridos apresentam uma carga parasitaria maior do que animais bem-nutridos, nos perguntamos se células ativadas estariam reingressando ao órgão para combater a infecção local. Para testar essa hipótese, realizamos a imunofenotipagem de células T efetoras tomando como base para identificação dessas células a expressão de CD44 e CD62I (CAROW *et al.*, 2016). Além disso, avaliamos dentro da população de células efetoras, a subpopulação de células recém ativadas, as quais expressam também o marcador CD69 (ZIEGLER; RAMSDELL; ALDERSON, 1994). A estratégia de *gates* utilizada para essa imunofenotipagem está apresentada na figura 4.21-A.

Observamos que tanto a desnutrição quanto a infecção afetam o número de células T CD4⁺ efetoras e efetoras recém ativadas. As células T CD4⁺ efetoras de animais desnutridos infectados (LPi) diminuíram significativamente devido à dieta em relação aos bem-nutridos infectados (CPi). (Figura 4.21-B). Interessantemente, o número de células T CD4⁺ efetoras recém ativadas desses animais (CPi) aumentou em resposta à infecção ($p < 0,001$), mas devido à interação com a desnutrição estas células diminuem em animais LPi ($p < 0,01$) (Figura 4.21-B). Observamos também que a dieta baixa em proteína leva à diminuição significativa das células T CD8⁺ efetoras (a, $p < 0,01$) nos animais desnutridos (LP e LPi) em relação aos animais controle (Figura 4.21-B). Não observamos diferenças significativas no número de células T CD8⁺ efetoras recém ativadas entre os grupos.

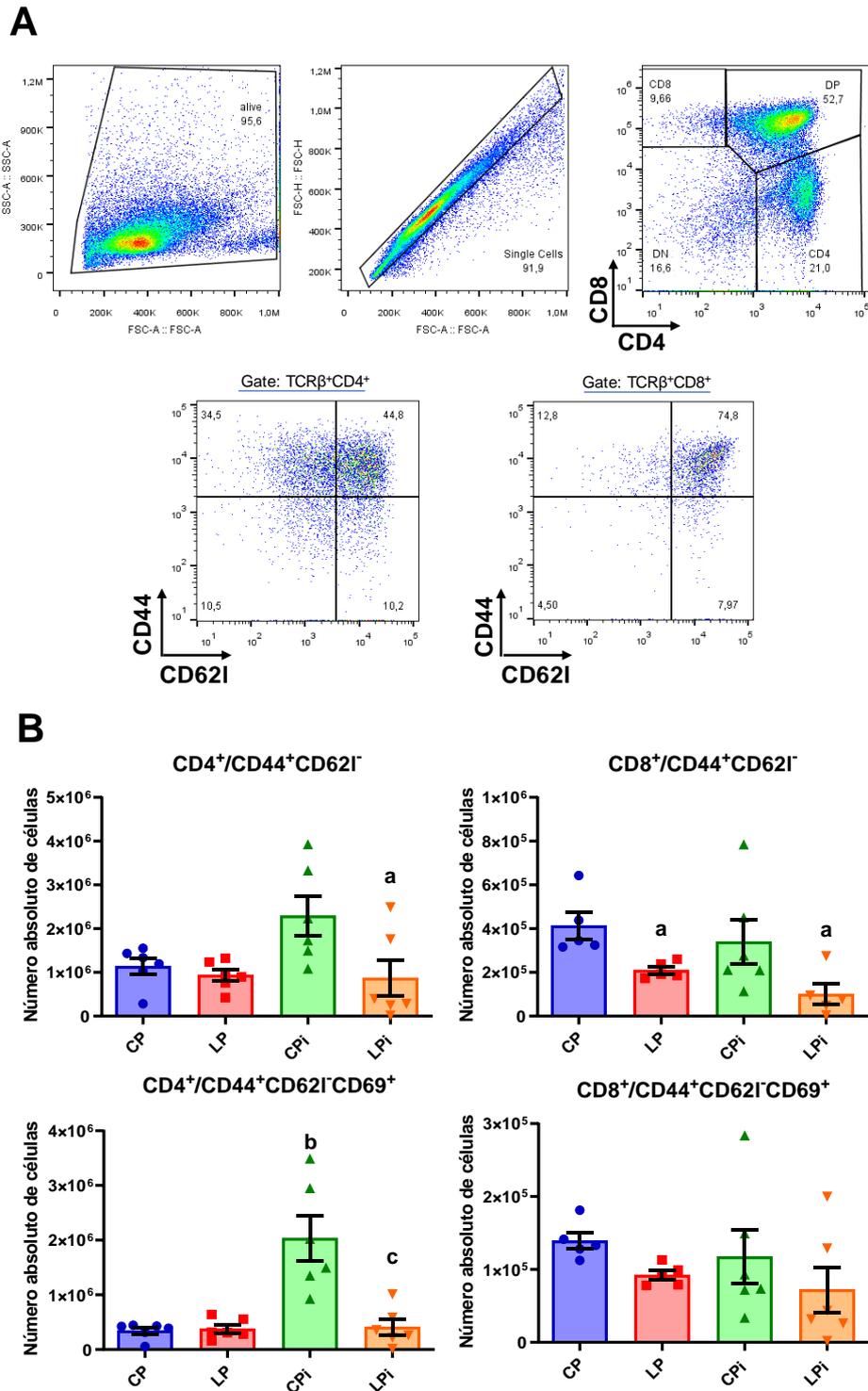


Figura 4.21- Análise das subpopulações de células T efetoras ($CD4^+CD62I^-$) e recém ativadas ($CD44^+CD62I^-CD69^+$) no timo de camundongos BALB/c desnutridos e infectados com *L. infantum*. (A). Estratégia de *gates* utilizada. As células foram marcadas com anticorpos anti-TCR β (conjugado com PE), anti-CD4 (conj. AlexaFluor700), anti-CD8 (conj. APCCy7), anti-CD44 (conj. FITC), anti-CD62I (conj. BV610) e anti-CD69 (conj. APC) para fenotipar células T efetoras e células efetoras recém ativadas. (B). Os gráficos de barra representam a média do número absoluto de células \pm SEM ($n=5-6$). A significância estatística das diferenças observadas devido a dieta (a**, $p<0,01$), infecção (**b**, $p<0,001$) ou interação entre dieta e infecção (**c**, $p<0,01$) foram determinadas por Two-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. CP: animais alimentados com dieta de 14% de proteína; LP: animais alimentados com dieta de 4% de proteína; CPI: animais alimentados com 14% de proteína e infectados com *L. infantum*; LPI: animais alimentados com dieta de 4% de proteína e infectados com *L. infantum*.**

5. DISCUSSÃO

A desnutrição proteico-calórica é conhecida por comprometer o sistema imunológico e, conseqüentemente, aumentar a susceptibilidade a diversas doenças infecciosas, tanto em crianças como em adultos (CARRILLO *et al.*, 2014; IBRAHIM *et al.*, 2017; WALSON; BERKLEY, 2018). Todavia, os mecanismos moleculares pelos quais a desnutrição afeta a função imunológica na infecção com *Leishmania* ainda não estão bem estabelecidos. Neste trabalho, foi analisado o efeito da restrição proteica no microambiente tímico de animais infectados com *L. infantum* e suas conseqüências na resposta imune à infecção. Durante o período experimental, os animais foram pesados a cada 3 dias, para acompanhar a perda de peso corporal. No dia da eutanásia (21º dia) foi constatado que os animais que receberam a dieta baixa em proteína apresentavam 66,85% do peso corporal esperado (comparados aos bem-nutridos), indicando um estado de desnutrição moderada, o qual rapidamente poderia evoluir a grave (<60%), de acordo com a escala de desnutrição murina proposta por ANSTEAD e colaboradores (ANSTEAD *et al.*, 2001). Esta escala reflete, em crianças, um prognóstico ruim e tratamento mais complicado, pois frequentemente pacientes com grau moderado de desnutrição necessitam de cuidados hospitalares. No terceiro grau de desnutrição (desnutrição grave), os pacientes apresentam sérias alterações somáticas e funcionais incluindo psicológicas (GOMEZ *et al.*, 1956). Portanto, nosso modelo reflete uma desnutrição mais complicada de ser tratada, a qual, em humanos, requereria de assistência hospitalar, podendo progredir para morte caso não seja tratada.

Além disso, em animais desnutridos (LP e LPi), a diminuição significativa dos níveis de IGF-1 e leptina, reconhecidos marcadores de desnutrição, corroboram a validade do nosso modelo. Adicionalmente, os níveis de corticosterona, um conhecido marcador de estresse, foram significativamente aumentados nos animais desnutridos, indicando que nosso modelo obedece ao esperado para indivíduos desnutridos (FREEMARK, 2015). Nossos resultados estão de acordo com prévios estudos que mostram a alteração desses hormônios em indivíduos com desnutrição. Estudos conduzidos a fim de se compreender o perfil hormonal em indivíduos desnutridos, observaram baixos níveis de leptina e IGF-1, ao passo que foram vistos altos níveis de grelina e cortisol em crianças desnutridas hospitalizadas no continente Africano (FREEMARK, 2015). A leptina é um hormônio secretado por adipócitos que possui

papel importante no metabolismo, devido sua ação supressora do apetite sinalizado pelo hipotálamo (FRIEDMAN, 2002). A redução da concentração de leptina leva ao aumento dos níveis de hormônios glicocorticóides, devido ao estímulo do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, que por consequência aumentam a apoptose dos timócitos, sendo então um mecanismo associado à depleção de timócitos em indivíduos desnutridos (SAVINO *et al.*, 2007). Um estudo verificou que pacientes com diagnóstico de LV, durante a fase ativa da doença, apresentam níveis reduzidos de leptina, sendo esse achado correlacionado com a diminuição de leucócitos, hemoglobina e albumina (FIEVEZ *et al.*, 2019). Outro hormônio frequentemente associado com a desnutrição é o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), o qual tem sido utilizado como marcador de desnutrição em pacientes que realizaram transplante intestinal (VRAKAS *et al.*, 2015), entre outros.

Para ser uma dieta isocalórica, a dieta contendo 4% de proteína é complementada com o aumento de outros macronutrientes, principalmente carboidratos, para fornecer a quantidade de calorias necessárias. Interessantemente, não observamos diferenças nos níveis glicêmicos dos animais que receberam dieta com baixo teor de proteína. Em condições fisiológicas, parte da glicose ingerida é armazenada na forma de glicogênio. Ao chegar na sua capacidade máxima de armazenamento no fígado, a glicose que está presente em excesso é desviada para outras rotas metabólicas como a síntese de ácidos graxos, devido ao aumento das concentrações de intermediários do ciclo de Krebs como acetil-coA, assim como do produto final da glicólise, o piruvato (ADEVA-ANDANY *et al.*, 2016). Com o aumento na síntese de ácidos graxos, esses ácidos podem ser armazenados no tecido adiposo, para ser posteriormente utilizados como forma de energia, em situações de jejum prolongado. Em nosso experimento, uma observação feita durante a coleta dos órgãos dos animais no dia da eutanásia, foi o fato de que os órgãos de animais desnutridos apresentavam um aspecto gorduroso. Além disso, observamos também o acúmulo de tecido adiposo em órgãos como coração e intestino. Provavelmente esse achado poderia ser explicado através desse mecanismo bioquímico da síntese de ácidos graxos.

Estudos usando dietas com restrição de proteínas demonstram que a diminuição proteica estimula a secreção do fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF21), promovendo hiperfagia, devido à ligação desse hormônio aos receptores β -Klotho presentes no cérebro (HILL *et al.*, 2017; LAEGER *et al.*, 2014). Nesta dissertação pode-

se verificar que os animais alimentados com a dieta com baixo teor de proteína (4%), consumiram maior quantidade da ração quando comparados com animais alimentados com a dieta de 14% de proteína. Além desse, existem outros mecanismos que também são associados com o aumento da hiperfagia, como (i) redução das concentrações dos hormônios leptina e IGF-1; (ii) aumento de Grelina; (iii) aumento de transcritos de moléculas orexigênicos como o neuropeptídeo Y (NPY) no hipotálamo de roedores (PEZESHKI; CHELIKANI, 2021). Em contrapartida, da mesma forma que existem mecanismos que induzem a hiperfagia, também existem peptídeos anorexigênicos que induzem hipofagia devido ao alto consumo de proteínas, como por exemplo o peptídeo YY e o peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1), sendo esses fatos bem reportados para roedores (REIDELBERGER; HAVER; CHELIKANI, 2013; ZAPATA *et al.*, 2018). Em nosso modelo verificamos que animais desnutridos apresentaram baixos níveis de leptina e IGF-1 e também consumiram mais de ração do que animais bem-nutridos; então possivelmente neste modelo, a hiperfagia esteja relacionada à redução de níveis sistêmicos desses hormônios.

O timo é um órgão linfoide primário extensamente reconhecido por ser alvo da desnutrição (LOSADA-BARRAGÁN *et al.*, 2017; SAVINO *et al.*, 2007; SAVINO & DARDENNE, 2010). Vários trabalhos na literatura demonstram que a atrofia tímica é um forte fator de risco para mortalidade em crianças, tendo em vista o seu papel chave na maturação de linfócitos T e consequente competência imunológica (AABY *et al.*, 2002; GARLY *et al.*, 2008). Interessantemente, trabalhos prévios do nosso grupo demonstraram que o timo dos animais desnutridos (LP e LPi) apresentava tamanho e peso significativamente inferior que o timo dos camundongos controle (CUERVO-ESCOBAR *et al.*, 2014). Nesta dissertação, embora não mostrado no corpo do texto, nós também observamos essa diminuição no peso do órgão em animais desnutridos. Além disso, constatamos redução drástica da celularidade total do timo acompanhada por alterações na arquitetura do microambiente tímico, as quais em conjunto contribuem para um órgão atrofiado e sugerem que a resposta imune mediada por células T pode estar gravemente comprometida nos animais desnutridos. Em trabalhos prévios do grupo, durante a análise morfológica do órgão, foi observado que camundongos desnutridos infectados (LPi) apresentaram um aumento da área medular em detrimento da área cortical tímica e uma redução significativa na área cortical quando comparados a animais bem-nutridos infectados (CPi) (LOSADA-BARRAGAN *et al.*, 2019). Já que

proporções de córtex:medula menores de 2:1 são consideradas indicadores de atrofia tímica (ELMORE, 2006), e visto que na área cortical ocorrem os processos de diferenciação de timócitos e de seleção positiva e negativa em resposta a estímulos combinados de moléculas secretadas como quimiocinas e interação com moléculas de matriz extracelular e células epiteliais corticais, nos perguntamos se a desnutrição também poderia alterar essas moléculas no microambiente tímico, resultando em uma resposta deficiente frente a infecção na periferia.

Quando avaliamos a expressão e distribuição de fibronectina e laminina no timo, observamos diferenças significativas na deposição dessas moléculas entre os grupos experimentais. Interessantemente, apesar da região cortical do timo dos animais LP e LPi estar diminuída (LOSADA-BARRAGAN *et al.*, 2019), observou-se o aumento de fibronectina nesta região. Além disso a laminina também estava aumentada no córtex dos animais LPi. Então, além de apresentar uma menor área, o córtex tímico de animais desnutridos e infectados apresenta uma maior deposição de moléculas de matriz extracelular. Estudos em modelos de infecção por *T. cruzi*, também observaram aumento de proteínas de MEC (SAVINO, 1990). A fibronectina e a laminina são responsáveis pela migração dos timócitos pelo microambiente tímico através de interações mediadas por receptores do tipo integrina (SAVINO *et al.*, 2015), constituindo-se assim como moléculas cruciais para a correta maturação de linfócitos T na região cortical. Essa interação modula a adesão de timócitos a células tímicas epiteliais (TECs) e também desempenha um papel no tráfego de timócitos através das células “nurse” do timo (TNCs), afetando tanto a entrada como a saída de linfócitos nesse nicho microambiental particular (SAVINO *et al.*, 2000). Estudos *in vivo* usando camundongos deficientes para laminina-2 (*dy/dy*) mostraram que o timo desses animais era menor e desorganizado, com reduzido número de timócitos, principalmente os duplo-positivos (MAGNER *et al.*, 2000). Nesta dissertação observamos que a atrofia tímica de animais desnutridos infectados (LPi) é acompanhada por aumento na deposição de laminina no córtex e depleção de timócitos duplo-positivos (CUERVO-ESCOBAR *et al.*, 2014; LOSADA-BARRAGÁN *et al.*, 2017), sugerindo que defeitos na expressão de laminina, seja pelo seu aumento ou diminuição, afetam particularmente a população de timócitos DP. Estudos em crianças desnutridas têm reportado um aumento na matriz extracelular intralobular tímica contendo fibronectina, laminina e

colágeno tipo IV e esse aumento é correlacionado positivamente com o grau de depleção dos timócitos (LYRA *et al.*, 1993).

Em nosso modelo, os defeitos na expressão de moléculas da MEC que resultam na sua deposição aumentada no córtex tímico foram causados pela desnutrição, mas não pela infecção com *L. infantum* apesar do parasito ser encontrado no timo. Recentemente, foi mostrado que a adesão à matriz é fundamental para a sobrevivência e homeostase de células epiteliais mamárias sob restrição alimentar (MURANEN *et al.*, 2017). Fibroblastos privados de nutrientes em cultura secretam proteínas de matriz que mantêm o crescimento de células epiteliais mamárias sob restrição de nutrientes. Essas células quando submetidas à restrição de nutrientes internalizam a laminina junto com a integrina $\beta 4$. A laminina internalizada se localiza nos lisossomos, levando à um aumento nos níveis de aminoácidos intracelulares e na sinalização de mTORC1, evitando assim a morte celular (MURANEN *et al.*, 2017). Então, caberia hipotetizar que, em nosso modelo de desnutrição, células do estroma tímico poderiam estar secretando moléculas de matriz para manter a sobrevivência dos timócitos em desenvolvimento. Em linha com essa ideia, foi descrito que fibroblastos capsulares tímicos produzem diferentes proteínas de matriz extracelular (NITTA & TAKAYANAGI, 2021). Além disso, nosso grupo observou um aumento significativo nos níveis de expressão do gene anti-apoptótico *Bcl-2* no timo de animais desnutridos (LOSADA-BARRAGÁN *et al.*, 2017). Contudo, experimentos adicionais são necessários para saber se esse mecanismo de proteção e sobrevivência é acionado no timo de animais desnutridos.

Por outro lado, visto que as interações intratímicas mediadas por integrinas e moléculas como fibronectina e laminina intervêm diretamente em estágios importantes do desenvolvimento celular de células T no timo (COTTA-DE-ALMEIDA *et al.*, 2003), o aumento dessas moléculas da MEC na região cortical dos animais LPi provocaria um efeito deletério na correta maturação dos timócitos nesta região e, conseqüentemente, as células T não conseguiriam sofrer adequadamente os processos de seleção negativa e positiva e poderiam estar migrando precocemente para a região medular. De fato, nós observamos um aumento na marcação de células duplo positivas na medula tímica dos animais desnutridos. Esse resultado será discutido mais adiante.

Tem sido sugerido que a MMP-10 pode afetar a migração de diversos tipos celulares (KRAMPERT *et al.*, 2004) por meio da degradação de proteínas de MEC, utilizando como substrato colágeno (III e IV), gelatina, elastina, caseína, assim como

fibronectina e laminina (KAPOOR *et al.*, 2016). Uma atividade desregulada da MMP10 pode comprometer a migração celular, uma vez que esses substratos interagem com receptores presentes nas células. A super-expressão de MMP-10 em camundongos transgênicos leva alteração na deposição e localização de laminina durante a cicatrização de feridas nesses animais (KRAMPERT *et al.*, 2004). As interações entre MMP10 e moléculas de matriz extracelular como fibronectina e laminina no timo são pouco estudadas; dado o aumento dessas moléculas da MEC no nosso modelo, era possível sugerir que houvesse defeitos na expressão e/ou atividade desta metalopeptidase que explicassem o acúmulo de moléculas da MEC no córtex tímico. Contudo, observamos o contrário, *i.e.*, os níveis de MMP-10 também estão aumentados em animais desnutridos. O aumento dessa enzima no parênquima tímico, mais especificamente na região cortical, poderia indicar um remodelamento intenso da MEC, no esforço de recuperar a homeostase do tecido que se apresenta bastante alterado com o aumento de fibronectina e laminina devido à desnutrição. Por outro lado, não podemos descartar que apesar da enzima apresentar níveis aumentados nesses animais, a sua atividade esteja comprometida, ou seja, a enzima está presente, mas não está ativa. Cabe destacar que toda metaloproteinase (MMP) é produzida na forma de zimógeno sendo, portanto, necessária a remoção do domínio pró-peptídeo para gerar uma MMP com sítio catalítico ativo (GILL *et al.*, 2004). Também já tem sido descrito o mecanismo pelo qual é regulada a ativação das MMPs em tecidos, a nível transcricional, em resposta a fatores de crescimento e citocinas (STAMENKOVIC, 2000). Contudo, resultados não publicados do grupo mostram atividade de metalopeptidases, avaliada por enzimografia, em todos os grupos analisados, o que sugeriria que essas enzimas estariam ativas. No entanto, estas observações não indicam qual tipo de metalopeptidase é a responsável pela atividade e precisam ser feitos ensaios adicionais para determinar se a MMP10 especificamente é ativa nesses animais.

A quimiocina CCL21 é um ligante produzido e secretado por células epiteliais medulares tímicas (mTECs) (TAKAHAMA, 2006). Esta quimiocina é responsável pela atração, para a região medular, de células T Simples Positivas (SP) que sobreviveram aos processos de beta seleção e seleção positiva, os quais ocorrem na região cortical e no espaço da junção cortico-medular (CMJ) (KLEIN *et al.*, 2014; KONDO; OHIGASHI; TAKAHAMA, 2018). Na medula tímica, as células SP permanecem por alguns dias até serem exportadas para periferia. A quimioatração das células é mediada pela afinidade

entre o receptor CCR7 (e CCR9) expresso na superfície de células T SP maduras. Foi demonstrado que dentre os ligantes de CCR7, a isoforma A de CCL21 apresentava maior papel na atração das células T SP/CCR7⁺ para a zona medular (KOZAI *et al.*, 2017) . Além disso, foi observado que na ausência dessa quimiocina há uma falha na tolerância central que, por consequência, pode levar à predisposição para desenvolver autoimunidade (JAMES; JENKINSON; ANDERSON, 2018).

Nossos resultados mostraram que animais desnutridos (LP) e desnutridos infectados (LPi) apresentam redução significativa nos níveis de CCL21 no fluido intersticial tímico, o que sugeriria que células T SP não estariam recebendo o estímulo apropriado para migrar à região medular. Dado que em trabalhos anteriores do grupo observamos aumento significativo nos níveis de transcritos para *Ccr7* e para *Cd62L* em timócitos de animais desnutridos infectados (LOSADA-BARRAGÁN *et al.*, 2017), e aumento no tamanho da área medular em detrimento da região cortical nesses camundongos(LOSADA-BARRAGÁN *et al.*, 2019), pensamos que a desnutrição (i) favoreceria um acúmulo de células SP maduras na medula tímica que ficariam retidas levando ao aumento dessa região, ou (ii) favoreceria uma maturação incorreta dos timócitos que com o aumento da expressão de *Ccr7* e *Cd62L* migrariam precocemente para a região medular aumentando, portanto, o tamanho desta. Essas conjecturas envolveriam também um aumento nos níveis de CCL21. Contudo, observamos o contrário: a abundância dessa proteína foi diminuída nos animais desnutridos. Portanto, se levamos em conta também que há diminuição das subpopulações de SP no timo, em conjunto, nossos resultados sugerem que as poucas células SP que migram do córtex para a medula estão superexpressando o CCR7 para compensar a diminuição dos níveis de CCL21 na região medular tímica e dessa maneira tentar completar o processo de maturação.

Além disso, podemos pensar que essas alterações teriam um importante impacto negativo na resposta imune frente a infecção com *L. infantum*, pois sem a presença das células imunocompetentes na periferia, não haveria o controle da infecção, o que condiz com nosso modelo experimental, tendo em vista que animais desnutridos infectados (LPi) apresentam aumento significativo e precoce de carga parasitária no baço com apenas 2 semanas pós-infecção quando comparados com os animais bem-nutridos infectados (CPi) (CUERVO-ESCOBAR *et al.*, 2014). Os nossos resultados, com respeito aos níveis de CCL21 no timo, vão ao encontro de relatos da literatura de

diminuição de transcritos desta quimiocina em linfonodos de animais desnutridos e infectados com *L. donovani* (IBRAHIM *et al.*, 2014). Os níveis de mRNA para CCL21 em camundongos desnutridos e infectados foram 2X diminuídos quando comparados com camundongos apenas desnutridos ou bem-nutridos (IBRAHIM *et al.*, 2014). Nos linfonodos, a redução da expressão de CCL21 poderia prejudicar a migração de células dendríticas ativadas na pele para o linfonodo drenante (ALVAREZ; VOLLMANN; VON ANDRIAN, 2008; OHL *et al.*, 2004). Por outro lado, a diminuição significativa dos níveis de CCL21 em animais desnutridos também poderia sugerir que esses camundongos estariam predispostos a apresentarem falhas na tolerância central, uma vez que timócitos selecionados positivamente de camundongos nocaute para o gene *CCL21a* não se acumulavam na região medular, e como consequência eram mais propensos a desenvolver uma inflamação das glândulas lacrimais (dacrioadenite) autoimune (KOZAI *et al.*, 2017).

Com respeito às subpopulações de células T no timo observamos que camundongos desnutridos apresentaram uma diminuição significativa no número absoluto de subpopulações de células T duplo negativas (DN). As subpopulações de células T DN podem estar reduzidas como resultado da baixa produção de progenitores tímicos recentes na medula óssea, ou por indução da apoptose nessas células, ou por redução dessas células em algum estágio de desenvolvimento específico (DN1-DN4) (MAJUMDAR *et al.*, 2019), o que poderia comprometer no número final de células T simples positivas maduras que seriam exportadas para a periferia. Camundongos com baixos níveis de leptina circulante (em situações de privação de alimentação), assim como observado em nosso modelo, apresentam redução significativa da subpopulação de células T DN. A administração de leptina exógena foi capaz de aumentar substancialmente a celularidade no timo, incluindo das células T DN (HOWARD *et al.*, 1999). Levando em consideração a redução no número absoluto de células DN, em animais LP e LPi, poderíamos sugerir que a chegada de precursores da medula óssea está reduzida. Contudo é necessário avaliar como está a produção desses progenitores oriundos da medula óssea para se chegar a um cenário mais preciso. Além disso, o ensaio precisa também ser repetido para confirmar estas observações.

Análise das diferentes subpopulações de células DN mostrou que as quatro subpopulações sofreram diminuição significativa pela desnutrição tanto em animais apenas desnutridos (LP) como nos desnutridos infectados (LPi). Além disso, as células

DN1 e DN2, que são aumentadas pela infecção nos animais CPi, sofrem uma diminuição significativa nos estágios posteriores DN3 e DN4. Cabe destacar que o aumento de DN1 nos animais bem-nutridos infectados (CPi) é anulado pela desnutrição nos animais LPi. Isso sugere que se a infecção é sentida no timo de tal forma a potencializar a proliferação/diferenciação de DN1, esse efeito é anulado pela desnutrição e resultaria na diminuição das subpopulações dos estágios posteriores de diferenciação. De forma interessante, foi demonstrado que em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com leishmaniose cutânea, células DN são a segunda fonte mais abundante de produção de IFN- γ após as células T CD4⁺ (ANTONELLI *et al.*, 2006; BOTTREL *et al.*, 2001). Caso essas células possam participar da resposta inflamatória durante a infecção, essa capacidade poderia ser anulada quando há uma condição de desnutrição prévia à infecção.

Canonicamente, é esperado que encontrar apenas células T simples positivas na região medular tímica, enquanto células DP estariam presentes na região cortical (JAMES; JENKINSON; ANDERSON, 2018). Como mencionado antes, nos hipotetizamos que os defeitos observados no microambiente tímico poderiam resultar em defeitos na maturação das células e migração precoce de células imaturas do córtex para a medula. Apesar das limitações da nossa contagem de células DP na medula, a análise sugere que há um aumento significativo no número de células DP por mm² na medula tímica. Esse resultado apoiaria a ideia de que timócitos DP estão chegando precocemente à medula tímica, e, portanto, não estão passando pelo devido processo de diferenciação em células T SP, o qual ocorre durante a seleção positiva, próximo a junção cortico-medular.

É importante destacar que, durante a seleção positiva, é necessária a interação entre a célula DP e a TEC para o reconhecimento do peptídeo apresentado pelo complexo de histocompatibilidade (MHC) da TEC, e que dependendo qual tipo de MHC essa célula expresse (I ou II), vai direcionar esse timócito DP a se diferenciar em célula T SP (CD4⁺ ou CD8⁺). Portanto, qualquer distúrbio em TECs pode prejudicar os eventos da seleção positiva e, por consequência, permitir a chegada de células DP à região medular. Interessantemente, em trabalhos prévios do grupo, já foi descrito que animais desnutridos apresentam redução significativa na abundância de citoqueratinas K8 e K18, produzidas por TECs (LOSADA-BARRAGÁN *et al.*, 2019). Adicionalmente, em modelo de paracoccidiodomicose, também já foi demonstrado a redução da celularidade

de TECs pela infecção no timo (ALVES DA COSTA *et al.*, 2016). Sendo assim, esses dados em conjunto, reforçam a ideia de que defeitos durante a seleção positiva possam comprometer a correta chegada de células T maduras na região medular e ao mesmo tempo favoreçam a chegada precoce de células DP a essa região.

Caso timócitos DP estejam chegando à medula, é possível sugerir também que eles possam sair do timo imaturas. Por isso medimos a expressão do receptor de esfingosina-1-fosfato do tipo 1 (S1P₁) através de imuno-histoquímica. Esse receptor tem um papel essencial na emigração de células T maduras para periferia seguindo o gradiente de concentração do ligante (S1P) presente no sangue (CHIBA *et al.*, 2006). Além disso, tem sido descrito na literatura que esse receptor está envolvido em distúrbios de migração de timócitos em modelo experimental de diabetes (LEMOS *et al.*, 2018). Com base na determinação do percentual de área marcada, foi possível verificar que houve aumento significativo na expressão desse receptor tanto na região cortical, como na região medular de camundongos desnutridos (LP) e desnutridos infectados (LPi) quando comparados com o grupo controle (CP). Esse resultado apoiaria a hipótese de uma emigração de células T imaturas para a periferia.

Em modelo murino de infecção com *T. cruzi* foi demonstrado que alterações em eventos chave do metabolismo de S1P podem provocar a saída prematura de células T para periferia, tanto de células DP, mas principalmente de células DN (CD4⁺CD8⁻) (LEPLETIER *et al.*, 2014). Nesse trabalho, os autores realizaram medição dos níveis de transcritos de enzimas envolvidas no metabolismo da S1P, verificando que a enzima responsável pela degradação de S1P (S1P Liase) estava superexpressa nos camundongos infectados com *T. cruzi*, ao passo que o nível de transcritos para enzimas envolvidas com a síntese de S1P (S1P quinases) estavam diminuídos. Também foi observado que os timócitos DN de animais infectados expressavam níveis elevados do receptor de S1P (S1P₁) (LEPLETIER *et al.*, 2014). Interessantemente, nesse trabalho os autores encontraram níveis aumentados de S1P₁ na região cortical de camundongos infectados quando comparados com camundongos controle. Em nosso trabalho, não conseguimos observar esse aumento nos animais bem nutridos e infectados (CPi). No entanto, até o presente momento, não foi descrito na literatura se a infecção por *Leishmania* consegue modular algum fator chave no metabolismo de S1P no microambiente tímico, resultando na saída de células T prematuras. De todo modo,

podemos observar que tanto a desnutrição (nosso trabalho) quanto a infecção (LEPLETIER *et al.*, 2014) podem levar a um aumento de S1P₁ no córtex tímico.

S1P promove a migração de células T a partir da ligação com S1P₁ (BAEYENS *et al.*, 2015). Adição de análogos de S1P como FTY720 pode promover o sequestro de linfócitos T em órgãos linfoides, com consequente linfopenia na periferia (MANDALA *et al.*, 2002). Nesse contexto, nossos achados de aumento na expressão de S1P₁ no córtex tímico de animais desnutridos poderiam sugerir que os timócitos de animais LPI tendem a aumentar a expressão de S1P₁ na tentativa de aumentar a sensibilidade dessas células às baixas concentrações do ligante no sangue. Outra hipótese é que a redução dos níveis de S1P no sangue, deixaria o microambiente com uma concentração maior de S1P e isso promoveria a retenção de timócitos no timo, e por consequência prejudicaria a resposta de células T na periferia contra o parasito. Contudo, isso precisaria ser demonstrado em experimentos adicionais.

Em infecções *in vitro* de macrófagos de linhagem humana com *L. donovani*, foi observado que o parasita inibe a fosforilação da esfingosina quinase 1 (SPHK1), diminuindo, portanto, a síntese de S1P o que, por consequência, favoreceria o aumento da carga parasitária, uma vez que S1P leva a uma redução da carga parasitária induzida pela via ERK1/2 e ativação da via p38 que limitam a infecção (ARISH *et al.*, 2018). Além disso, em *L. major*, foi demonstrada a presença da esfingosina quinase SphK A, e seu papel na sobrevivência e na virulência do parasito no hospedeiro (ZHANG *et al.*, 2013). À luz desse reportes seria possível sugerir que os parasitas poderiam modular a sinalização de S1P, provavelmente através de SphK A. Interessantemente, em nosso trabalho, verificamos que as concentrações de S1P no soro estavam diminuídas apenas nos animais infectados por *L. infantum*, bem-nutridos e desnutridos, reforçando a ideia de que espécies de *Leishmania* conseguem modular a síntese de S1P nas células dos hospedeiros, subvertendo assim a resposta mediada por células que migram em resposta a esse ligando, sobretudo na periferia. Porém, novos estudos devem ser realizados para corroborar se o parasita consegue modular essa via e o mecanismo subjacente.

Durante a escrita desta dissertação não foi possível achar reportes descrevendo se a condição de desnutrição proteica pode alterar o metabolismo de S1P. Em contrapartida, em modelo de obesidade já foi demonstrado o aumento dos níveis de

S1P no plasma, tanto em humanos, quanto em roedores (GUITTON *et al.*, 2020). Esse aumento é oriundo da maior oferta de ácidos graxos livres na corrente sanguínea que, quando acumulados em tecidos não adiposos, são metabolizados em derivados lipídicos como ceramida (fonte de S1P) (GUITTON *et al.*, 2020).

Para constatar se animais desnutridos e infectados apresentam aumento na frequência de células T imaturas na periferia, analisamos por citometria de fluxo o fenótipo de células em sangue periférico. Verificamos que os animais LPi apresentavam um modesto aumento percentual de células DP no sangue, entretanto, a repetição desse experimento é necessária devido ao fato da quantidade de células TCR $\alpha\beta^+$ ter sido baixa para a realização das análises. Na literatura tem sido descrito o aumento de células DP, no sangue periférico, em diversas doenças infecciosas, como doença de Chagas, malária e pneumonia induzida por *Chlamydia pneumoniae* (ANDRADE *et al.*, 2008; FRANCELIN *et al.*, 2011; MORROT *et al.*, 2011; PENTTILLA *et al.*, 1998). Apesar de preliminares, os resultados estão de acordo com o que tem sido demonstrado na literatura. Alguns autores demonstram que essas células imaturas poderiam apresentar função na periferia. Ao contrário do observado em infecções com *T. cruzi* (MORROT *et al.*, 2011), o *status* e papel das células DP na periferia durante a LV não têm sido estudada. Em contrapartida, em outras patologias como HIV, câncer e doenças autoimunes, a presença dessas células DP na periferia é alvo de muita controvérsia (OVERGAARD *et al.*, 2015) e sua função em cada modelo experimental tem se apresentado de forma muito particular e específica. No geral, essas células DP podem apresentar fenótipos citotóxicos com produção de perforinas e granzimas, assim como podem apresentar fenótipo supressivo com presença de IL-10, IFN- γ , mas não IL-4 (VAN KAER *et al.*, 2013). Seria interessante verificar em próximos ensaios qual é o fenótipo dessas células DP frente à infecção pelo parasito no nosso modelo.

Com respeito às alterações nas subpopulações de células T SP (CD4⁺ ou CD8⁺) observadas no timo dos grupos experimentais aqui analisados, tem sido reportado na literatura que infecções por *Salmonella typhimurium* podem causar uma redução da celularidade de células T devido à atrofia tímica observada nesses animais (MAJUMDAR *et al.*, 2017). Em relação à desnutrição, em modelo de infecção latente por micobactérias, observou-se que a situação de privação de nutrientes e calorias pode estar associada com a baixa frequência de células T CD8⁺ e T CD4⁺ (RAJAMANICKAM *et al.*, 2019). Nossos resultados estariam de acordo com esses

achados no modelo de desnutrição e infecção com micobactérias. Interessantemente, em modelos que abordam diferentes metodologias para indução de atrofia tímica, foi observado que as subpopulações de T CD4⁺ e T CD8⁺ estavam diminuídas em relação ao grupo de animais não tratados. Nesta dissertação e em trabalhos anteriores do grupo verificamos as mesmas observações, ou seja, atrofia tímica está acompanhada por redução de subpopulações de células SP. Portanto, nossos resultados estão de acordo com reportes da literatura, nos quais o timo sofre depleção na celularidade em condições patológicas.

A expressão do marcador de superfície CD69 em células T periféricas, tem sido associado com a sua ativação recente (ZIEGLER; RAMSDELL; ALDERSON, 1994). A expressão de CD69 é rapidamente induzida na superfície de células T logo após a ativação, em torno de 30 a 60 min, e por isso, este receptor é usado como marcador precoce de ativação de linfócitos (CIBRIÁN; SÁNCHEZ-MADRID, 2017). No entanto, durante uma etapa do desenvolvimento de células T no timo, tanto timócitos murinos, assim como timócitos humanos expressam esse marcador de superfície (BUNTING; COMERFORD; MCCOLL, 2011; JUNG *et al.*, 1990; T *et al.*, 2001). Na literatura tem sido reportadas duas subpopulações de timócitos simples positivos na região medular tímica: (i) timócitos simples positivos imaturos (CD69⁺CD62L⁻) e (ii) timócitos simples positivos maduros (CD69⁻CD62L⁺), sendo essa última subpopulação a que está completamente madura e pronta para sair para periferia (BUNTING; COMERFORD; MCCOLL, 2011). Apesar dessas subpopulações serem bem caracterizadas, ainda não tem sido descrito o papel dos timócitos simples positivos imaturos, no desenvolvimento de células T (BUNTING; COMERFORD; MCCOLL, 2011). Nesse contexto, a análise de citometria realizada nesta dissertação, das subpopulações de células T CD4⁺/CD44⁺CD62L⁻CD69⁺ ou CD8⁺/CD44⁺CD62L⁻CD69⁺ apresenta o viés de marcar a subpopulação simples positiva imatura da medula, assim como células SP que foram ativadas na periferia e migraram de volta para o timo para a resolução da infecção local com o parasito.

A reentrada ao timo de células T maduras ativadas na periferia com o objetivo de controlar a infecção local já foi demonstrada e discutida anteriormente em modelos de infecção por *M. tuberculosis* e *Paracoccidioides brasiliensis* (ALVES DA COSTA *et al.*, 2016; NOBREGA *et al.*, 2010). Dado que em trabalhos anteriores mostramos a presença do parasito no timo (LOSADA-BARRAGÁN *et al.*, 2017), e que observamos

um aumento significativo na carga parasitaria no timo de animais desnutridos (esta dissertação), resolvemos avaliar a presença de células T efetoras (Te) no timo, para verificar se a desnutrição e/ou a infecção favoreceriam a reentrada de células ativadas na periferia para realizar o controle da infecção no timo. Em nosso trabalho descrevemos pela primeira vez o aumento do número absoluto de células efetoras T CD4⁺ (CD4⁺/CD44⁺CD62L⁻CD69⁺), em animais bem nutridos e infectados (CPI) frente à infecção por *L. infantum*. Ao contrário do observado em animais CPI, os animais desnutridos infectados (LPi) não exibem aumento na chegada de células T efetoras CD4⁺ o que sugere que a resolução da infecção pelo parasito no microambiente tímico poderia estar prejudicada. Interessantemente, em modelo de infecção por *M. avium*, foi observado um aumento de células T específicas para o patógeno no timo (NUNES-ALVES *et al.*, 2013). Nesse modelo, os autores demonstraram que células T geradas no timo previamente infectado por *M. avium* são tolerantes ao patógeno na periferia (NOBREGA *et al.*, 2010). A persistência da infecção e de peptídeos antigênicos no timo pode favorecer o aparecimento de células T tolerantes ao patógeno, portanto, contribuindo para sua persistência em outros tecidos (NUNES-ALVES *et al.*, 2013). Sendo assim, nossos resultados sugerem que a persistência do parasito no timo poderia favorecer o surgimento de células T tolerantes a *Leishmania*, que, por conseguinte, os animais infectados não resolveriam a infecção em outros sítios clássicos de persistência do parasito como o baço.

6. CONCLUSÕES

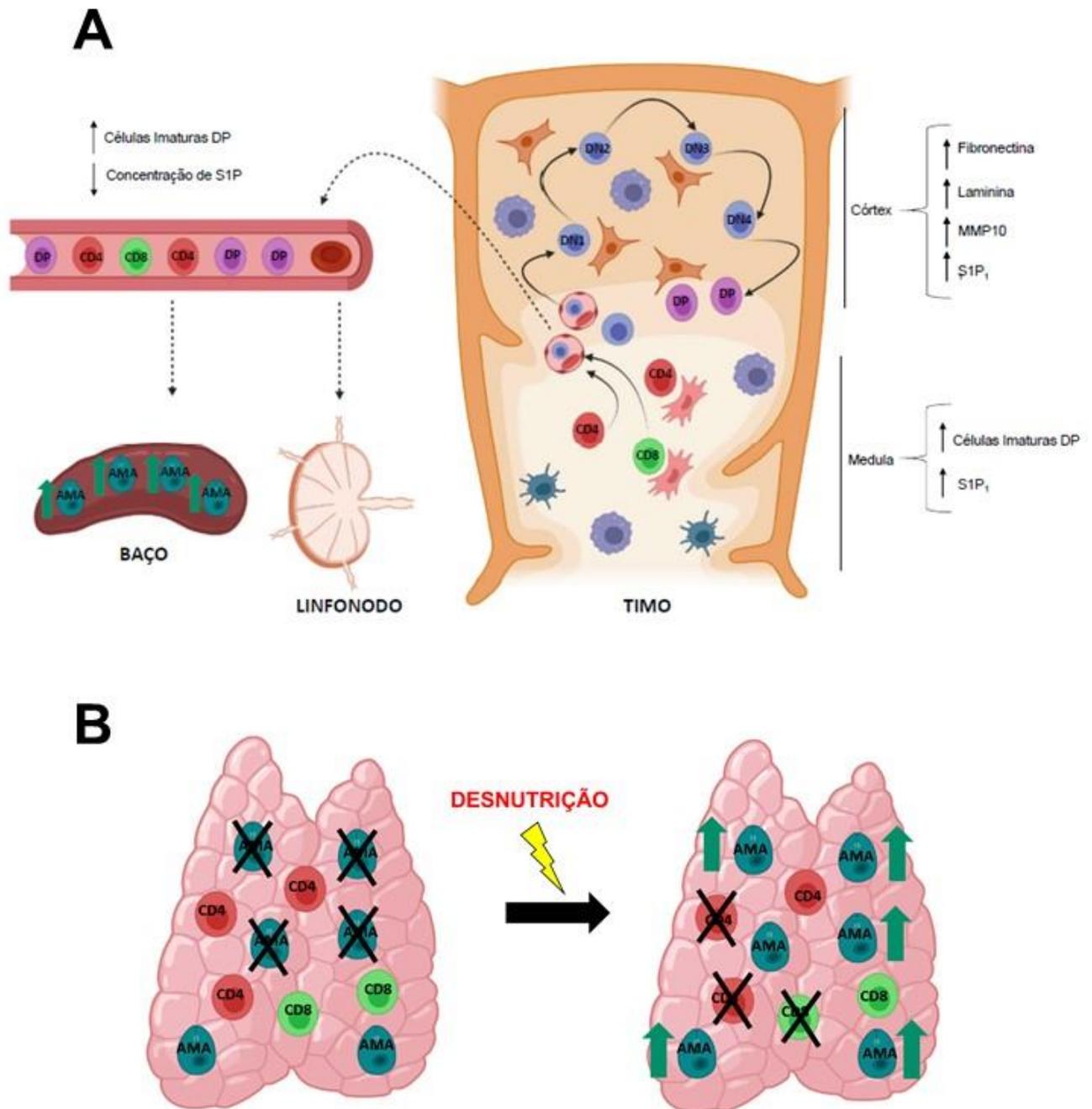


Figura 6.1 – Alterações observadas em camundongos BALB/c desnutridos e infectados com *L. infantum*. (A) As alterações observadas na MEC, assim como alterações em moléculas sinalizadoras de migração celular, criam um microambiente propício à saída de células T imaturas (DN e DP) para periferia, por consequência, pode impactar negativamente no controle da infecção em sítios periféricos como baço e linfonodos de animais desnutridos e infectados (LPi); (B) O timo em pré-condição de desnutrição, não controla adequadamente a proliferação dos parasitos.

As alterações observadas na MEC tímica, em animais desnutridos e infectados (LPi), indicam que processos de migração celular mediados por proteínas de MEC como fibronectina e laminina podem estar prejudicados nesses animais, na região cortical (Figura 6.1 A). O que pode prejudicar a interação de timócitos com células epiteliais corticais e favorecer o escape de células imaturas duplo positivas para região medular. Como consequência, aumenta o escape dessas células imaturas para órgãos periféricos como baço e linfonodos, culminando em uma resposta imune ineficaz contra o parasito nos sítios periféricos, o que favorece o aumento na proliferação do parasito. Além disso, com relação à alteração do recrutamento de células T ativadas para o timo, com a diminuição observada em animais LPi, esse fenômeno cria um ambiente adequado para proliferação exacerbada do parasito no órgão. Com o aumento na persistência de antígenos do parasito nesse órgão pode favorecer o escape de células T tolerantes ao parasito na periferia (Figura 6.1 B).

Em conjunto, e sabendo que as células T exercem um papel fundamental na resposta adaptativa apropriada frente a *Leishmania*, nossos resultados sugerem que a desnutrição induz um microambiente tímico disfuncional onde a diferenciação, seleção e maturação de timócitos está comprometida e impactaria negativamente na saída de células T maduras para a periferia e no controle da carga parasitária em órgãos linfoides secundários como o baço, que de fato apresenta aumento precoce da carga parasitaria, agravando/acelerando os eventos imunopatológicos na leishmaniose visceral em indivíduos desnutridos e resultando, portanto, em formas mais graves da doença.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AABY, P. *et al.* Thymus size at birth is associated with infant mortality: a community study from Guinea-Bissau. **Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)**, [s. l.], v. 91, n. 6, p. 698–703, 2002.

ABUL K. ABBAS; ANDREW H. LITCHMAN; SHIV PILLAI. **Imunologia Celular e Molecular**. 8. ed. [S. l.: s. n.], [s. d.]. v. Único

ADEVA-ANDANY, M. M. *et al.* Liver glucose metabolism in humans. **Bioscience Reports**, [s. l.], v. 36, n. 6, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5293555/>. Acesso em: 6 jun. 2021.

ALBANO, F. *et al.* Insights into Thymus Development and Viral Thymic Infections. **Viruses**, [s. l.], v. 11, n. 9, p. 836, 2019.

ALLENDE, M. L. *et al.* Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 279, n. 15, p. 15396–15401, 2004.

ALVAREZ, D.; VOLLMANN, E. H.; VON ANDRIAN, U. H. Mechanisms and Consequences of Dendritic Cell Migration. **Immunity**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 325, 2008.

ALVES DA COSTA, T. *et al.* Severe Changes in Thymic Microenvironment in a Chronic Experimental Model of Paracoccidioidomycosis. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 10, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5063316/>. Acesso em: 14 maio 2020.

ANSARI, N. A. *et al.* IL-27 and IL-21 are associated with T cell IL-10 responses in human visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, [s. l.], v. 186, n. 7, p. 3977–3985, 2011.

ANSTEAD, G. M. *et al.* Malnutrition Alters the Innate Immune Response and Increases Early Visceralization following *Leishmania donovani* Infection. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 69, n. 8, p. 4709–4718, 2001.

ANTONELLI, L. R. V. *et al.* Disparate Immunoregulatory Potentials for Double-Negative (CD4⁻ CD8⁻) $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T Cells from Human Patients with Cutaneous Leishmaniasis. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 74, n. 11, p. 6317–6323, 2006.

ARISH, M. *et al.* Sphingosine-1-phosphate signaling in *Leishmania donovani* infection in macrophages. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 12, n. 8, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6118390/>. Acesso em: 10 maio 2020.

ATAYDE, V. D. *et al.* *Leishmania* exosomes and other virulence factors: Impact on innate immune response and macrophage functions. **Cellular Immunology**, [s. l.], v. 309, p. 7–18, 2016.

BACELLAR, O. *et al.* IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 1228–1231, 2000.

BADARÓ, R. *et al.* A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 154, n. 4, p. 639–649, 1986.

- BAEYENS, A. *et al.* Exit strategies: S1P signaling and T cell migration. **Trends in immunology**, [s. l.], v. 36, n. 12, p. 778–787, 2015.
- BATES, P. A. Revising Leishmania's life cycle. **Nature Microbiology**, [s. l.], v. 3, n. 5, p. 529–530, 2018.
- BOSCH-NICOLAU, P. *et al.* Leishmaniasis and tumor necrosis factor alpha antagonists in the Mediterranean basin. A switch in clinical expression. **PLoS neglected tropical diseases**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. e0007708, 2019.
- BOTTREL, R. L. A. *et al.* Flow Cytometric Determination of Cellular Sources and Frequencies of Key Cytokine-Producing Lymphocytes Directed against Recombinant LACK and Soluble Leishmania Antigen in Human Cutaneous Leishmaniasis. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 69, n. 5, p. 3232–3239, 2001.
- BRUNETTO, M. A.; JEREMIAS, T.; DOMINGUES, L. Imunonutrição: o papel da dieta no restabelecimento das defesas naturais. **Acta Scientiae Veterinariae.**, [s. l.], p. 3,
- BUNTING, M. D.; COMERFORD, I.; MCCOLL, S. R. Finding their niche: chemokines directing cell migration in the thymus. **Immunology & Cell Biology**, [s. l.], v. 89, n. 2, p. 185–196, 2011.
- CARRILLO, E. *et al.* Protein Malnutrition Impairs the Immune Response and Influences the Severity of Infection in a Hamster Model of Chronic Visceral Leishmaniasis. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. e89412, 2014.
- CERF, B. J. *et al.* Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 156, n. 6, p. 1030–1033, 1987.
- CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 5, n. 11, p. 873–882, 2007.
- CHIBA, K. *et al.* Role of sphingosine 1-phosphate receptor type 1 in lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus. **Cellular & Molecular Immunology**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 11–19, 2006.
- CIBRIÁN, D.; SÁNCHEZ-MADRID, F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. **European journal of immunology**, [s. l.], v. 47, n. 6, p. 946–953, 2017.
- COSTA, C. H. N. *et al.* Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 43, p. 386–392, 2010.
- COTTA-DE-ALMEIDA VINÍCIUS *et al.* Trypanosoma cruzi infection modulates intrathymic contents of extracellular matrix ligands and receptors and alters thymocyte migration. **European Journal of Immunology**, [s. l.], v. 33, n. 9, p. 2439–2448, 2003.
- CUERVO-ESCOBAR, S. *et al.* T-Cell Populations and Cytokine Expression Are Impaired in Thymus and Spleen of Protein Malnourished BALB/c Mice Infected with Leishmania infantum. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 12, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4275170/>. Acesso em: 30 mar. 2018.

DA SILVA, A. V. A. *et al.* Morphophysiological changes in the splenic extracellular matrix of *Leishmania infantum*-naturally infected dogs is associated with alterations in lymphoid niches and the CD4⁺ T cell frequency in spleens. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. e0006445, 2018.

DE CARVALHO, R. V. H. *et al.* *Leishmania* Lipophosphoglycan Triggers Caspase-11 and the Non-canonical Activation of the NLRP3 Inflammasome. **Cell Reports**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 429-437.e5, 2019.

DIRO, E. *et al.* Clinical aspects of paediatric visceral leishmaniasis in North-west Ethiopia. **Tropical medicine & international health: TM & IH**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 8–16, 2015.

ELMORE, S. A. Enhanced Histopathology of the Thymus. **Toxicologic pathology**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 656–665, 2006.

FALEIRO, R. J. *et al.* Immune Regulation during Chronic Visceral Leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. e2914, 2014.

FAO, I. **The State of Food Security and Nutrition in the World 2021: Transforming food systems for food security, improved nutrition and affordable healthy diets for all**. Rome, Italy: FAO, 2021. (The State of Food Security and Nutrition in the World (SOFI), v. 2021). *E-book*. Disponível em: <https://www.fao.org/documents/card/en/c/cb4474en>. Acesso em: 2 nov. 2021.

FIEVEZ, A. M. da C. *et al.* Lower levels of leptin are associated with severity parameters in visceral leishmaniasis patients. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. e0214413, 2019.

FLORES, K. G. *et al.* Analysis of the human thymic perivascular space during aging. **The Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 104, n. 8, p. 1031–1039, 1999.

FREEMARK, M. Metabolomics in nutrition research: biomarkers predicting mortality in children with severe acute malnutrition. **Food and Nutrition Bulletin**, [s. l.], v. 36, n. 1 Suppl, p. S88-92, 2015.

FRIEDMAN, J. M. The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. **Nutrition Reviews**, [s. l.], v. 60, n. 10 Pt 2, p. S1-14; discussion S68-84, 85–87, 2002.

GAMEIRO, J.; NAGIB, P.; VERINAUD, L. The thymus microenvironment in regulating thymocyte differentiation. **Cell Adhesion & Migration**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 382–390, 2010.

GARLY, M.-L. *et al.* Thymus size at 6 months of age and subsequent child mortality. **The Journal of Pediatrics**, [s. l.], v. 153, n. 5, p. 683–688, 688.e1-3, 2008.

GAUTAM, S. *et al.* CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 209, n. 2, p. 290–299, 2014.

GILL, J. H. *et al.* MMP-10 Is Overexpressed, Proteolytically Active, and a Potential Target for Therapeutic Intervention in Human Lung Carcinomas. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 777–785, 2004.

GOLLOB, K. J.; VIANA, A. G.; DUTRA, W. O. Immunoregulation in Human American Leishmaniasis: Balancing Pathology and Protection. **Parasite immunology**, [s. l.], v. 36, n. 8, p. 367–376, 2014.

GOMEZ, F. *et al.* MORTALITY IN SECOND AND THIRD DEGREE MALNUTRITION. **Journal of Tropical Pediatrics**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 77–83, 1956.

GORAK, P. M.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. **European Journal of Immunology**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 687–695, 1998.

GUITTON, J. *et al.* Sphingosine-1-Phosphate Metabolism in the Regulation of Obesity/Type 2 Diabetes. **Cells**, [s. l.], v. 9, n. 7, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7407406/>. Acesso em: 15 fev. 2021.

GUYDEN, J. C. *et al.* Thymic Nurse Cells Participate in Heterotypic Internalization and Repertoire Selection of Immature Thymocytes; Their Removal from the Thymus of Autoimmune Animals May be Important to Disease Etiology. **Current Molecular Medicine**, [s. l.], v. 15, n. 9, p. 828–835, 2015.

HERMIDA, M. d'El-Rei *et al.* Histological Disorganization of Spleen Compartments and Severe Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 8, p. 394, 2018.

HILL, C. M. *et al.* Low protein-induced increases in FGF21 drive UCP1-dependent metabolic but not thermoregulatory endpoints. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 8209, 2017.

HOWARD, J. K. *et al.* Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 104, n. 8, p. 1051–1059, 1999.

IBRAHIM, M. K. *et al.* Deficiency of Lymph Node-Resident Dendritic Cells (DCs) and Dysregulation of DC Chemoattractants in a Malnourished Mouse Model of *Leishmania donovani* Infection. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 82, n. 8, p. 3098–3112, 2014.

IBRAHIM, M. K. *et al.* Impact of Childhood Malnutrition on Host Defense and Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 919–971, 2017.

IBRAHIM, M. K. *et al.* The Malnutrition-Related Increase in Early Visceralization of *Leishmania donovani* Is Associated with a Reduced Number of Lymph Node Phagocytes and Altered Conduit System Flow. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 7, n. 8, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3744437/>. Acesso em: 17 nov. 2018.

JACINTHO, A. P. P. *et al.* Expression of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in the skin of dogs with visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 117, n. 6, p. 1819–1827, 2018.

JAMES, K. D.; JENKINSON, W. E.; ANDERSON, G. T-cell egress from the thymus: Should I stay or should I go?. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 104, n. 2, p. 275–284, 2018.

JUNG, L. K. *et al.* Expression of early activation antigen (CD69) during human thymic development. **Clinical and Experimental Immunology**, [s. l.], v. 81, n. 3, p. 466–474, 1990.

KAPOOR. **Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs)**. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <http://www.cancerjournal.net/article.asp?issn=0973->

1482;year=2016;volume=12;issue=1;spage=28;epage=35;aulast=Kapoor. Acesso em: 8 maio 2020.

KAUSHAL, H. *et al.* Role of CD8+ T cells in protection against *Leishmania donovani* infection in healed Visceral Leishmaniasis individuals. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 14, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4258298/>. Acesso em: 7 abr. 2020.

KAYE, P. M. *et al.* The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunological Reviews**, [s. l.], v. 201, p. 239–253, 2004.

KAYE, P. M.; AEBISCHER, T. Visceral leishmaniasis: immunology and prospects for a vaccine. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 17, n. 10, p. 1462–1470, 2011.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews. Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.

KLASING, K. C. Nutrition and the immune system. **British Poultry Science**, [s. l.], v. 48, n. 5, p. 525–537, 2007.

KLEIN, L. *et al.* Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see and don't see. **Nature reviews. Immunology**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 377–391, 2014.

KOCH, U.; RADTKE, F. Mechanisms of T cell development and transformation. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 27, p. 539–562, 2011.

KONDO, K.; OHIGASHI, I.; TAKAHAMA, Y. Thymus machinery for T-cell selection. **International Immunology**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 119–125, 2018.

KOZAI, M. *et al.* Essential role of CCL21 in establishment of central self-tolerance in T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 214, n. 7, p. 1925–1935, 2017.

KRAMPERT, M. *et al.* Activities of the Matrix Metalloproteinase Stromelysin-2 (MMP-10) in Matrix Degradation and Keratinocyte Organization in Wounded Skin. **Molecular Biology of the Cell**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 5242–5254, 2004.

KRÜGER, K.; MOOREN, F. C. T cell homing and exercise. **Exercise Immunology Review**, [s. l.], v. 13, p. 37–54, 2007.

LAEGER, T. *et al.* FGF21 is an endocrine signal of protein restriction. **The Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 124, n. 9, p. 3913–3922, 2014.

LAGENTE, V.; BOICHOT, E. Role of matrix metalloproteinases in the inflammatory process of respiratory diseases. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 440–444, 2010.

LE MOS, J. P. *et al.* Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 Is Involved in Non-Obese Diabetic Mouse Thymocyte Migration Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 5, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5983610/>. Acesso em: 13 abr. 2020.

LEPLETIER, A. *et al.* Early Double-Negative Thymocyte Export in *Trypanosoma cruzi* Infection Is Restricted by Sphingosine Receptors and Associated with Human Chagas Disease. **PLoS**

- Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 8, n. 10, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4199546/>. Acesso em: 10 maio 2020.
- LESCALE, C.; DERIANO, L. The RAG recombinase: Beyond breaking. **Mechanisms of Ageing and Development**, [s. l.], v. 165, SI:DNA Damage and Immunity, p. 3–9, 2017.
- LIMA, A. C. D. *et al.* Thymic alterations induced by *Plasmodium berghei*: expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. **Cellular Immunology**, [s. l.], v. 279, n. 1, p. 53–59, 2012.
- LIMA-JUNIOR, D. S. *et al.* Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 909–915, 2013.
- LIPOLDOVÁ, M.; DEMANT, P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. **Nature Reviews. Genetics**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 294–305, 2006.
- LORÍA-CERVERA, E. N.; ANDRADE-NARVÁEZ, F. J. ANIMAL MODELS FOR THE STUDY OF LEISHMANIASIS IMMUNOLOGY. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 1–11, 2014.
- LOSADA-BARRAGÁN, M. *et al.* Detection and quantification of *Leishmania infantum* in naturally and experimentally infected animal samples. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 226, p. 57–64, 2016.
- LOSADA-BARRAGÁN, M. *et al.* Protein malnutrition promotes dysregulation of molecules involved in T cell migration in the thymus of mice infected with *Leishmania infantum*. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5387407/>. Acesso em: 30 mar. 2018.
- LOSADA-BARRAGÁN, M. *et al.* Thymic Microenvironment Is Modified by Malnutrition and *Leishmania infantum* Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 9, p. 252, 2019.
- LYRA, J. S. *et al.* Thymic extracellular matrix in human malnutrition. **The Journal of Pathology**, [s. l.], v. 171, n. 3, p. 231–236, 1993.
- MAJUMDAR, S. *et al.* Comparative analysis of thymic subpopulations during different modes of atrophy identifies the reactive oxygen species scavenger, N-acetyl cysteine, to increase the survival of thymocytes during infection-induced and lipopolysaccharide-induced thymic atrophy. **Immunology**, [s. l.], v. 157, n. 1, p. 21–36, 2019.
- MAJUMDAR, S. *et al.* Differential susceptibility and maturation of thymocyte subsets during *Salmonella Typhimurium* infection: insights on the roles of glucocorticoids and Interferon-gamma. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5238503/>. Acesso em: 13 abr. 2020.
- MALAFIA, G. Protein-energy malnutrition as a risk factor for visceral leishmaniasis: a review. **Parasite Immunology**, [s. l.], v. 31, n. 10, p. 587–596, 2009.
- MALAFIA, G. *et al.* Protein-energy malnutrition decreases immune response to *Leishmania chagasi* vaccine in BALB/c mice. **Parasite Immunology**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 41–49, 2009.

- MANDALA, S. *et al.* Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 296, n. 5566, p. 346–349, 2002.
- MARANGONI, N. R. *et al.* Levels of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in the cerebrospinal fluid of dogs with visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, [s. l.], v. 33, n. 6, p. 330–334, 2011.
- MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, [s. l.], v. 50, n. 5, p. 341–352, 2013.
- MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM: An International Journal of Medicine**, [s. l.], v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014.
- MENGESHA, B. *et al.* Prevalence of malnutrition and associated risk factors among adult visceral leishmaniasis patients in Northwest Ethiopia: a cross sectional study. **BMC Research Notes**, [s. l.], v. 7, p. 75, 2014.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (org.). **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1. ed. [S. l.: s. n.], 2014.
- MIRANDA, L. H. M. *et al.* Evaluation of immunohistochemistry for the diagnosis of sporotrichosis in dogs. **Veterinary Journal (London, England: 1997)**, [s. l.], v. 190, n. 3, p. 408–411, 2011.
- MONTES DE OCA, M.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Cytokines and splenic remodelling during *Leishmania donovani* infection. **Cytokine: X**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 100036, 2020.
- MORRISON, C. J. *et al.* Matrix metalloproteinase proteomics: substrates, targets, and therapy. **Current Opinion in Cell Biology**, [s. l.], v. 21, n. 5, Cell-to-cell contact and extracellular matrix, p. 645–653, 2009.
- MORROT, A. *et al.* Chagasic thymic atrophy does not affect negative selection but results in the export of activated CD4+CD8+ T cells in severe forms of human disease. **PLoS neglected tropical diseases**, [s. l.], v. 5, n. 8, p. e1268, 2011.
- MÜLLER, I. *et al.* Gamma interferon response in secondary *Leishmania major* infection: role of CD8+ T cells. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 61, n. 9, p. 3730–3738, 1993.
- NAKAGAWA, Y. *et al.* Thymic nurse cells provide microenvironment for secondary T cell receptor α rearrangement in cortical thymocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 109, n. 50, p. 20572–20577, 2012.
- NIETO, A. *et al.* Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus Syrian hamster model. **Veterinary Research**, [s. l.], v. 42, p. 39, 2011.
- NITTA, T.; TAKAYANAGI, H. Non-Epithelial Thymic Stromal Cells: Unsung Heroes in Thymus Organogenesis and T Cell Development. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 11, p. 620894, 2021.
- NOBREGA, C. *et al.* Dissemination of Mycobacteria to the Thymus Renders Newly Generated T Cells Tolerant to the Invading Pathogen. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 184, n. 1, p. 351–358, 2010.

- NUNES-ALVES, C. *et al.* Tolerance has its limits: how the thymus copes with infection. **Trends in immunology**, [s. l.], v. 34, n. 10, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3879077/>. Acesso em: 15 maio 2020.
- NYLÉN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends in Immunology**, [s. l.], v. 28, n. 9, p. 378–384, 2007.
- OHL, L. *et al.* CCR7 Governs Skin Dendritic Cell Migration under Inflammatory and Steady-State Conditions. **Immunity**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 279–288, 2004.
- OLIVEIRA, J. M. de *et al.* Mortality due to visceral leishmaniasis: clinical and laboratory characteristics. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 188–193, 2010.
- OVERGAARD, N. H. *et al.* CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage?. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 97, n. 1, p. 31–38, 2015.
- PABST, R. The thymus is relevant in the migration of mature lymphocytes. **Cell and Tissue Research**, [s. l.], v. 376, n. 1, p. 19–24, 2019.
- PÉREZ-CABEZAS, B. *et al.* Understanding Resistance vs. Susceptibility in Visceral Leishmaniasis Using Mouse Models of *Leishmania infantum* Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 9, p. 30, 2019.
- PERUHYPE-MAGALHÃES, V. *et al.* Immune response in human visceral leishmaniasis: analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. **Scandinavian Journal of Immunology**, [s. l.], v. 62, n. 5, p. 487–495, 2005.
- PEZESHKI, A.; CHELIKANI, P. K. Low Protein Diets and Energy Balance: Mechanisms of Action on Energy Intake and Expenditure. **Frontiers in Nutrition**, [s. l.], v. 8, p. 655833, 2021.
- PHILLIPS, R. *et al.* Innate Killing of *Leishmania donovani* by Macrophages of the Splenic Marginal Zone Requires IRF-7. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. e1000813, 2010.
- POULAKI, A.; PIPERAKI, E.-T.; VOULGARELIS, M. Effects of Visceralising *Leishmania* on the Spleen, Liver, and Bone Marrow: A Pathophysiological Perspective. **Microorganisms**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 759, 2021.
- QUEIROZ, M. J. A.; ALVES, J. G. B.; CORREIA, J. B. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. **Jornal de Pediatria**, [s. l.], v. 80, n. 2, p. 141–146, 2004.
- RAJAMANICKAM, A. *et al.* Undernutrition is associated with perturbations in T cell-, B cell-, monocyte- and dendritic cell- subsets in latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 14, n. 12, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6903744/>. Acesso em: 13 abr. 2020.
- REIDELBERGER, R.; HAVER, A.; CHELIKANI, P. K. Role of peptide YY(3-36) in the satiety produced by gastric delivery of macronutrients in rats. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 304, n. 9, p. E944-950, 2013.
- SAVINO, W. *et al.* Hormonal control of T-cell development in health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 77–89, 2016.

SAVINO, W. *et al.* Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines?. **Trends in Immunology**, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 305–313, 2002.

SAVINO, W. *et al.* Laminin-Mediated Interactions in Thymocyte Migration and Development. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 6, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4648024/>. Acesso em: 28 maio 2018.

SAVINO, W. The thymic microenvironment in infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 85, p. 255–260, 1990.

SAVINO, W. *et al.* The thymus is a common target in malnutrition and infection. **British Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 98, n. S1, 2007. Disponível em: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114507832880. Acesso em: 3 nov. 2018.

SAVINO, W.; DARDENNE, M. Nutritional imbalances and infections affect the thymus: consequences on T-cell-mediated immune responses. **Proceedings of the Nutrition Society**, [s. l.], v. 69, n. 4, p. 636–643, 2010.

SCHAIBLE, U. E.; KAUFMANN, S. H. E. Malnutrition and Infection: Complex Mechanisms and Global Impacts. **PLoS Medicine**, [s. l.], v. 4, n. 5, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1858706/>. Acesso em: 30 mar. 2018.

SERAFIM, T. D. *et al.* Immune response to Leishmania (Leishmania) chagasi infection is reduced in malnourished BALB/c mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 105, n. 6, p. 811–817, 2010.

SERAFIM, T. D.; INIGUEZ, E.; OLIVEIRA, F. Leishmania infantum. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 80–81, 2020.

SOFI 2019 - THE STATE OF FOOD SECURITY AND NUTRITION IN THE WORLD. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <http://www.fao.org/state-of-food-security-nutrition/en/>. Acesso em: 5 maio 2020.

SPRENT, J.; SURH, C. D. Re-entry of mature T cells to the thymus: an epiphenomenon?. **Immunology and cell biology**, [s. l.], v. 87, n. 1, p. 46–49, 2009.

STAMENKOVIC, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 415–433, 2000.

STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunology and Cell Biology**, [s. l.], v. 85, n. 2, p. 138–147, 2007.

SUSANTO, O.; TRAPANI, J. A.; BRASACCHIO, D. Controversies in granzyme biology. **Tissue Antigens**, [s. l.], v. 80, n. 6, p. 477–487, 2012.

SYMPTOMS, TRANSMISSION, AND CURRENT TREATMENTS FOR VISCERAL LEISHMANIASIS | DNDI. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://dndi.org/diseases/visceral-leishmaniasis/facts/>. Acesso em: 18 jul. 2021.

T, T. *et al.* Heterogeneity within medullary-type TCRalpha(+)CD3(+)CD4(-)CD8(+) thymocytes in normal mouse thymus. **International immunology**, [s. l.], v. 13, n. 3, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11222500/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

TAKAHAMA, Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. **Nature Reviews. Immunology**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 127–135, 2006.

THAPA, P.; FARBER, D. L. THE ROLE OF THE THYMUS IN THE IMMUNE RESPONSE. **Thoracic surgery clinics**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 123–131, 2019.

TORRES-GUERRERO, E. *et al.* Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, [s. l.], v. 6, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5464238/>. Acesso em: 30 mar. 2018.

TSAGOZIS, P.; KARAGOUNI, E.; DOTSIKA, E. Function of CD8+ T lymphocytes in a self-curing mouse model of visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, [s. l.], v. 54, n. 2, p. 139–146, 2005.

TUMANG, M. C. *et al.* Role and effect of TNF-alpha in experimental visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, [s. l.], v. 153, n. 2, p. 768–775, 1994.

UENO, T. *et al.* CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 200, n. 4, p. 493–505, 2004.

VAN KAER, L. *et al.* In Vitro Induction of Regulatory CD4+CD8α+ T Cells by TGF-β, IL-7 and IFN-γ. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 7, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3701067/>. Acesso em: 13 abr. 2020.

VRAKAS, G. *et al.* Markers of malnutrition after intestinal transplantation: the role of IGF-1 and calprotectin. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 64–65, 2015.

WALSON, J. L.; BERKLEY, J. A. The impact of malnutrition on childhood infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 231–236, 2018.

WATANABE, N. *et al.* Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. **Nature**, [s. l.], v. 436, n. 7054, p. 1181–1185, 2005.

WHO | WHAT IS LEISHMANIASIS? [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/disease/en/>. Acesso em: 30 mar. 2018.

WHO | WHAT IS MALNUTRITION? [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <http://www.who.int/features/qa/malnutrition/en/>. Acesso em: 31 mar. 2018.

WHO EXPERT COMMITTEE ON THE CONTROL OF THE LEISHMANIASES; WORLD HEALTH ORGANIZATION (org.). **Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010**. Geneva: World Health Organization, 2010. (WHO technical report series, v. 949).

ZAMBONI, D. S.; LIMA-JUNIOR, D. S. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. **Immunological Reviews**, [s. l.], v. 265, n. 1, p. 156–171, 2015.

ZAMBONI, D. S.; SACKS, D. L. Inflammasomes and Leishmania: in good times or bad, in sickness or in health. **Current opinion in microbiology**, [s. l.], v. 52, p. 70–76, 2019.

ZAPATA, R. C. *et al.* Dietary Tryptophan Restriction Dose-Dependently Modulates Energy Balance, Gut Hormones, and Microbiota in Obesity-Prone Rats. **Obesity**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 730–739, 2018.

ZDROJEWICZ, Z.; PACHURA, E.; PACHURA, P. The Thymus: A Forgotten, But Very Important Organ. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, [*s. l.*], v. 25, n. 2, p. 369–375, 2016.

ZHANG, O. *et al.* Sphingosine kinase A is a pleiotropic and essential enzyme for *Leishmania* survival and virulence. **Molecular Microbiology**, [*s. l.*], v. 90, n. 3, p. 489–501, 2013.

ZIEGLER, S. F.; RAMSDELL, F.; ALDERSON, M. R. The activation antigen CD69. **STEM CELLS**, [*s. l.*], v. 12, n. 5, p. 456–465, 1994.

8. ANEXOS

8.1 Licença do Conselho de Ética no Uso de Animais do IOC

| | | |
|---|--|---|
|  | <p>Ministério da Saúde Fundação Oswaldo Cruz Instituto Oswaldo Cruz Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/IOC</p> |  |
|---|--|---|

LICENÇA L-032/2018

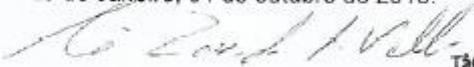
Certificamos que o protocolo (CEUA/IOC-038/2018), intitulado, "Análise do efeito da restrição proteica em camundongos BALB/c submetidos à infecção com *Leishmania infantum*", sob a responsabilidade de **Patricia Cuervo Escobar** atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 30/09/2022 e inclui o uso total de:

- Camundongo (*Mus musculus*), linhagem:
BALB/c – 400 animais machos de 3 a 4 semanas.
- Hamster, linhagem:
Mesocricetus auratus –Golden – 96 animais machos de 3 a 4 semanas.

Observação: Esta licença não substitui outras licenças necessárias, como Certificado de Qualidade em Biossegurança para animais geneticamente modificados, certificado do IBAMA para captura de animais silvestres ou outros.

Rio de Janeiro, 01 de outubro de 2018.


Tânia Zaverucha do Valle
Coordenadora Adjunta da CEUA/Instituto Oswaldo Cruz
Fundação Oswaldo Cruz

Tânia Zaverucha Valle
Vice-coordenadora da CEUA - IOC
IOC - FIOCRUZ
Av. Brasil, 4365
CEP: 21040-360 Tel: (21) 2562-1056

Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz-Instituto Oswaldo Cruz/IOC - Pavilhão Arthur Neiva - módulos de expansão - sala 06
Av. Brasil, 4365 - Mangunhos - Rio de Janeiro - RJ - Brasil
CEP: 21040-360 Tel: (21) 2562-1056