



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus Araçatuba

KAREN SANTOS MARÇO

**Efeitos da infecção por *Leishmania infantum* na morfologia
e composição celular do timo de hamster (*Mesocricetus
auratus*)**

Araçatuba

2020

KAREN SANTOS MARÇO

Efeitos da infecção por *Leishmania infantum* na morfologia e composição celular do timo de hamster (*Mesocricetus auratus*)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

Orientadora: Prof.^a Adjunta Gisele Fabrino Machado

Araçatuba

2020

M321e	<p>Março, Karen Santos</p> <p>Efeitos da infecção por <i>Leishmania infantum</i> na morfologia e composição celular do timo de hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>) / Karen Santos Março. – Araçatuba, 2020</p> <p>80 p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba</p> <p>Orientadora: Gisele Fabrino Machado</p> <p>1. Leishmaniose visceral. 2. Histopatologia. 3. Imuno-histoquímica. 4. Linfócitos. 5. Hamster sírio. I. Título.</p>
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Efeitos da infecção por Leishmania infantum na morfologia e composição celular do timo de hamster (Mesocricetus auratus)

AUTORA: KAREN SANTOS MARÇO

ORIENTADORA: GISELE FABRINO MACHADO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. GISELE FABRINO MACHADO (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. MARCIA DALASTRA LAURENTI (Participação Virtual)
Departamento de Patologia / Faculdade de Medicina da USP

Araçatuba, 14 de dezembro de 2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Efeitos da infecção por Leishmania infantum na morfologia e composição celular do timo de hamster (Mesocricetus auratus)

AUTORA: KAREN SANTOS MARÇO

ORIENTADORA: GISELE FABRINO MACHADO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. GISELE FABRINO MACHADO (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Valéria M. S. de Lima

Profa. Dra. VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. MARCIA DALASTRA LAURENTI (Participação Virtual)

Departamento de Patologia / Faculdade de Medicina da USP

Araçatuba, 14 de dezembro de 2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Efeitos da infecção por Leishmania infantum na morfologia e composição celular do timo de hamster (Mesocricetus auratus)

AUTORA: KAREN SANTOS MARÇO

ORIENTADORA: GISELE FABRINO MACHADO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. GISELE FABRINO MACHADO (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. MARCIA DALASTRA LAURENTI (Participação Virtual)
Departamento de Patologia / Faculdade de Medicina da USP

Araçatuba, 14 de dezembro de 2020.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Gisele Fabrino Machado, por aceitar ser minha orientadora, por sua forma acolhedora de orientar, sempre compreensiva, enxergando seus orientados como pessoas complexas e únicas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo de pós-graduação em parte do mestrado.

À Prof. Marcia Dalastra Laurenti responsável pelo laboratório de patologia de moléstias infecciosas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, suas orientadas de Doutorado Gabriela e Carmen que contribuíram para projeto fornecendo não apenas as amostras utilizadas no projeto, mas contribuindo com seus conhecimentos práticos e teóricos para realização do projeto.

À Prof. Valéria Felix Marçal de Lima pela disponibilidade e entusiasmo em conversar sobre imunologia, e também aos seus orientados pelo compartilhamento da bancada e dos protocolos do laboratório.

À meus pais, Ivete Domingos dos Santos Março e Edson Roberto Março que sempre apoiaram minhas escolhas dando todo suporte que podiam para que eu pudesse realizar meus planos.

Meu amigo e namorado Samuel Alves de Quadros, minha amiga e irmã Éllem Santos Março, amigas e primas Elaine Cristina Março e Maria Clara Março dos Santos, que foram minhas companhias e apoio emocional durante a trajetória do mestrado.

Meu cachorro Jack que na sua inocência oferece amor e alegria a minha casa.

Março, K.S. **Efeitos da infecção por *Leishmania infantum* na morfologia do timo de hamster (*Mesocricetus auratus*)**. 2020. 80f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

RESUMO

O Timo é um órgão linfoide primário responsável pela maturação de linfócitos T que são importantes células efetoras da imunidade adaptativa. As células apresentadoras de antígeno conectam a imunidade inata a adaptativa e esta interação vai determinar o padrão de resposta imune a leishmaniose visceral resultando em doença sintomática quando um padrão de resposta é Th2 e uma resposta protetora com doenças assintomática quando o padrão é Th1. Outros tipos de respostas tais como a Th17 e Treg também são ativadas durante a doença. Esta revisão tem como objetivo descrever os efeitos da leishmaniose visceral sobre o timo, um órgão linfoide primário que tem com função a maturação dos linfócitos T. Para isso foi realizada a análise e comparação de artigos científicos sobre as infecções *Leishmania infantum* (*chagasi*) no timo publicados nas bases de dados informatizadas PubMed, LILACS, SciELO, Google Scholar e no Portal de Periódicos da CAPES em língua inglesa no período de 1973 a 2020. Entre os estudos utilizados destacamos cinco que abordam a presença e/ou os efeitos da Leishmaniose Visceral sobre o timo em diferentes modelos experimentais e infecção natural em cães. Concluímos que *L. infantum* está presente no timo de animais infectados e leva a um aumento de peso e celularidade do órgão em contraste com a redução na porcentagem de CD4 + e linfócitos duplos negativos em camundongos BALB/c e inflamação e atrofia granulomatosa ou piogranulomatosa em cães.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral. Histopatologia. Imuno-histoquímica. Linfócitos. Hamster sírio.

Março, K.S. **Effects of *Leishmania infantum* infection on the morphology of the hamster thymus (*Mesocricetus Auratus*)**. 2020. 80f. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

ABSTRACT

The thymus is a primary lymphoid organ responsible for the maturation of T lymphocytes. T lymphocytes are an important part of adaptive immunity. Antigen-presenting cells connect adaptive immunity and innate immunity, and this interaction will determine the pattern of immune response to visceral leishmaniasis leading to symptomatic disease when a pattern is Th2 and a protective response with asymptomatic presentation, when is Th1. Other responses, such as Th17 and Treg, also participate in the response to visceral leishmaniasis. This review aims to describe the effects of Visceral Leishmaniasis on the thymus, primary lymphoid organ that has the function of maturing T lymphocytes. Therefore, there is an analysis and comparison of scientific articles that demonstrate the presence of *Leishmania infantum* (*chagasi*) or the effects of Visceral Leishmaniasis on the thymus, published in the computerized databases PubMed, LILACS, SciELO, Google Scholar and CAPES in English from 1973 to 2020. We concluded that *L. infantum* is present in the thymus of infected animals and leads to an increase in weight and cellularity in contrast to a reduction in the percentage of CD4 + and double negative lymphocytes in BALB/c mice and inflammation and granulomatous or pyogenic granulomatous atrophy in dogs.

Keywords: Visceral leishmaniasis. Histopathology. Immunohistochemistry. Lymphocytes. Syrian hamster.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Lista de anticorpos, concentração, método de recuperação antigênica e cromógeno utilizados nas reações de imuno-histoquímica	39
Tabela 2- Densidade parasitária em baço e fígado.....	41
Tabela 3- Histologia e morfometria do timo.....	43
Tabela 4- Porcentagem de área marcada de células de origem mesenquimal, epitelial, macrófagos, linfócitos B e T no timo.	50

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1- Localização anatômica do timo em hamster, cranial aos pulmões e 16
- Figura 2- Fotomicrografia da divisão histológica das regiões do timo. Bar= 100µm. 17
- Figura 3- Vasos sanguíneos no timo de camundongo após injeção vascular com emulsão fotográfica. 200µm. 18

CAPÍTULO 2

- Figura 1- Detecção imuno-histoquímica de amastigotas em baço, fígado e timo. Amastigotas (setas) foram detectadas por imuno-histoquímica 41
- Figura 2- Deposição de tecido conjuntivo no timo e demonstração da avaliação da porcentagem de área de azul (colágeno maduro) no timo corado com tricrômico de Masson..... 44
- Figura 3- Imunomarcção para vimentina..... 45
- Figura 4- Imunomarcção para citoqueratina..... 46
- Figura 5- Imunomarcção de macrófagos..... 47
- Figura 6- Imunomarcção de linfócitos B CD79+ 48
- Figura 7- Imunomarcção de linfócitos T CD3+ 49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs- Célula apresentadora de antígeno

cTEC- Células epiteliais tímicas corticais

DN- Duplo negativo

DP- Duplo positivo

L- Leishmania

LV- Leishmaniose Visceral

OMS- Organização Mundial da Saúde

PBS- Tampão fosfato-salino

PCR- Reação em cadeia da polimerase

PS- receptor de fosfatidilserina

MHC- Complexo principal de histocompatibilidade

mTEC- Células epiteliais medulares

RT- Transição reversa

TEC- Células epiteliais tímicas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	15
1.1 Características tímicas gerais	15
1.2 Estrutura histológica tímica	17
1.3 Funções das células do timo	19
1.3.1 Células epiteliais e mesenquimais	19
1.3.2 Células hematopoiéticas	20
1.4 Microambiente tímico e desenvolvimento células T	21
1.5 Leishmaniose Visceral	23
1.5.1 Resposta Imune a Leishmaniose Visceral	24
1.6 Modelo experimental	25
1.7 Alterações no timo durante a leishmaniose visceral	25
1.8 Justificativa	28
1.9 Objetivos	28
2 CAPITULO 1- EFEITOS DA INFECÇÃO POR <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> NA MORFOLOGIA E COMPOSIÇÃO CELULAR DO TIMO DE HAMSTER (<i>MESOCRICETUS AURATUS</i>)	29
2.1 Resumo	29
2.2 Abstract	31
2.3 Introdução	33
2.4 Materiais e Métodos	35
2.4.1 Delineamento Experimental	35
2.4.2 Animais	35
2.4.3 Ética	35
2.4.4 Colheita do Material	36
2.4.5 Comprovação da infecção	36
2.4.6 Histologia e morfometria do timo	36
2.4.7 Imuno-histoquímica	37
2.4.8 Avaliação da Imuno-histoquímica	39
2.4.9 Análise estatística	40
2.5 Resultados	40
2.5.1 Detecção e densidade parasitária de <i>L. infantum</i> em baço, fígado e timo	40
2.5.2 Histologia e morfometria do timo	43
2.5.3 Imunomarcção de tipos celulares encontrados no timo	45
2.6 Discussão	51
2.7 Conclusão	56
2.8 Referências	56
Apêndice A- Referências da Introdução Geral	63

ANEXOS	75
--------------	----

1 INTRODUÇÃO GERAL

A imunidade adaptativa é responsável pela flexibilidade e especificidade da resposta imune atuando a partir de respostas celulares e humorais, sendo os linfócitos T constituintes da resposta celular e o timo responsável pela geração dos linfócitos T maduros através da manutenção de um microambiente único de forma que nenhum outro tecido pode exercer sua função (MILIĆEVIĆ; MILIĆEVIĆ, 2004).

As respostas imunes, humoral e celular, estão envolvidas na resposta à leishmaniose visceral (LV) e vão determinar a apresentação da doença, em sintomática ou sintomática.

1.1 Características tímicas gerais

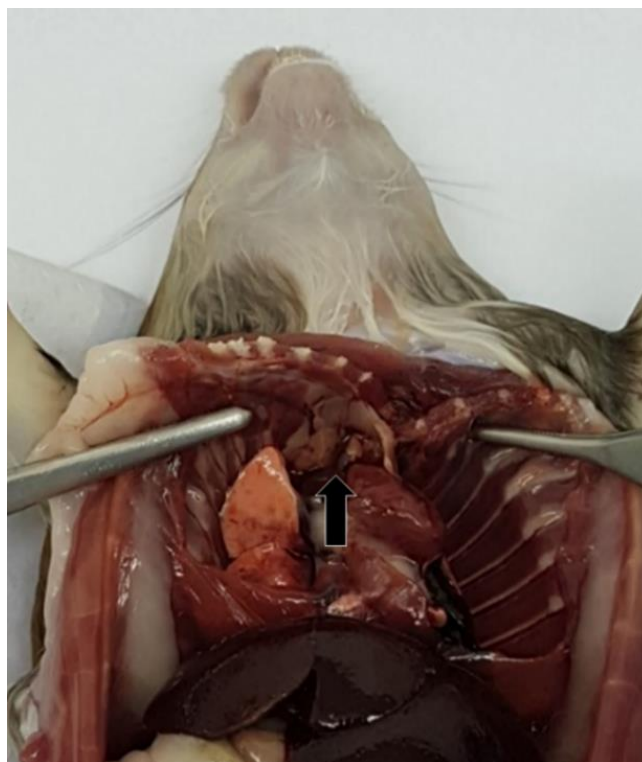
O timo é um órgão linfoepitelial que atua como um órgão linfoide primário (ANDERSON; JENKINSON, 2001) e localiza-se no interior do tórax dos mamíferos na região cranial ao esterno (OWEN; JENKINSON, 1984). No hamster tem a forma de um corpo glandular achatado posicionado um pouco à direita do plano mediano (MICHEL, 2010) (Figura 1). Composto por dois lobos circundados por uma cápsula de tecido conectivo de onde se originam septos que penetram o parênquima formando vários lóbulos (DUIJVESTIJN; HOEFSMIT, 1981). Ao contrário dos mamíferos domésticos, o timo do hamster é pouco lobulado e achatado (MICHEL, 2010). Cada lóbulo tímico possui 3 regiões distintas, córtex, medula e região corticomedular. A região medular do timo é rodeada pelo córtex, e na transição entre estas se localiza a região corticomedular (DUIJVESTIJN; HOEFSMIT, 1981) (Figura 2).

A composição celular do timo inclui células hematopoiéticas e não hematopoiéticas. Os componentes não hematopoiéticos constituem a estrutura do timo fornecendo a matriz para o desenvolvimento dos timócitos, podendo ser identificados pela expressão ou não de queratina. As células epiteliais tímicas possuem queratina no seu citoesqueleto, o que não é observado nas células mesenquimais. As células epiteliais do timo têm uma origem controversa, porém, a origem única a partir do revestimento endodérmico da terceira bolsa faríngea é atualmente a mais aceita, já as células mesenquimais, se originam da crista neural. Entre os componentes hematopoiéticos temos as células dendríticas, os macrófagos

e os linfócitos B (BLACKBURN et al., 2002; MÜLLER et al., 2005; NICOLAS et al., 1986; RODEWALD, 2008; YAMANO et al., 2015).

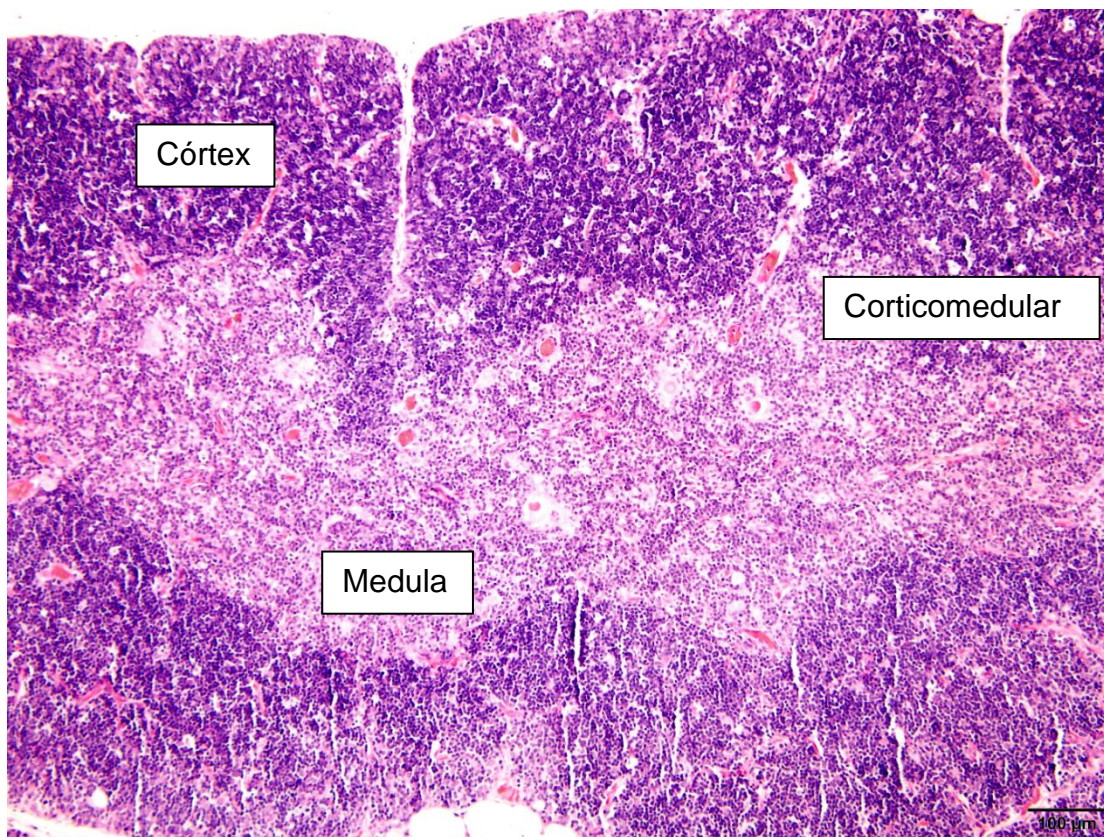
O tecido primordial do timo surge entre o nono e o décimo dia de desenvolvimento embrionário e está associado ao primórdio da paratireoide (ACKERMAN; KNOUFF, 1965). O peso relativo do timo do hamster aumenta de forma acentuada até cerca de 15 dias de idade, atingindo seu maior peso juntamente com a maturidade sexual por volta de 42 dias. Esse peso se mantém praticamente o mesmo até os 60 dias, quando começa uma lenta e gradativa redução. Após 200 dias de idade é possível observar alterações relacionadas a involução tímica como aumento na deposição de gordura na cápsula e septos, no entanto até um ano de idade o hamster ainda tem um timo bastante grande (MICHEL, 2010). Embora a resposta imune T dependente diminua com a idade não se sabe se involução tímica decorrente dela é irreversível ou se é um processo dinâmico. Outros fatores, tais como, doenças, estresse e emagrecimento podem levar a involução ou atrofia aguda do timo, um processo possivelmente reversível (MOHR; DUNGWOTTH, 1992).

Figura 1- Localização anatômica do timo em hamster, cranial aos pulmões e Coração (seta)



Fonte: Arquivo do laboratório de patologia das moléstias infecciosas da Universidade de São Paulo.

Figura 2- Fotomicrografia da divisão histológica das regiões do timo. Bar= 100µm.



Fonte: Arquivo pessoa

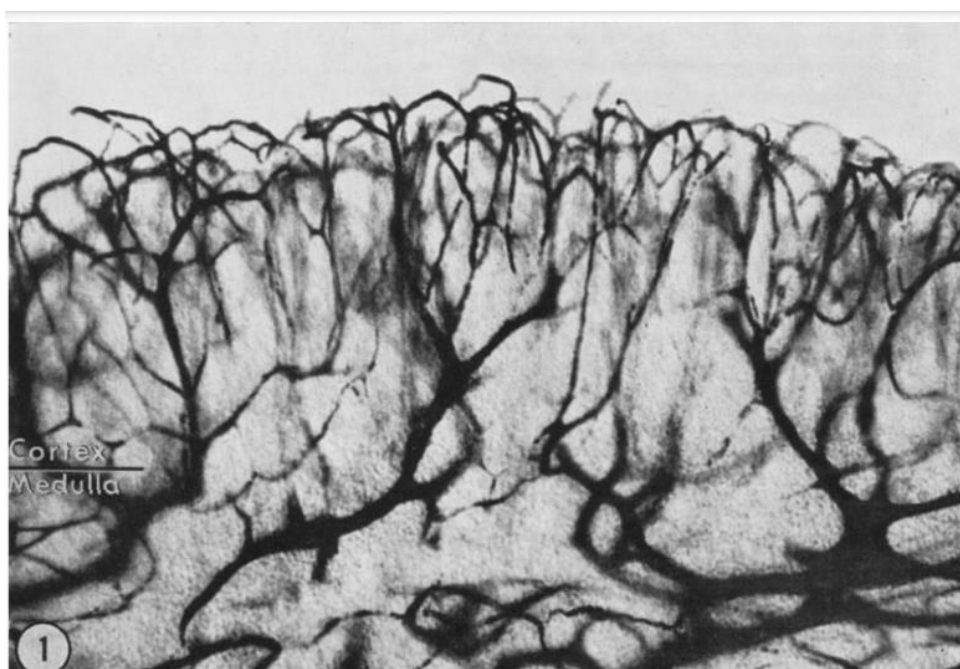
1.2 Estrutura histológica tímica

O timo é composto por uma rede tridimensional organizada (3D) de células epiteliais tímicas corticais e medulares (cTECs e mTECs, respectivamente). Entremeadas a estas células epiteliais estão dispersos linfócitos T, linfócitos B e populações de outras células distribuídas no córtex, medula e região cortimedular (PEARSE, 2006; VAN EWIJK, 2011). Histologicamente, o córtex é caracterizado por possuir uma alta densidade de timócitos, pequenos linfócitos imaturos, que dão a esta região uma aparência basofílica mais escura. Entremeados a estas células, são encontrados macrófagos e, na região subcapsular, linfoblastos grandes e mitoticamente ativos. Os linfoblastos subcapsulares se dividem rapidamente mas tem uma vida curta. Morrem por apoptose e formam os corpos apoptóticos corticais, que são fagocitados por macrófagos resultando nos chamados "macrófagos corpo

tingíveis". A medula é caracterizada pela baixa densidade de linfócitos T, a maioria maduros, com tamanho maior e com mais citoplasma que os linfócitos T corticais, o que explica a sua coloração basofílica mais clara. Suas células epiteliais são proeminentes e se juntam formando os corpúsculos de Hassal. Além de linfócitos T e células epiteliais são encontrados macrófagos, células dendríticas e linfócitos B na região medular. A zona corticomedular é caracterizada por conter vasos sanguíneos abundantes, linfócitos T maduros e imaturos, células dendríticas, linfócitos B e células plasmáticas (DUIJVESTIJN; HOEFSMIT, 1981; PEARSE, 2006).

Os vasos sanguíneos chegam e saem do timo através do hilo localizado no septo principal. A artéria hilar bifurca no septo em dois ramos, cranial e caudal que se ramificam em arteríolas. As arteríolas são sustentadas pelos septos de tecido conjuntivo que penetram os lobos até a região corticomedular, formando os lóbulos, onde estes vasos se ramificam em capilares que irrigam o córtex e a medular. No córtex, os capilares formam arcos que retornam a região corticomedular onde desembocam em vênulas e estas nas veias (Figura 3) (RAVIOLA; KARNOVSKY, 1972; SAINT-MARIE, 1974).

Figura 3-Vasos sanguíneos no timo de camundongo após injeção vascular com emulsão fotográfica. 200µm.



Fonte: RAVIOLA; KARNOVSKY, 1972.

Os vasos sanguíneos, juntamente com macrófagos e linfócitos formam uma barreira sangue-timo que controla a entrada de moléculas, principalmente na região cortical, através de junções endoteliais impermeáveis e macrófagos posicionados em uma fileira contínua ao longo dos capilares. Já na medular são encontradas vênulas pós-capilares permeáveis que deixam passar macromoléculas, e arteríolas com poucas junções endoteliais intercelulares, deixando os linfócitos medulares em contato com qualquer substância veiculada no sangue. No entanto, as moléculas que alcançam a medular não chegam ao parênquima cortical (MILIĆEVIĆ; MILIĆEVIĆ, 2004; RAVIOLA; KARNOVSKY, 1972).

1.3 Funções das células do timo

No timo são encontradas células linfoides representadas pelos timócitos e células não linfoides tais como as células sistema mononuclear fagocitário, células epiteliais e mesenquimais que compõem o estoma tímico juntamente com linfócito B (MILICEVIC et al., 1987; MILIĆEVIĆ; MILIĆEVIĆ, 2004; RITTER; BOYD, 1993; RODEWALD, 2008; STUTMAN, 1977).

1.3.1 Células epiteliais e mesenquimais

As células epiteliais tímicas (TECs) são divididas em duas populações denominadas células epiteliais corticais (cTECs) e células epiteliais medulares (mTECs) (RITTER; BOYD, 1993), porém, existem outras subpopulações celulares considerando-se morfologia e fenótipos diferentes. Por meio de imuno-histoquímica com anticorpos monoclonais para citoqueratinas foram identificados seis subtipos de células epiteliais tímicas (COLIC et al., 1989). Já em estudos ultraestruturais foram descritos sete subtipos de células epiteliais, quatro deles foram predominantemente situados no córtex e três estavam posicionados dentro da medula tímica. No córtex foram descritas as células epiteliais subcasulares paraseptais perivasculares (1), células epiteliais pálidas (2), células epiteliais intermediárias (3) e células epiteliais escuras (4). Na medula, células epiteliais indiferenciadas (5), células epiteliais grandes

medulares (6) e células epiteliais em formato de fuso (7) (MILIĆEVIĆ; MILIĆEVIĆ, 1997).

As TECs representam o principal componente celular do microambiente tímico (GUYDEN; PEZZANO, 2002), e são responsáveis pela formação de uma rede tridimensional esponjosa composta por extensões citoplasmáticas alongadas interconectadas por desmossomas, que facilitam a migração de timócitos em desenvolvimento, e melhoram as interações célula-célula entre linfócitos e componentes do estroma (VAN EWIJK, 1991; VAN EWIJK et al., 1988). As cTECs estão intimamente ligadas ao estroma, e estão relacionadas ao recrutamento das células pré-Ts da medula óssea e seu comprometimento em linfócito T, seus prolongamentos são perpendiculares a capsula permitindo a sustentação de timócitos que vão do córtex para medula, induzem a expressão do TCR e expressam MHC I e II o que permite a seleção positiva (DERBINSKI et al., 2016; MILIĆEVIĆ et al., 1992; NITTA et al., 2008). As mTECs se agrupam concentricamente formando os corpúsculos de Hassall, estruturas raras em roedores (KOHLEN; WEISS, 1964), que atuam na seleção negativa e indução de tolerância central e geração de linfócitos T regulatórios (BOEHM et al., 2003; NITTA et al., 2008).

As células mesenquimais são representadas pelas células que compõem o tecido conjuntivo da capsula e septos, e as células endoteliais (RODEWALD, 2008). No timo embrionário as células mesenquimais regulam a proliferação do epitélio tímico fornecendo fatores de crescimento para células epiteliais tímicas imaturas (JENKINSON; JENKINSON; ANDERSON, 2003). Além disso as células mesenquimais não apenas suportam a diferenciação da estrutura epitelial tímica, mas podem ter um papel no desenvolvimento inicial de células T e na linfopoiese (SUNIARA; JENKINSON; OWEN, 2000).

1.3.2 Células hematopoiéticas

Entre as células com origem hematopoiéticas do timo estão descritas as células dendríticas, os macrófagos, linfócito B (MILICEVIC et al., 1987; RODEWALD, 2008), e eosinófilos (THROSBY et al., 2000).

Os macrófagos são encontrados nas três regiões tímicas, no entanto, eles variam morfológicamente em cada área. No córtex, os macrófagos contêm linfócitos em vários estágios de degradação em seu interior, e são chamados de “macrófagos corpo tingíveis”. Na zona corticomedular, os macrófagos se caracterizam por conter numerosas inclusões vacuolares de diferentes tamanhos. E na medula são caracterizados como células interdigitantes. Atuam no reconhecimento e fagocitose de células apoptóticas, ativação da proliferação de timócitos maduros e seleção na negativa de linfócitos (MILICEVIC et al., 1987; MILIĆEVIĆ; MILIĆEVIĆ, 2004)

No timo são descritas pelo menos duas populações de células dendríticas, as linfoides ou plasmocitoides e as mielóides (DONSKOY; GOLDSCHNEIDER, 2003). Não está claro a relação das células dendríticas com o desenvolvimento de células interdigitantes, porém, as células dendríticas linfoides ou plasmocitoides parecem serem capazes de se diferenciar em células interdigitantes (Bendriss-Vermare et al., 2001).

A presença de células B no timo normal é descrita principalmente na região medular e corticomedular, em geral agrupadas em torno dos corpúsculos de Hassall, e de origem sanguínea. Estas células têm no timo um papel importante na apresentação de antígenos que permitem a seleção negativa (ISAACSON; NORTON; ADDIS, 1987; YAMANO et al., 2015).

Os eosinófilos tímicos ainda não têm função esclarecida na fisiologia tímica, no entanto parecem atuar na modulação da seleção e diferenciação de células T. A quantidade de eosinófilos no timo apresenta variações, e atingem um pico aos 14 dias de gestação seguida por uma posterior redução e novo aumento que coincide com início da involução decorrente da idade em camundongos (THROSBY et al., 2000).

1.4 Microambiente tímico e desenvolvimento células T

A maturação e desenvolvimento imunológico das células T envolve as etapas de diferenciação e proliferação, rearranjo genético do receptor de células T (TCR), e as seleções positiva e negativa (LIND et al., 2001; PEARSE, 2006).

Os timócitos passam por vários estágios sucessivos de maturação, e diferentes células não linfocitárias fornecem e mantem os nichos microambientais adequados em diferentes regiões do timo para que cada estágio de maturação ocorra (MILIĆEVIĆ; MILIĆEVIĆ, 2004). Contudo, a manutenção destes microambientes depende da presença dos linfócitos em diferenciação, caracterizando uma interação bidirecional (RITTER; BOYD, 1993; ZHANG; SUN; ZHAO, 2007).

As células pré-T são originadas no saco vitelino, fígado fetal, e na medula óssea, e migram para o timo onde são chamados de timócitos (STUTMAN, 1977). A população de timócitos pode ser dividida em três subpopulações: duplo-negativas, duplo-positivas e simples positivas, de acordo com o estágio de diferenciação em que expressam CD4 e CD8. Essa divisão reflete os eventos fisiológicos e as interações célula-célula que ocorrem no timo de acordo com características morfológicas, fenotípicas, e distribuição dos timócitos dentro do tecido do timo (MILIĆEVIĆ; MILIĆEVIĆ, 2004).

O estágio I é representado pelos timócitos imaturos que não expressam TCR ou as moléculas acessórias CD4 e CD8, devido a isto, são denominadas timócitos duplo-negativos (DN) e representam 5% do total de timócitos (SAVINO et al., 2007). Estes podem ser classificadas em quatro subestágios de diferenciação denominados DN-1, 2, 3 e 4 (LIND et al., 2001). As células pré-Ts chegam no timo na região corticomedular, estas são consideradas em estágio DN1 e tem potencial multilinhagem, incluindo linfócitos T e B, e células dendríticas. Durante a migração através do córtex as células DN1 tornam-se DN2, e se acumulam na região subcapsular. Estas têm potencial de originar linhagens T e células dendríticas e se diferenciam em DN3. As DN3 já estão absolutamente comprometidas com a linhagem T, mas ainda podem dar origem as células α/β ou γ/δ , geralmente encontradas no terço externo do córtex (PETRI; SCOLLAY; SHORTMAN, 1992; WU; LI; SHORTMAN, 1996). As DN4 representam uma população préT-duplo positivas (TOURIGNY et al., 1997).

As duplo positivas (DP) representam o segundo estágio de diferenciação e são uma população que expressa CD4 e CD8 e representam 80% de toda a população tímica (SAVINO et al., 2007). No próximo nível de maturação as DP se diferenciam em CD8⁺ ou CD4⁺ positivos únicos o terceiro estágio de diferenciação. Nesta fase ocorre o desenvolvimento do TCR e este permite a diferenciação para o estágio III de

diferenciação, simples positivo (CAMPBELL; HASHIMOTO, 1993), que é dependente do envolvimento bem-sucedido do TCR no DP com moléculas de classe do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Neste ponto, a interação com MHC I leva à diferenciação em precursores de células T citotóxicas/supressoras CD8⁺, enquanto que o envolvimento com MHC II leva à diferenciação em precursores de células T auxiliares CD4⁺ (DE WAAL et al., 1997; KISIELOW et al., 1988).

Após se tornarem simples positivas, as células T passam pela seleção negativa que consiste na eliminação por apoptose de células que reagem a autoantígenos (KAPPLER; ROEHM; MARRACK, 1987). Após uma meticulosa seleção as células que cumprem os rigorosos critérios funcionais são liberadas do timo para compor o pool de linfócitos periféricos (MILIĆEVIĆ; MILIĆEVIĆ, 2004).

1.5 Leishmaniose Visceral

As leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas parasitárias com significativa diversidade clínica e epidemiológica causada por várias espécies diferentes do protozoário *Leishmania* (BANETH et al., 2008). A LV é causada pelo protozoário *Leishmania donovani* em seres humanos e *L. infantum* (chagasi) em humanos e cães (MULLA; OSMAN HUSSIEN; MOHAMED ELHUSSEIN, 2016). É transmitida principalmente durante o repasto sanguíneo de flebotomíneos fêmeas, na forma de promastigotas metacíclicas flageladas, que são fagocitadas por macrófagos onde se diferenciam em amastigotas não flageladas. Tem como principal vetor no continente americano o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (BANETH et al., 2008; STANLEY; ENGWERDA, 2007).

A OMS estima que o risco de transmissão de *Leishmania sp* atinja mais de 350 milhões de pessoas, sendo que a LV foi considerada endêmica em 78 países e territórios (WHO | EPIDEMIOLOGICAL SITUATION, 2020). No período de 2011 até 2018 houve uma tendência decrescente no número de casos notificados, com menos de 20.000 casos anuais. Esta redução se deve ao programa de eliminação de LV na região do Sudeste Asiático, a única região em que a prevalência da doença tem diminuído de forma acentuada e continua. Contudo, a leishmaniose continua a se espalhar, com quatro novos países sendo adicionados como endêmicos de 2017 a 2018. O Brasil

está entre os cinco países que reportaram mais de 1000 casos em 2018 representando 83% dos casos globais (OPS, 2017).

1.5.1 Resposta Imune a Leishmaniose Visceral

A evolução clínica da LV depende da resposta imune desenvolvida. Em geral as células alvo do parasita são os macrófagos que devido sua atividade antiparasitária inibida, servem como local de replicação (BANETH et al., 2008; BARBIÉRI, 2006; NYLÉN; GAUTAM, 2010).

Resumidamente, a susceptibilidade à leishmaniose decorre da capacidade do protozoário de modular a resposta imune através de um desequilíbrio entre as respostas Th1 e Th2. Provocando uma resposta imune predominante humoral, com perfil de citocinas Th2 como a IL-4, IL-10 e TGF- β , que são ineficientes no controle da multiplicação do protozoário. A resposta Th2 está relacionada à ocorrência de lesões sistêmicas, com proliferação de linfócitos B, plasmocitose, hipergamaglobulinemia e formação de imunocomplexos. A apresentação assintomática é caracterizada por uma resposta predominante Th1, com a produção de citocinas como INF- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12, e proliferação de linfócitos T CD4+ e CD8+ (BARBIÉRI, 2006; NYLÉN; GAUTAM, 2010; PERUHYPE-MAGALHAES et al., 2005). Os linfócitos T-reguladores participam da susceptibilidade à LV através da supressão da resposta Th1 pela IL-10 (ANDERSON; MENDEZ; SACKS, 2005). O papel da resposta Th17 ainda permanece controverso, estando relacionada a lesões mais graves em estudo *L. major* (ANDERSON et al., 2009) e com redução da carga parasitária em estudo com *L. infantum* (QUIRINO et al., 2016).

A ativação dos diferentes subgrupos de respostas na LV depende da interação de células apresentadoras de antígenos (APCs), macrófagos e células dendríticas, com a TCD4+ modulando a secreção de citocinas (LEÓN; LÓPEZ-BRAVO; ARDAVÍN, 2007). Para se manter a *Leishmania* precisa evitar a ativação de macrófagos e o reconhecimento de antígenos pelas células T utilizando-se de vários mecanismos, tais como entrada silenciosa nos macrófagos utilizando receptores não desencadeantes que levam a fagocitose não inflamatória utilizado para fagocitose de células apoptóticas, como CR1 e o receptor de fosfatidilserina, a inibição da função do

macrófago e regulação negativa de co-receptores como B7 e do MHC de classe II, e promovendo a produção de citocinas regulatórias como IL-10 e TGF β (GOTO; LINDOSO, 2004; KIMA, 2007; ROSENTHAL et al., 1996; UENO et al., 2009; WANDERLEY et al., 2006).

1.6 Modelo experimental

O hamster é considerado um importante modelo experimental na LV devido à sua suscetibilidade à infecção por diferentes cepas de *Leishmania* (REQUENA et al., 2000), desenvolvendo sinais clínicos e alterações patológicas semelhantes às observadas nas doenças humanas e caninas (MOREIRA et al., 2012). A infecção experimental e a progressão da doença no hamster podem ser conduzidas a partir de um inóculo próximo ao que ocorre durante a infecção natural (REQUENA et al., 2000; WARBURG; SCHLEIN, 1986), e após a infecção sistêmica desenvolvem uma carga parasitária visceral progressiva, esplenomegalia, disfunção da medula óssea, caquexia e morte (MELBY et al., 2001).

Apesar de muito utilizados em estudos experimentais da LV, os camundongos podem não reproduzir as características da LV humana ativa, o que vai depender da linhagem do camundongo, via de inoculação e carga da infecção experimental. Além disso, mesmo os camundongos BALB/c que possuem supressão do gene *Slc11a1* que permite o aumento inicial da carga parasitária no fígado, posteriormente desenvolvem mecanismos imunes adquiridos que controlam a carga parasitária em baço (KAYE et al., 2004; NIETO et al., 2011; PACIELLO et al., 2010).

Levando em consideração esses fatores, o hamster sírio foi considerado um bom modelo experimental para o estudo das características patológicas da LV ativa (NIETO et al., 2011).

1.7 Alterações no timo durante a leishmaniose visceral

O timo é afetado por diversos agentes infecciosos, tais como bactérias, vírus, fungos e helmintos (SAVINO, 2006). Entre os protozoários descritos afetando o timo temos a *L. infantum* (*chagasi*), *L. donovani*, *L. tropica*, *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium chabaudi chabaudi* (COSTA et al., 2003; CUERVO-ESCOBAR et al., 2014; GONZÁLEZ et al., 2016; SCHNUR; ZUCKERMAN; MONTILIO, 1973). A presença de amastigotas de *L. infantum* foi descrita no timo de cão, camundongo e hamster (CUERVO-ESCOBAR et al., 2014; GONZÁLEZ et al., 2016; LOSADA-BARRAGÁN et al., 2017; SCHNUR; ZUCKERMAN; MONTILIO, 1973).

No estudo em cães naturalmente infectados com *L. infantum* foram colhidos 16 timos. Além da avaliação histológica, foram submetidos à imuno-histoquímica para pesquisa do parasito e detecção de laminina e fibronectina. Também foi feita pesquisa do DNA do parasito com hibridização *in situ* e reação em cadeia da polimerase (PCR). Na imuno-histoquímica foram detectadas amastigotas em 8 timos, enquanto que, no PCR foi encontrado DNA de *L. infantum* em 14 timos. Nos timos onde não foi detectado DNA por PCR, este foi detectado por hibridização *in situ*. NO exame histopatológico os autores relataram a ocorrência de timite granulomatosa ou piogranulomatosa com maior deposição de fibronectina em cães com mais sinais clínicos (SILVA et al., 2020).

Três estudos utilizaram camundongos BALB/c divididos em quatro grupos. O 1º grupo foi não infectado e foi mantido bem nutrido em proteínas, o 2º foi infectado e mantido bem nutrido em proteínas, o 3º grupo não infectado mantido malnutrido em proteínas e o 4º grupo foi infectado e mantido malnutrido em proteínas. Nestes estudos foram avaliados parâmetros como peso, histologia e morfometria tímicas. A presença de amastigotas no timo foi investigada com imuno-histoquímica e imunofluorescência, e as populações celulares foram avaliadas por meio de citometria de fluxo. Os estudos incluíram também a expressão genica de citocinas e quimiocinas por RTqPCR, e detecção de citocinas e quimiocinas pela técnica de luminex e teste ELISA. Como resultado, os autores observaram que no grupo infectado e bem nutrido houve aumento de peso e celularidade do timo, em contraste a uma redução na porcentagem de tímócitos duplo positivos e linfócitos TCD4⁺. Além disso a expressão de citocinas e quimiocinas, e a quantidade de proteínas no timo também foram

alteradas pela LV(CUERVO-ESCOBAR et al., 2014; LOSADA-BARRAGÁN et al., 2017, 2019).

No estudo realizado em hamsters foram utilizados 5 grupos infectados de sete animais eutanasiados nos dias 7, 15, 30, 45 e 60 após a infecção. Foram realizadas avaliações histopatológicas do timo com colorações de hematoxilina-eosina, Giemsa, coloração prata de Wilder e solução de verde de metila pironina para identificar plasmócitos. Neste estudo não foram encontradas amastigotas no timo e nem atrofia tímica até os 60 dias após infecção (CORBETT et al., 1992).

1.8 Justificativa

O desenvolvimento de doença clínica progressiva na LV depende da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro. Esta resposta é órgão específica, estando as respostas do Th1, Th2, Th17 e Treg envolvidas na LV. O timo é um órgão linfoide primário responsável pelo desenvolvimento dos linfócitos T, o que torna importante o estudo do timo durante a LV progressiva para se compreender o papel do timo da doença sistêmica. Além disto, a escassa literatura existente sobre alterações tímicas durante há LV, reforçam a importância deste estudo.

1.9 Objetivos

Pesquisar a presença de amastigotas de *L. infantum* no timo e identificar possíveis alterações na morfologia do órgão. Também será estudado a presença e na e distribuição das células hematopoiéticas e estromais no timo de hamsters (*Mesocricetus auratus*) em diferentes momentos após a inoculação de *L. infantum*.

2 CAPITULO 1- EFEITOS DA INFECÇÃO POR LEISHMANIA INFANTUM NA MORFOLOGIA E COMPOSIÇÃO CELULAR DO TIMO DE HAMSTER (MESOCRICETUS AURATUS)

Março, K.S. **Effects of *Leishmania infantum* infection on the morphology of the hamster thymus (*Mesocricetus Auratus*)**. 2020. 80f. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

2.1 Resumo

A leishmaniose visceral é uma zoonose com significativa diversidade clínica e epidemiológica, causada por várias espécies diferentes do protozoário *Leishmania*. A maioria das pessoas e cães expostos à leishmaniose não desenvolve doença clínica, o que decorre do padrão de resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro, sendo que os mecanismos que direcionam a resposta imune e resultam em susceptibilidade ou resistência a doença ainda não foram completamente elucidados. O fato de o timo ser um órgão linfóide importante no desenvolvimento de células T, que são responsáveis por orientar as respostas imunes dos tipos Th1, Th2, Th17 e Treg envolvidas na resposta à infecção pela *Leishmania*, faz com que o estudo de parâmetros morfológicos, composição celular e parasitológico no timo, durante o curso da infecção, sejam importantes. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar características morfológicas e a distribuição tecidual das células hematopoiéticas e estromais no timo de hamsters infectados experimentalmente. Para isso foram utilizados 15 hamsters infectados experimentalmente com 10^7 promastigotas de *Leishmania infantum* (MHOM/BR/1972/BH46) por via intraperitoneal e divididos em três grupos com cinco hamsters, que foram eutanasiados em diferentes tempos pós-infecção, aos 15 (I-15), 60 (I-60) e 120 (I-120) dias. O grupo controle foi constituído por seis hamsters, eutanasiados nos tempos I-15 e I-120. Utilizando técnicas histopatológicas e imuno-histoquímica avaliamos a presença de atrofia, inflamação, alteração morfológica e a distribuição dos tipos celulares do timo.

Notamos que após 15 dias de infecção ocorreu um aumento de linfócitos T CD3+ no timo que se normalizou com tempo aos valores de parâmetros normais, e que aos 120 dias de infecção, ocorreu uma redução de linfócitos B CD79a+. Além disso amastigotas intactas de *Leishmania* estavam presentes em 9/15 hamsters confinada nas regiões medular e corticomedular do timo. Estes achados confirmam que a presença do parasito causa alterações na população celular do timo. Mais estudos são necessários para avaliar o reflexo destas alterações na resposta imune dos animais infectados.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral. Histopatologia. Imuno-histoquímica. Linfócitos.

Março, K.S. **Efeitos da infecção por *Leishmania infantum* na morfologia do timo de hamster (*Mesocricetus auratus*)**. 2020. 80 f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

2.2 Abstract

Visceral leishmaniasis is a zoonosis that presents variable clinical and epidemiological aspects, being caused by several species of the *Leishmania* protozoan. Most people and dogs exposed to leishmaniasis do not have clinical disease, which results from the pattern of immune responses developed by the host. However, the mechanisms that direct immune responses and result in susceptibility or resistance to the disease have not yet been fully elucidated. The fact that the thymus is an important lymphoid organ in the development of T cells, responsible for guiding the Th1, Th2, Th17 and Treg immune responses involved in the response to *Leishmania* infection, makes it important to study the morphological, cellular and parasitological composition in the thymus during the course of the infection. Thus, the present study aimed to evaluate the morphological characteristics and tissue distribution of hematopoietic and stromal cells in the thymus of experimentally infected hamsters. For this, 15 hamsters were experimentally infected with 10^7 promastigotes of *Leishmania infantum* (MHOM/BR/1972/BH46) intraperitoneally and divided into three groups with five hamsters, which were sacrificed at different times pos-infection in 15 (I-15), 60 (I-60) and 120 (I-120) days. The control group consisted of six hamsters, sacrificed at times I-15 and I-120. Using histopathological and immunohistochemical techniques, we evaluated the presence of atrophy, inflammation, morphological changes and the distribution of thymus cell types. We observed that after 15 days of infection there was an increase in CD3 T lymphocytes in the thymus, which tends to normalize with normal values, according to age, and that at 120 days of infection there is a reduction of CD79a B lymphocytes. These findings confirm that the presence of the parasite causes changes in the thymus cell population. Further studies are evaluated to assess the reflex changes in the immune response of infected animals.

Keywords: Visceral leishmaniasis. Histopathology. Immunohistochemistry. Lymphocyte.

2.3 Introdução

A leishmaniose visceral (LV) é uma enfermidade infecciosa parasitária de caráter crônico e sistêmico com apresentação clínica e epidemiológica variável [1,2]. Segundo a organização mundial da saúde 350 milhões de pessoas estão sobre o risco de transmissão de leishmaniose no mundo [3]. Em 2018, 200 países e territórios notificaram casos à OMS, 39% (78) deles foram considerados endêmicos, estando 12 (15%) destes localizados nas Américas. Desde 2011 o número de casos notificados vem reduzindo, mas apesar disso, a leishmaniose continua a se espalhar e quatro novos países foram adicionados como endêmicos no período de 2017 a 2018 [4].

A evolução clínica da LV depende da resposta imune desenvolvida [2]. Resumidamente, a susceptibilidade a LV decorre da capacidade do protozoário de modular a resposta imune, através de um desequilíbrio entre as respostas Th1 e Th2, provocando uma resposta imune predominante humoral, com perfil de citocinas Th2 ineficientes no controle da multiplicação do protozoário e relacionadas à ocorrência de lesões sistêmicas. Já hospedeiros assintomáticos tem uma resposta predominante Th1 com proliferação de linfócitos T CD4+ e CD8+ [5]. Outros estudos também descrevem a participação de linfócitos T reguladores (Treg) e da resposta Th17 na leishmaniose. As células Treg estão envolvidas na produção de IL-10 e supressão da resposta Th1, contribuindo para o desenvolvimento da doença progressiva [6]. O papel da resposta Th17 durante a leishmaniose até o momento é confuso, e a influência da presença de interleucina IL-17 e conseqüentemente dos neutrófilos durante a infecção é dependente do tecido e espécies dos parasitas [7-9].

O timo é um órgão linfo-epitelial responsável por promover a maturação e desenvolvimento imunológico dos linfócitos T, que após a diferenciação dentro do timo expressam um amplo repertório de receptores TCR, capazes de reconhecer virtualmente qualquer antígeno estranho [10]. Os linfócitos T CD4+ que deixam o timo são constituintes de vários subgrupos de respostas imunes, sendo os subgrupos Th1, Th2, Th17 e Treg os mais descritos [11].

Para que a maturação e desenvolvimento imunológico dos linfócitos T ocorram é necessária uma interação bidirecional entre o microambiente tímico, composto por

células epiteliais, células dendríticas, macrófagos e a matriz extracelular com os linfócitos em diferenciação [12,13]. Os componentes não hematopoiéticos do timo podem ser classificados conforme a expressão de citoqueratinas, onde células epiteliais tímicas são queratina positivas e as mesenquimais que compõe vasos sanguíneos, septos e capsula não expressam esta proteína [14]. As células mesenquimais tímicas podem ser identificadas pela expressão positiva de vimentina [15].

Histologicamente o timo pode ser dividido em três regiões, córtex, medula e região cortimedular. O córtex é caracterizado por possuir uma alta densidade de timócitos, células epiteliais e macrófagos entremeados. A medula é caracterizada pela baixa densidade de linfócitos T maduros e células epiteliais proeminentes, macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. A transição entre o córtex e a medula forma a zona corticomedular, caracterizada por conter vasos sanguíneos abundantes, linfócitos T maduros e imaturos, células dendríticas, linfócitos B e células plasmáticas[16,17]. Além desses os eosinófilos também são descritos como residentes no timo [18].

A presença de amastigotas de *Leishmania infantum* foram relatadas no timo em estudos com camundongos BALB/C [19] e em cães [20], e também em cultura de amostras de tecido de hamsters [21]. Na infecção pela *L. infantum* foi observada atrofia do timo e timite granulomatosa ou piogranulomasosa em cães, e aumento de celularidade e do peso do timo em contraste com redução da porcentagem de linfócitos TCD4+/CD8+ e TCD4+ em camundongos [19,20,22].

Neste estudo, usamos o hamster como modelo para avaliar o efeito da infecção por *L. infantum* na morfologia do órgão e na sua composição celular. Utilizando imunohistoquímica demonstramos que a *L. infantum* está presente no timo dos animais infectados. A presença do parasito e/ou os efeitos sistêmicos da doença inicialmente resultam em aumento do número total de linfócitos T CD3+, e em uma fase mais tardia, ocorre redução do número total de linfócitos B CD79a+. No entanto, a infecção não afeta a involução fisiológica do timo, e a distribuição e número de células epiteliais, mesenquimais e macrófagos.

2.4 Materiais e Métodos

2.4.1 Delineamento Experimental

Quinze hamsters inoculados por via intraperitoneal com 10^7 promastigotas de *Leishmania infantum* (MHOM/BR/1972/BH46), em fase estacionária de crescimento mantidas por no máximo quatro passagens em meio de cultura Schneider suplementado 10% com soro fetal bovino, foram divididos aleatoriamente em 3 grupos com cinco animais, que foram eutanasiados em diferentes tempos pós-infecção, 15 (I-15), 60 (I-60) e 120 (I-120) dias. O grupo controle foi constituído por seis animais que foram eutanasiados nos tempos I-15 (n=3) e I-120 (n=3) (Fig S1).

2.4.2 Animais

Foram utilizados hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*), machos entre seis e oito semanas de idade com peso corporal entre 50 a 80g, originados do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, onde foram mantidos em gaiolas com temperatura constante, e ciclo de luz e escuro de 12 horas, ração comercial e água à vontade até o momento da eutanásia. Os animais foram inoculados e mantidos no Biotério de Experimentação Animal do Instituto de Medicina Tropical até o momento em que foram eutanasiados para colheita das amostras. O processamento histológico e imunohistoquímico foi realizado no LAPap (Laboratório de Patologia Aplicada) na FMVA-Araçatuba-UNESP.

2.4.3 Ética

Todos os procedimentos e métodos utilizados no estudo foram submetidos à avaliação das Comissões de Ética no Uso de Animais – CEUA da FOA, UNESP, Araçatuba/SP, nº00620-2019, e USP-São Paulo/SP, nº172/14

2.4.4 Colheita do Material

A eutanásia foi realizada com dose letal de tiopental sódico (120 mg/kg) seguida pela realização de necropsia para colheita do timo, baço e fígado. O timo foi então separado em dois lobos, um lobo foi juntamente com fragmentos de baço e fígado, fixados em formalina 10% e processados rotineiramente para inclusão em parafina e o outro foi armazenado por 24 horas a temperatura de 4°C e posteriormente estocado a -80°C para utilização em outros experimentos.

2.4.5 Comprovação da infecção

Para comprovar a infecção sistêmica foi realizada imuno-histoquímica para detecção de amastigotas em fígado e baço segundo Tafuri et al. [23]. Utilizando como anticorpo primário soro hiperimune heterólogo de camundongo cronicamente infectado com *Leishmania (V.) shawi* (MHOM/BR/1996/m15789) (gentilmente cedido pela Professora Marcia Dalastra Laurenti) na concentração de 1:1000 em PBS com BSA 1%, incubado por duas horas em estufa a 37°C. O sistema estreptavidina-biotina com incubações de 45 min a 37°C (Kit Link-DAKO, LSAB2, Catálogo nº KO675-1; Carpinteria, Califórnia, EUA) foi utilizado como anticorpo secundário.

2.4.6 Histologia e morfometria do timo

Cortes histológicos com 5µm foram corados com hematoxilina e eosina ou tricrômico de Masson, e avaliados em microscopia de luz para avaliação de parâmetros morfológicos.

A atrofia foi avaliada subjetivamente e classificadas em linha gerais segundo van Baarlen [24]. O grau 0 foi definido pelo a distinção clara da demarcação corticomedular e alta densidade de linfócitos no córtex, com lóbulos compactados e separados apenas por delicados septos de tecido conjuntivo e presença discreta de linfocitose no córtex. O grau 1 foi definido como idêntico ao grau 0, exceto pela presença de moderada linfocitose no córtex. O grau 2 foi definido por uma

linfocitose acentuada no córtex, com aparecimento de sinais de redução do córtex e septos de tecido conjuntivo mais espessados. Em outros aspectos, o quadro histológico foi semelhante ao de grau 0 ou 1. O grau 3 foi definido por uma perda de distinção entre o córtex e a medular em baixa ampliação, linfocitose acentuada, estreitamento irregular do córtex e separação crescente dos lóbulos tímicos. O grau 4 foi definido por uma linfodepleção acentuada do córtex, inversão histológica, perda frequente da demarcação corticomedular, proeminência do interstício e dos vasos sanguíneos, encolhimento e separação acentuada dos lóbulos tímicos.

A inflamação foi avaliada por dois examinadores de forma subjetiva com base na experiência do histopatologista. Foi avaliada a presença de alterações como inflamação granulomatosa ou piogranulomatosa, e presença de células inflamatórias nas trabéculas de tecido conjuntivo, que foram descritas previamente em cães com LV [20].

A avaliação morfométrica foi realizada segundo o protocolo descrito por Bozzetta et al. [25], com algumas modificações. Para tal, as secções do timo coradas com HE, em ampliação 100x, foram medidas em imagens capturadas com microscópio Olympus BX 50 acoplado a Câmera e computador e avaliadas com software cellSens (Olympus Life Science). A espessura do córtex e da medula foi mensurada em 10 lóbulos compostos por um córtex externo e medula interna e cercados por tecido conjuntivo, selecionados aleatoriamente, para o cálculo da razão córtex:medula (Fig S2).

Com a aplicação da coloração de tricrômico de Masson a porcentagem de área de tecido conjuntivo foi avaliada no software ImageJ em 10 imagens capturadas com ampliação 400x (Dispositivo de imagem digital Olympus BX 50 acoplado a Câmera e computador).

2.4.7 Imuno-histoquímica

Foi realizada reação imuno-histoquímica em cortes histológicos do timo dos hamsters para detecção de linfócitos T e B, células de origem mesenquimal, células

de origem epitelial e macrófagos utilizando os anticorpos primários conforme Tabela 1.

A imuno-histoquímica para detecção de amastigotas de *Leishmania spp* foi realizada segundo Tafuri et al. [23]. Para tanto foi utilizado soro hiperimune heterólogo de camundongo cronicamente infectado com *Leishmania (V.) shawi* (MHOM/BR/1996/m15789) como anticorpo primário (gentilmente cedido pela Professora Marcia Dalastra Laurenti).

Os anticorpos primários foram utilizados segundo recomendação do fabricante ou diluídos em tampão de PBS contendo soro fetal bovino 1%. A diluição padronizada para uso dos anticorpos primários e a recuperação antigênica estão descritos na tabela 1. Para o controle negativo das reações foi adicionado o diluente sem anticorpo primário (Fig S3). Como controle positivo das reações, os anticorpos foram testados em tecido humano (tonsila). Após a recuperação antigênica, as secções histológicas foram lavadas com uma solução de PBS pH 7,4, e em seguida tratadas por 30 min com peróxido de hidrogênio a 3% diluído em metanol 50% em água, para bloquear a atividade endógena da peroxidase. Após lavadas 3 vezes com PBS pH7,4, as sessões foram incubados por 30 min em temperatura ambiente com um tampão de bloqueio contendo 3% de leite em pó desnatado (Molico®) em PBS pH7,4, para bloquear sítios de ligação inespecíficos.

Todos os anticorpos primários foram incubados "overnight" por 12 a 14 horas a 4°C em câmara úmida. Com exceção do soro hiperimune de camundongo, que foi incubado por duas horas em estufa a 37°C. Após três lavagens com PBS pH7,4, os cortes foram incubados com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (EnVision™ FLEX - HRP) por 40 min a temperatura ambiente. Para o soro hiperimune anti-*leishmania* foi utilizado o sistema estreptavidina-biotina com incubações de 45 min a 37°C (Kit Link-DAKO, LSAB2, Catálogo nº KO675-1; Carpinteria, Califórnia, EUA). Após três lavagens com PBS pH 7,4 foi realizada a incubação com cromógeno (Tabela 1), lavagem em água corrente e contracoloração com hematoxilina. Em seguida os cortes foram desidratados, diafanizados e montados com resina transparente (Entelan®) e lamínulas de vidro.

Tabela 1- Lista de anticorpos, concentração, método de recuperação antigênica e cromógeno utilizados nas reações de imuno-histoquímica

Célula/ Parasita	Anticorpo	Concentração	Recuperação antigênica	Substrato Cromógeno	Referência
Linfócitos T CD3+	Anti-CD3 anti- humano (DAKO)	Pré-diluído	Citrato pH6	3,3'- diaminobezidine (DAKO)	[26,27]
Linfócitos B	Anti-CD79a anti-humano Clone 11E3 (Novocastra™)	1:100	Citrato pH6	ImmPACT™VIP- VECTOR)	
Linhagem macrofágica	MAC-387 rato, coelho, bovino, cão, suíno e macaco (Abcam®)	1:300	Citrato pH6	ImmPACT™VIP- VECTOR)	[27,28]
Origem epitelial	Anti- citoqueratina Anti-humano Clone AE1/AE3 (Dako)	Pré-diluído	Tris Hcl pH 9 (EnVision™ FLEX, High pH - Dako®)	3,3'- diaminobezidine (DAKO)	[29]
Origem mesenquimal	Monoclonal Anti-Vimentin Clone V9 (Dako)	Pré-diluído	Tris Hcl pH 9 (EnVision™ FLEX, High pH - Dako®)	3,3'- diaminobezidine (DAKO)	[30]
Leishmania spp	Soro hiperimune Camundongo*	1: 1000	Citrato pH6	ImmPACT™VIP- VECTOR)	[23]

* Cedido pela Professora Marcia Dalastra Laurenti

Para controle da especificidade do anticorpo anti-CD79a clone 11e3 para detectar linfócitos B em tecido de hamster, foi padronizada a reação em tecido de tonsila humana e baço de hamster. Observamos um padrão morfológico da marcação de folículos (Fig S3), e a localização morfológica das células marcada estava de acordo descrito por estudos em timo [16].

2.4.8 Avaliação da Imuno-histoquímica

A imunomarcagem para os diferentes anticorpos foi avaliada com auxílio de um sistema de análise de imagem computadorizada (Olympus BX 50 acoplado a Câmera e computador). Após calibrado o sistema, realizou-se a captura de imagens, em objetiva de 40x resultando em uma ampliação final de 400x. Foram avaliadas 10 áreas distintas por corte histológico, cada uma medindo 89.432 μm^2 . O software Image J 1,52a foi utilizado para avaliar a percentagem média das áreas imunomarcadas de

todos os anticorpos e para contagem de parasitos imunomarcados em baço e fígado, que foi realizada por contagem manual de parasitos/área em μm^2 , tendo como resultado densidade parasitária em amastigotas/ μm^2 . Esta avaliação permitiu a comprovação da infecção e progressão da doença (Fig S4).

2.4.9 Análise estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi usado para avaliar a normalidade dos dados. As diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis e Dunn, para dados não paramétricos e ANOVA e Tukey para dados paramétricos. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software Prism (v8.0.1, GraphPad, La Jolla, CA, EUA).

2.5 Resultados

2.5.1 Detecção e densidade parasitária de *L. infantum* em baço, fígado e timo

Para comprovar a infecção sistêmica dos hamsters verificamos a presença de amastigotas em baço, fígado e timo por meio de imuno-histoquímica, e determinamos a densidade parasitária (amastigotas/ μm^2) em baço e fígado.

As amastigotas foram detectadas no baço de 15/15 (100%) e em fígado em 14/15 (93,3%) dos hamsters experimentalmente infectados (Figura 1A-H). Em timo as imunomarcações de amastigotas de *Leishmania Spp* foram observadas em 9/15 dos hamsters experimentalmente infectados, na região medular e corticomedular. Poucas amastigotas foram encontradas no timo o que inviabilizou o cálculo da densidade parasitária neste órgão. Não observamos formas amastigotas no citoplasma de macrófagos no timo (Figura 1B-1C). Tanto no baço como no fígado densidade parasitária média aumentou gradativamente com a progressão da doença (Tabela 2) (Figura 1G e H).

Tabela 2- Densidade parasitária em baço e fígado.

Órgão	Grupo		
	I-15 Média+DP	I-60 Média+DP	I-120 Média+DP
Fígado	$8 \times 10^{-6} \pm 9 \times 10^{-6}$	$2,9 \times 10^{-5} \pm 3,4 \times 10^{-5}$	$1,38 \times 10^{-4} \pm 2,51 \times 10^{-4}$
Baço	$1 \times 10^{-5} \pm 5 \times 10^{-6}$	$9,4 \times 10^{-5} \pm 1,11 \times 10^{-4}$	$9,5 \times 10^{-4} \pm 1,188 \times 10^{-3}$

Hamsters infectados por *L. infantum* Densidade calculada pela contagem de amastigotas marcadas Imuno-histoquímica (amastigotas/ μm^2 . DP- Desvio Padrão).

Figura 1- Detecção imuno-histoquímica de amastigotas em baço, fígado e timo. Amastigotas (setas) foram detectadas por imuno-histoquímica. A e F – Soro hiperimune de camundongo + ImmPACT™VIP, C e D - Soro hiperimune de camundongo + 3,3'-diaminobezidina- DAKO. (A) Baço de hamster controle positivo da reação. (B) Baço controle negativo sem adição de anticorpo primário. (C) Baço do hamster I2-120. (D) Fígado de hamster I-120. (E) Animal controle negativo (C1-15). (F) Timo de hamster I-120. Bar=20 μm . G- Densidade parasitária no baço dos hamsters dos grupos infectados com de *L. infantum*, I-15(15 dias pós-infecção), I-60 (60 dias pós-infecção) e I-120 (120 dias pós infecção) expresso em média \pm desvio padrão. H Densidade parasitária em fígado dos hamsters dos grupos infectados com de *L. infantum*, I-15(15 dias pós-infecção), I-60 (60 dias pós-infecção) e I-120 (120 dias pós infecção) expresso em média \pm desvio padrão.

2.5.2 Histologia e morfometria do timo

Para determinar se a infecção pela *L. infantum* afetou a morfologia do timo foram realizadas avaliações em cortes corados por HE, buscando alterações compatíveis com atrofia tímica e/ou inflamação no parênquima. Os cortes corados por HE também foram utilizados para avaliação morfométrica e determinação da razão córtex:medula.

O grau de atrofia foi avaliado segundo van Baarlen [23], a perda de demarcação corticomedular foi observada em 10 hamsters infectados (6,7%) e 2 (3,3%) controles, a proeminência do tecido conjuntivo formando ilhas de timócitos variou foi observada em 6 hamsters infectados (40%) e 3 (50%) controles, a linfocitose foi observada em todos os hamsters infectados e controles, enquanto que a inversão histológica não foi observada em nenhum hamster. Notamos que houve um aumento no grau de atrofia conforme a idade, no entanto, não houve diferença significativa entre os grupos (Tabela 3).

Avaliamos a presença de inflamação granulomatosa ou piogranulomatosa e presença de células inflamatórias nas trabéculas, no entanto não observamos inflamação no timo dos hamsters.

Para avaliar a quantidade de tecido conjuntivo e/ou aumento proporcional de tecido conjuntivo no timo por redução de outros componentes, foi utilizada a coloração de tricrômico de Masson, que cora o colágeno maduro em azul. A quantidade de tecido conjuntivo variou significativamente devido ao tempo, com aumento da porcentagem de área corada em azul entre os grupos controles (C-15 e C-120) ($p=0,0069$), sendo que o C-120 também teve média de área azul significativamente maior que os grupos infectados dos tempos 15 ($p=0,0076$) e 60 ($p=0,0113$) e não diferiu do grupo infectado com mesma idade (Tabela 3 e Figura 2A-2C).

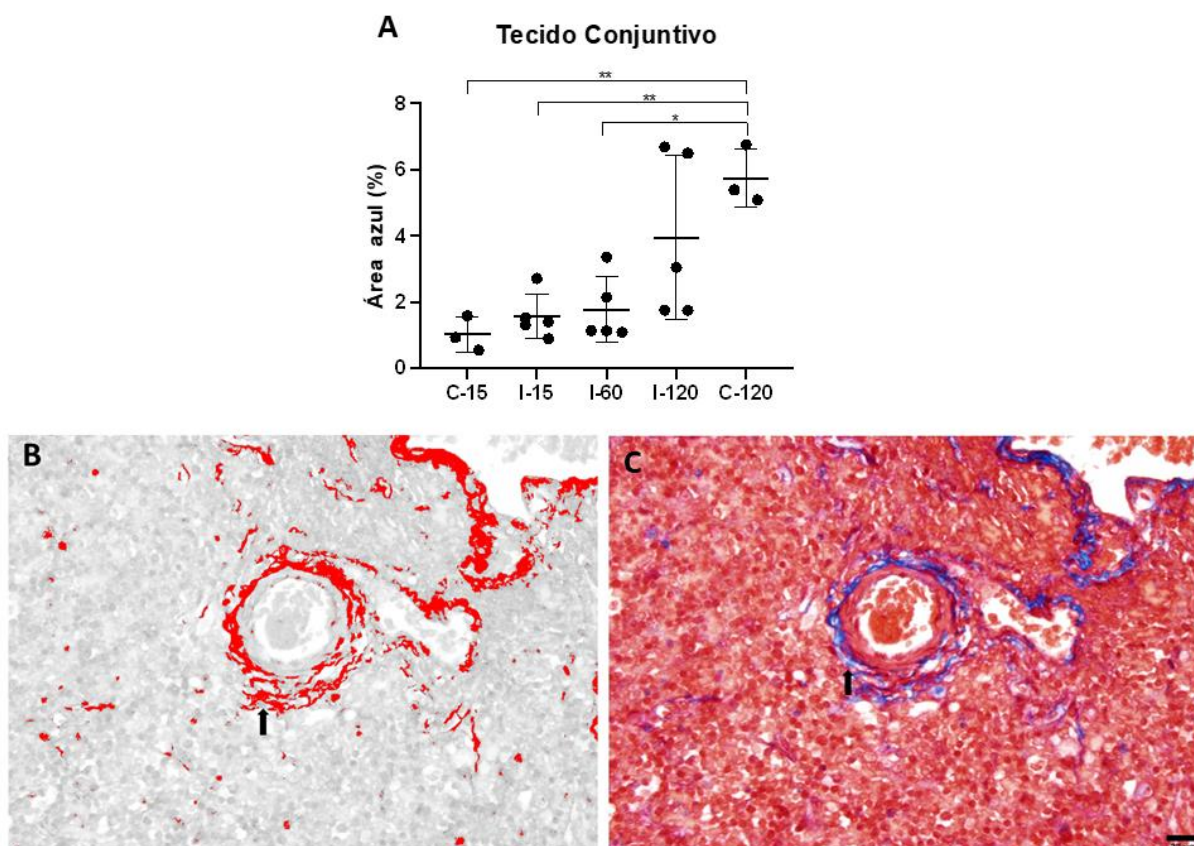
Tabela 3- Histologia e morfometria do timo.

Parâmetro	Grupo				
	C-15	I-15	I-60	I-120	C-120
	Média±DP	Média±DP	Média±DP	Média±DP	Média±DP
Razão C:M	1,848±0,091	2,180±0,404	2,059±0,543	1,230±0,486	1,123±0,131

Atrofia	0,000±0,000	0,800±0,837	1,000±1,000	1,800±1,095	1,667±0,577
Colágeno	1,013±0,526 ^a	1,564±0,683 ^b	1,770±0,993 ^c	3,944±2,478	5,747±0,8903 ^{abc}

DP- Desvio Padrão; C:M córtex:medula; As letras indicam diferenças estatísticas usando uma análise Kruskal-Wallis e Dunn para razão C:M e ANOVA e Tukey para atrofia e colágeno maduro. Diferenças estatísticas C-15 e C-120: a (p=0,0069), I-15 e C-120: b (p=0,0076), I-60 e C-120: c (p= 0,0113).

Figura 2- Deposição de tecido conjuntivo no timo e demonstração da avaliação da porcentagem de área de azul (colágeno maduro) no timo corado com tricrômico de Masson. (A) Porcentagem de área marcada em azul (colágeno maduro) dos hamsters dos grupos infectados com de *L. infantum*, I-15(15 dias pós-infecção), I-60 (60 dias pós-infecção) e I-120 (120 dias pós infecção) e não infectados C-15 (Mesma idade de I-15) e C-120 (Mesma idade de I-120) expresso em média ± desvio padrão. Diferença devido ao tempo de infecção entre C-120 e C-15 (p=0,0069), I-15 (**p=0,0076), I-60 (*p=0,0113). (B) Avaliação da área marcada em azul utilizando o Software ImageJ, a área a ser mensurada é vista em vermelho (seta). (C) Colágeno maduro perivascular em azul (seta) (C2-120). Bar= 20µm.**



2.5.3 Imunomarcção de tipos celulares encontrados no timo

Para avaliar se a infecção afetou a morfologia do timo no que diz respeito a distribuição e localização de células, avaliamos a quantidade de área ou células marcadas dos principais tipos celulares encontrados no timo, tais como, células de origem mesenquimal, incluindo macrófagos, e de origem epitelial, e hematopoiéticas.

A porcentagem média de área imunomarcada de células mesenquimais positivas para vimentina (Figura 3A), e células epiteliais positivas para citoqueratina (Figura 4A) e macrófagos MAC387 não apresentaram diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 5A) (Tabela 4). A marcação com anticorpo anti-vimentina foi observada na capsula, parede de vasos sanguíneos, e em células com morfologia compatível com macrófagos e células dendríticas, em geral a marcação estava mais evidente na região medular do timo (Figura 3B).

A citoqueratina foi detectada na camada células epiteliais subcapsulares-perivasculares. No córtex tímico as células epiteliais corticais com prolongamentos interconectados foram observadas como uma malha ao redor dos tímócitos, na região medular tímica marcou células epiteliais medulares com morfologias variadas e marcou intensamente os corpúsculos de Hassal (Figura 4B-4C).

Os macrófagos foram identificados pelo anticorpo MAC387 nos septos, capsula, região cortical, medular e corticomedular do timo. Grande parte dos macrófagos estavam no tecido conjuntivo que constitui a capsula e septos que adentram o parênquima (Figura 5B).

Figura 3- Imunomarcção para vimentina. (Vimentina clone V9- DAKO+3,3'-diaminobezidina-DAKO). A- Porcentagem de área marcada nos grupos C-15, I-15, I-60, I-120 e C-120, expresso em média \pm desvio padrão. ANOVA+Tukey. ($p > 0,05$). B- Observe marcação da parede de vasos sanguíneos (seta amarela) e de células com morfologia compatível com macrófagos (seta preta) (I4-60).

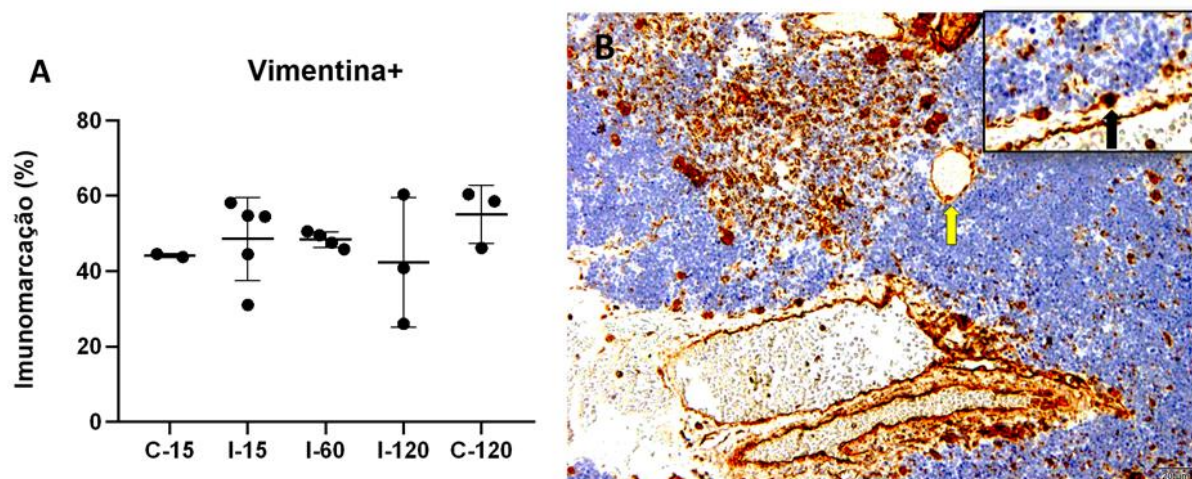


Figura 4- Imunomarcção para citoqueratina. (Citoqueratina clone AE1/AE3-DAKO+3,3'-diaminobezidine-DAKO). A- Porcentagem de área marcada nos grupos C-15, I-15, I-60, I-120 e C-120, expresso em média \pm desvio padrão. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste ANOVA+Tukey. ($p>0,05$). (B) Células epiteliais subcapsulares-perivascularares descritas (seta preta) e corpúsculo de Hassal (seta amarela). (C) Corpúsculo de Hassal (seta). Bar=20 μ m.

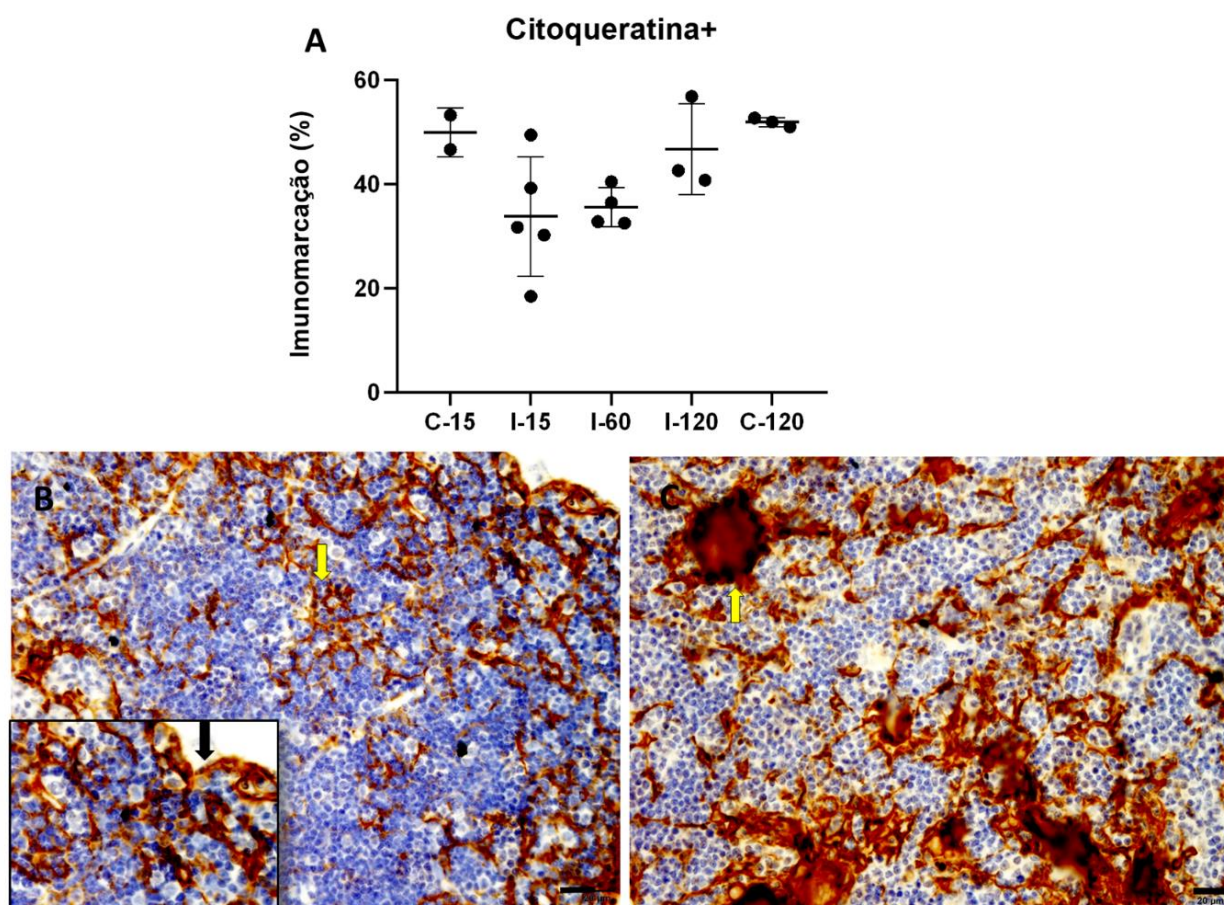
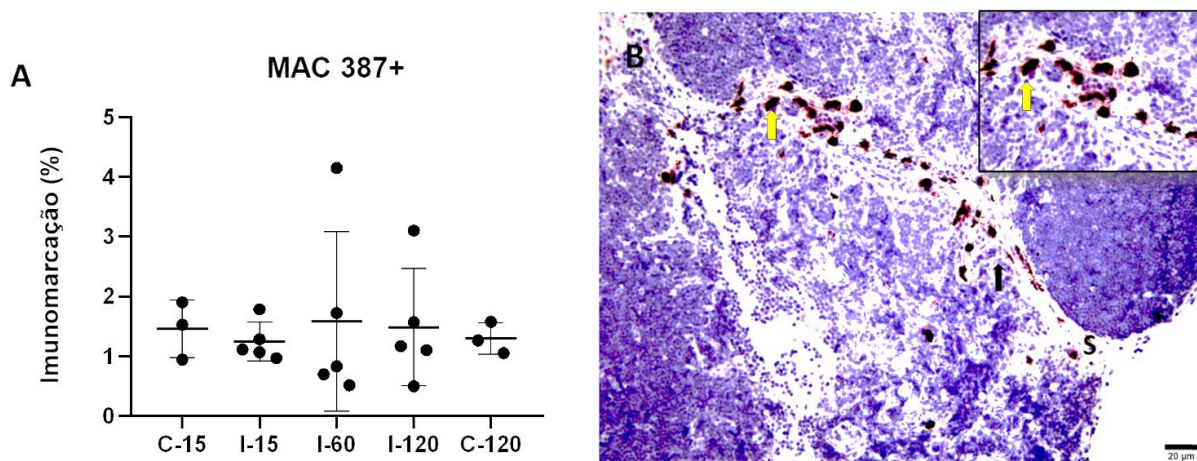
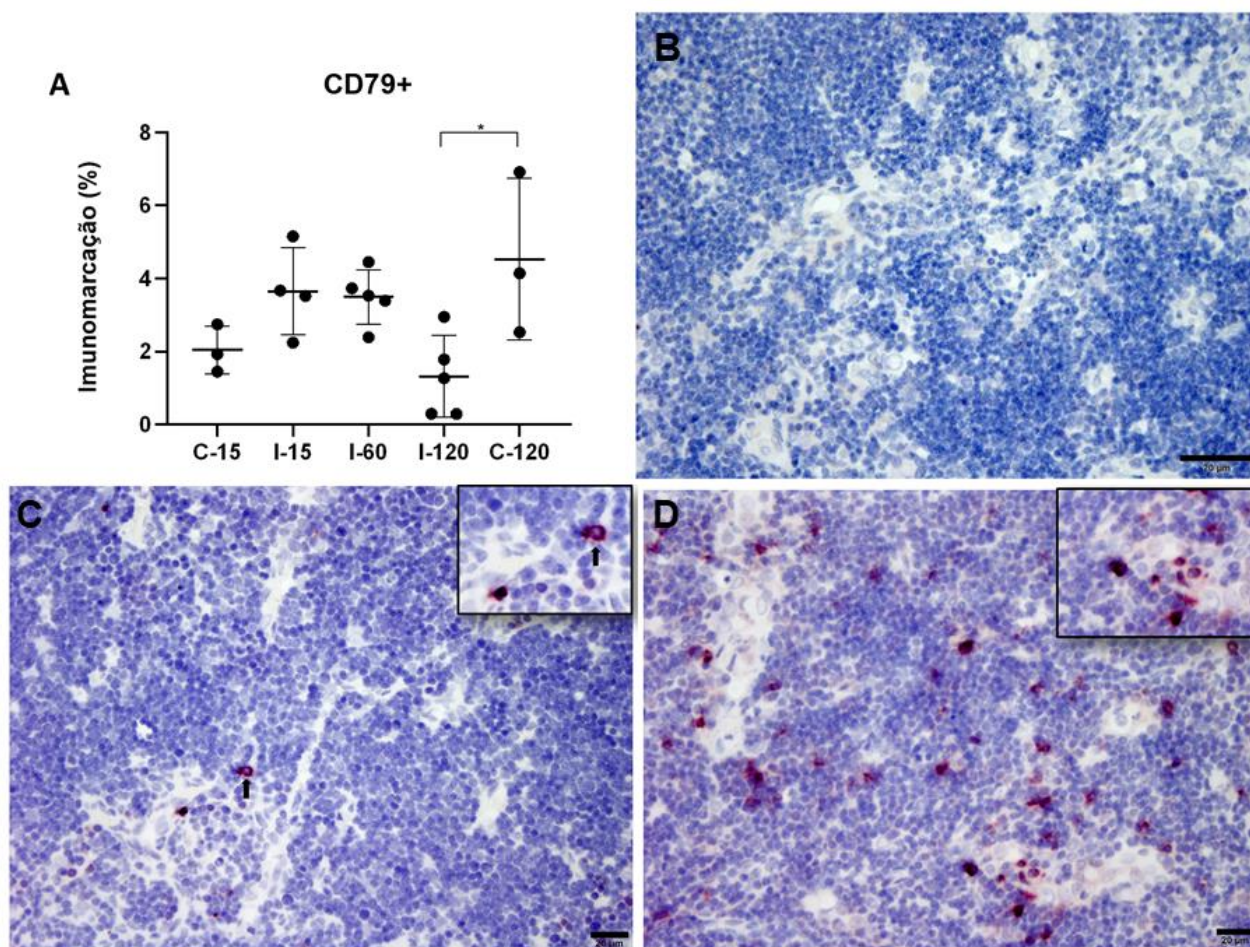


Figura 5- Imunomarcção de macrófagos. (MAC-387- Abcam® + ImmPACT™VIP-VECTOR). A- Porcentagem de área marcada nos grupos C-15, I-15, I-60, I-120 e C-120, expresso em média \pm desvio padrão. ANOVA+Tukey. ($p>0,05$). B- Observa-se a invaginação da capsula formando um septo (S), e no septo, a presença de macrófagos (seta) (I3-60). Bar=50 μ m.



A marcação para linfócitos B (CD79a+) foi observada menor porcentagem média de área marcada no grupo I-120 ($1,318 \pm 1,116$) que no grupo C-120 ($4,530 \pm 2,219$) (Tabela 4; Fig 6A), os linfócitos B estavam principalmente na região corticomedular e na medular do timo, ao redor dos corpúsculos de Hassal (Fig 6B e C).

Figura 6- Imunomarcção de linfócitos B CD79+. (Anti-CD79a Clone 11E3/Novocastra™ + ImmPACT™VIP-VECTOR). A- Porcentagem média de área marcada nos grupos C-15, I-15, I-60, I-120 e C-120, expresso em média \pm desvio padrão. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste ANOVA+Tukey. ($p=0,0182$). B- Controle negativo da reação (timo sem adição de anticorpo primário). C e D- Observa-se a presença de linfócitos B (seta) principalmente nas regiões medular e corticomedular do timo (seta). Timo do controle negativo grupo C-120 (C). Timo animal I2-120(D). Bar=20 μ m.



A marcação para as células CD3+ estava mais evidente e intensa na região medular do timo dos grupos controle e infectado. A marcação de CD3+ citoplasmática foi observada na medular tímica dos animais infectados, enquanto que nos controles a marcação CD3+ foi observada na membrana das células. A porcentagem média de imunomarcacão de linfócitos T CD3+ do I-15 ($54,66 \pm 0,512$) foi significativamente maior que do C-15 ($41,79 \pm 2,845$; $p=0,0031$), I-60 ($38,83 \pm 4,851$; $p=0,0001$) e I-120 ($42,72 \pm 4,077$; $p=0,0031$) (Tabela 4; Figura 7A- 7C).

Figura 7- Imunomarcacão de linfócitos T CD3+. (Anti-CD3 - DAKO+3,3'-diaminobezidine-DAKO). (A) Porcentagem média de área marcada nos grupos 1C-15, I-15, I-60, I-120 e C-120, expresso em média \pm desvio padrão. Grupo I-15 apresentou maior média de área marcada que I-60 ($p=0,0001$) e I-120 ($p=0,0031$) e menor que C-15 ($p=0,0031$). As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste ANOVA+Tukey. (B) Controle negativo da reação sem adição do anticorpo primário. (C) Região medular do timo de

um hamster do grupo C-15 (C2-15), onde observa-se marcação predominante na membrana da célula. (D) Região medular do timo de um hamster do grupo I-15 (I3-15) onde observa-se marcação predominante citoplasmática.

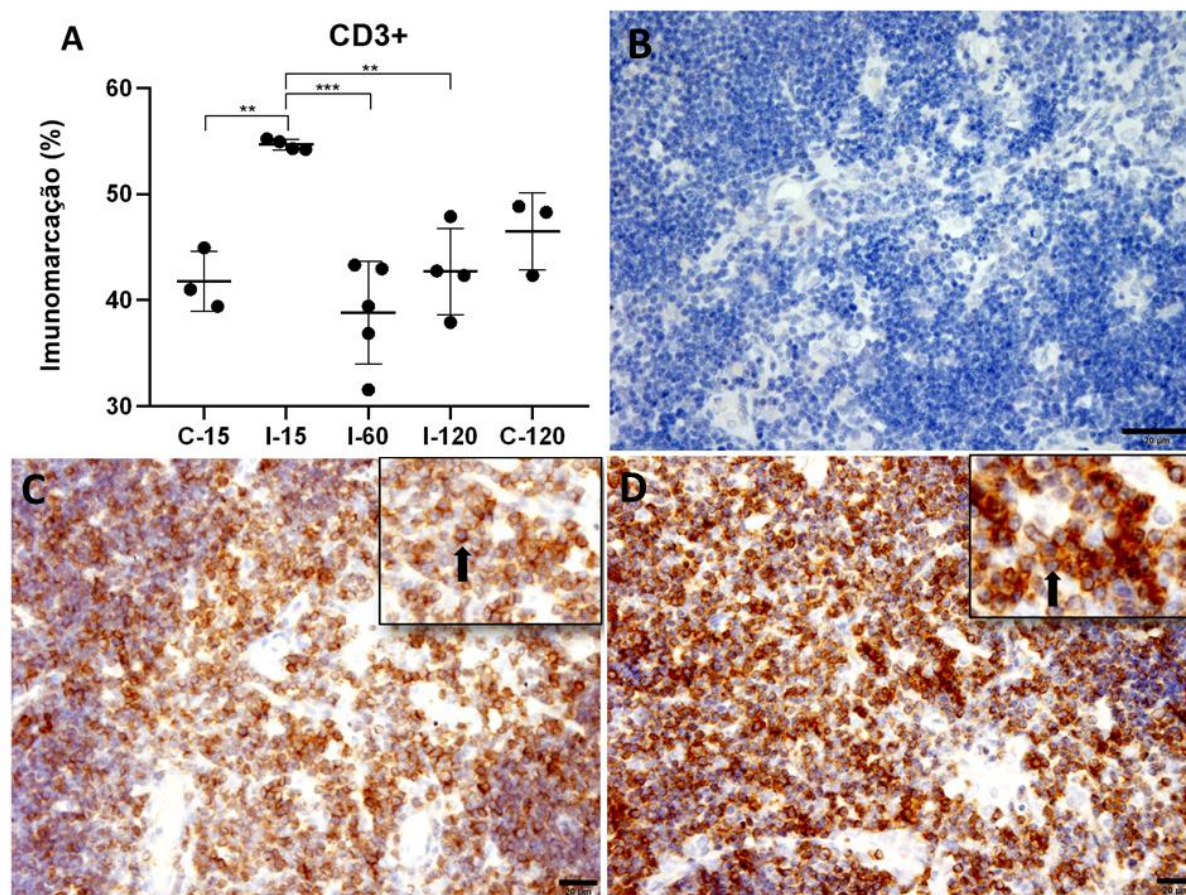


Tabela 4- Porcentagem de área marcada de células de origem mesenquimal, epitelial, macrófagos, linfócitos B e T no timo.

Marcador	Grupo				
	C-15	I-15	I-60	I-120	C-120
Vim	44,17±0,56	48,58±11,08	48,37±2,11	42,40±17,20	55,04±7,75
Cit	49,98±4,66	33,84±11,49	35,59±3,73	46,75±8,79	51,81±0,84
MAC	1,46±0,48	1,24±0,32	1,58±1,50	1,49±0,97	1,30±0,26
CD79a	2,04±0,65 ^a	3,65±1,19	3,49±0,74	1,32±1,12	4,53±2,22 ^a

CD3	41,79±2,85 ^a	54,66±0,50 ^{abc}	38,83±4,85 ^b	42,72±4,07 ^c	46,49±3,60
-----	-------------------------	---------------------------	-------------------------	-------------------------	------------

Vim- Vimentina; Cit- Citoqueratina; MAC- Macrófagos; DP- Desvio Padrão; C:M córtex:medula. As letras indicam diferenças estatísticas usando uma análise ANOVA e Tukey. Diferenças estatísticas de CD79a entre C-120 e I-120: a (p=0,0182). CD3 entre C-15 e I-15: a (p=0,0031), I-15 e I-60: b (p=0,0001), I-15 e I-120: c (p=0,0031).

2.6 Discussão

A leishmaniose visceral é uma zoonose com significativa diversidade clínica. Esta diversidade decorre do padrão de resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro e da patogenicidade da cepa [5]. O timo é um órgão linfóide importante no desenvolvimento de células T, que são responsáveis por direcionar as respostas imunes dos tipos Th1, Th2, Th17 envolvidas na resposta a LV, assim é importante a avaliação de alterações tímicas durante a doença. Neste estudo avaliamos a morfologia tímica, o padrão de distribuição de células, e a presença do parasita no timo.

Para comprovar a infecção sistêmica dos hamsters verificamos a presença de amastigotas em fígado e baço por meio de imuno-histoquímica e determinamos a densidade parasitária (amastigotas/ μm^2). A média da densidade parasitária aumentou gradativamente em baço e fígado com o tempo da infecção (Tabela 2 e Figura 1A). Como a leishmaniose é uma doença progressiva em hamsters, o aumento de amastigotas com a progressão da doença era esperado [31]. Semelhante ao baço e fígado, amastigotas do parasito também foram observadas no timo (Figura 1B-1D), comprovando a infecção deste órgão já descrita em camundongos [19], cães [20] e hamster [21]. Porém neste órgão as formas amastigotas íntegras foram pouco frequentes. O que está de acordo com estudo em camundongos onde as amastigotas intactas também foram raramente observadas [19]. Neste mesmo estudo foi descrito um aumento da expressão de IL-12a no timo [22] o que sugere ativação da resposta Th1 e explica a destruição das amastigotas. Contudo o hamster é um modelo experimental considerado susceptível a leishmaniose, enquanto que o camundongo BALB/c pode montar uma resposta efetiva contra a infecção [31]. Estudos sobre as citocinas no timo são necessários para confirmar o tipo de resposta imune deste órgão

no hamster, já que leishmania é capaz de induzir diferentes respostas imunes em cada órgão [32].

Em cães as formas amastigotas foram descritas nas regiões cortical e medular do timo [20], enquanto que em camundongos [19] e hamsters as amastigotas foram detectadas apenas na região medular e/ou corticomedular. Em condições normais a barreira sangue-timo controla a entrada no córtex de componentes presentes no sangue, e mesmo moléculas que adentram a região medular não alcançam o córtex [33]. Portanto a falha na função dessa barreira poderia explicar a entrada de amastigotas no córtex tímico em cães onde o tempo de infecção não é controlado como em modelos experimentais, e a doença pode se desenvolver com maior cronicidade e estar associada a outros fatores como co-infecção e déficit nutricional.

Aspectos da morfologia e celularidade do timo foram estudados por meio de avaliação histopatológica, morfometria e imuno-histoquímica. A razão córtex: medular média foi de aproximadamente 2:1 nos grupos C-15, I-15 e I-60 e de 1:1 nos C-120 e I-120 (Tabela 3). A medular tímica ocupa normalmente um terço do volume lobular de um roedor adulto com uma razão córtex: medula de aproximadamente 2:1 [34]. A infecção pelo parasito não afetou a razão entre os compartimentos, o que também foi observado em estudos em cães e camundongos [20,35]. Esta ausência de diferença pode ter decorrido da dificuldade de detectar alterações discretas por este método [34] e/ou devido ao número de animais utilizado no estudo.

A atrofia do timo foi avaliada nos cortes corados com HE e atribuída uma graduação de atrofia de 0 a 4, o grau de atrofia aumentou com a idade. Contudo, não foi encontrada diferença no grau de atrofia tímica entre os grupos [31] (tabela 3). Portanto a infecção parece não induzir atrofia precoce do timo. O que está de acordo com um estudo que avaliou timo de hamster experimentalmente infectado com *L. infantum* [32]. Contudo, a ausência de atrofia significativa no timo dos infectados pode ter decorrido do caráter crônico da LV, sendo o timo um órgão-alvo comum nas infecções agudas [36]. Na fase aguda da Doença de Chagas por exemplo a atrofia tímica é frequente e severa [37,38]. No entanto, em camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* também não foi observada atrofia 14 dias após infecção, exceto quando os animais foram submetidos a uma dieta pobre em proteínas [22].

Também não foi observada inflamação granulomatosa no parênquima do timo apesar destas alterações estarem descritas no timo de cães, onde ocorre timite granulomatosa ou piogranulomatosa e inflamação das trabéculas interlobulares. A ausência de inflamação pode ser explicada pelo fato dos hamsters possuírem mesmo aos 120 dias pós infecção um timo com alta celularidade linfoide T, linfócitos B e macrófagos residentes que não podem ser diferenciados de um infiltrado inflamatório na coloração de HE e ou na imuno-histoquímica com os marcadores utilizados neste estudo [20], outros métodos seriam necessários para caracterizar diferenças na subpopulação dos linfócitos. Os eosinófilos, que são células geralmente associadas com as infecções parasitárias são descritos no timo normal [18,39].

Para melhor avaliar a deposição de tecido conjuntivo e/ou aumento proporcional devido à redução de outros componentes foi utilizada a coloração de tricrômico de Masson. A quantidade de colágeno maduro variou significativamente devido ao tempo, com aumento da porcentagem de área em azul entre os grupos controles (C-15 e C-120) ($p=0,0069$), sendo que o C-120 também teve média de área corada em azul significativamente maior que os grupos infectados dos tempos 15 ($p=0,0076$) e 60 ($p=0,0113$) e não diferiu do grupo infectado com mesma idade. Isto sugere que o aumento de tecido conjuntivo maduro foi afetado pela idade e não pela infecção por *Leishmania infantum* (Figura 2A). O aumento do tecido conjuntivo capsular e septal e dos vasos sanguíneos é descrito em camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*, e possivelmente se deve a atrofia do órgão [40]. A ausência de atrofia significativa no timo dos hamsters infectados em relação ao controle pode ser confirmada pela ausência de alteração na quantidade de tecido conjuntivo.

A vimentina marca fibrócitos, lipócitos, células endoteliais vasculares e macrófagos[16,41]. Não houve diferença na área marcada por vimentina entre grupos, indicando que esta população de células de origem mesenquimal não é afetada pela infecção nos momentos estudados.

A área marcada para citoqueratina não diferiu entre os grupos. A citoqueratina AE1/AE3 marca células epiteliais tímicas, corticais e medulares [42], notamos neste estudo a marcação em uma fileira de células separando a capsula do parênquima (Figura 4B). Estas células correspondem as descritas por Milicévic et al. [43] como células epiteliais subcapsulares septais perivasculares, assim como as células tipo

“nurse” que tem um formato irregular e formam uma malha de prolongamentos na região cortical externa (Figura 4B e 4C). A presença de corpos de Hassal não císticos e não calcificados e um padrão rendado claro de células epiteliais tímicas positivas para citoqueratina estão entre os fatores considerados como evidência histológica de timopoiese (Figura 4C) [44]. As células epiteliais tímicas estão envolvidas no recrutamento das células pré-Ts da medula óssea e seu comprometimento em linfócito T, induzem a expressão do TCR e atuam na seleção positiva e negativa [45-48]. Morfologicamente não observamos indícios de que a infecção pela *L. infantum* tenha interferido com a diferenciação dos timócitos. No entanto, a presença do parasito pode interferir na dinâmica deste processo, uma vez o microambiente necessário para desenvolvimento dos linfócitos T é mantido por uma interação bidirecional [12,13] e mudanças nas populações de timócitos em diferentes estágios de maturação já foram relatados na LV [22], e na doença de Chagas [38,40].

Os macrófagos identificados com o anticorpo MAC387 foram observados na capsula, septos, córtex, medular e na região corticomedular do timo. A quantidade de área marcada para macrófagos não diferiu entre os grupos (Fig 5A). Na infecção por *Trypanosoma cruzi* os macrófagos atuam como reservatório para o parasita no timo [54]. Não observamos formas amastigotas no citoplasma de macrófagos no timo. Em seres humanos naturalmente infectados com *Trypanosoma cruzi* ocorre uma migração de macrófagos corticomedulares para região cortical do timo [40], estes macrófagos tem um papel importante no processo de maturação dos timócitos e tem a capacidade de apresentar antígenos por moléculas de MHC classe I e II, atuando no processo de seleção negativa dos timócitos [43] (Tabela 4).

Os linfócitos B CD79a+ foram observados em maior quantidade no grupo C-120 ($4,530 \pm 2,219$) que no grupo I-120 ($1,318 \pm 1,116$) (Tabela 4 e Fig 6A). Os linfócitos B e plasmócitos são descritas na medular tímica, em geral ao redor dos corpúsculos de Hassal. Seu número aumenta com idade [17,55] devido a um acúmulo de linfócitos B maduros. No entanto, há uma redução de formas imaturas que tem o maior potencial de apresentação de antígenos que permitem a seleção negativa [56]. Sugerindo que a LV pode estar alterando a seleção negativa de linfócitos. Além disso, o recrutamento de linfócitos B devido a resposta Th2 estimulada pela LV crônica pode estar relacionada a sua redução no timo dos hamsters.

Em relação à população das células CD3 positivas, o aumento da porcentagem de área marcada indica aumento da celularidade. Assim, animais do grupo I-15 apresentaram maior número de linfócitos TCD3 do que C-15, I-60 e I-120 (Fig. 7A). O CD3 é um co-receptor associado ao TCR e tem a função de reconhecimento e sinalização, a sua expressão representa o comprometimento com a linhagem T [49,50]. Nossos resultados estão de acordo com a literatura onde as infecções agudas por *L. infantum* causam um aumento no número total de células no timo após 14 dias de infecção em camundongos[22]. Este fato também é descrito nas infecções agudas por *Trypanosoma cruzi*, devido ao aumento de CD4+ ou CD8+ TCRCD3^{high}. Contudo, com a cronificação da doença ocorre a normalização do número de células linfoides tímicas [51] o que explica a redução da área marcada para linfócitos TCD3+ observada nos grupos I-60 e I-120. Além disso, observamos a marcação citoplasmática para o receptor CD3 de forma predominante na região medular do timo nos hamsters infectados (Figura 7D).

Os timócitos imaturos expressam marcação para o receptor CD3 no citoplasma, e quando maduros e localizados na região medular, o CD3 é expresso na membrana destas células [52,53]. Desta forma, ficou caracterizada a presença de linfócitos imaturos na região medular, o que possivelmente interfere com na resposta imune dos animais. Em estudos em camundongos foi descrita taxa de maturação acelerada de células duplamente positivas (CD4+/CD8+) [22] e aumento de quimiocinas como CXCL12 e CXCR4 que controla o fluxo de timócitos imaturos da região subcapsular para a medular do timo [19]. As alterações observadas no timo de hamster podem estar relacionadas com a chegada de timócitos imaturos na região medular, e estes linfócitos imaturos na medular tímica podem estar relacionados a uma liberação de linfócitos imaturos pelo timo.

A possível liberação de linfócitos imaturos parece ser um mecanismo de defesa importante desencadeado no início da infecção. Entretanto mais estudos precisam ser concluídos para confirmar alterações fenotípicas no sangue periférico e linfonodos de hamsters infectados.

2.7 Conclusão

Neste trabalho confirmamos que a *L. infantum* pode infectar o timo de hamsters e levar a alterações na população de linfócitos T e B, com aumento de linfócitos TCD3+ e presença de linfócitos T imaturos na região medular do timo após 15 dias de infecção e redução de linfócitos B após 120 dias de infecção. Não foi observada atrofia tímica até 120 dias pós infecção. O reflexo das alterações na população e maturação das células linfoides do timo na resposta imune sistêmica dos animais infectados necessita ser melhor avaliado.

2.8 Referências

1. Moreno, J., Alvar, J. Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* 2002;18: 399–405. doi:10.1016/S1471-4922(02)02347-4
2. Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* 2008;24: 324–330. doi:10.1016/j.pt.2008.04.001
3. WHO | Epidemiological situation. WHO. 2020 [cited 22 Sep 2020]. Available: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>
4. Plan de Acción para fortalecer la vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas 2017-2022 - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud. [cited 19 Sep 2020]. Available: <https://www.paho.org/es/documentos/plan-accion-para-fortalecer-vigilancia-control-leishmaniasis-americas-2017-2022>
5. Nylén S, Gautam S. Immunological perspectives of leishmaniasis. *J Glob Infect Dis.* 2010;2: 135. doi:10.4103/0974-777x.62876
6. Anderson CF, Mendez S, Sacks DL. Nonhealing Infection despite Th1 Polarization Produced by a Strain of *Leishmania major* in C57BL/6 Mice . *J Immunol.* 2005;174: 2934–2941. doi:10.4049/jimmunol.174.5.2934

7. Gonçalves-de-Albuquerque S da C, Pessoa-e-Silva R, Trajano-Silva LAM, de Goes TC, de Moraes RCS, Oliveira CN d. C, et al. The equivocal role of Th17 cells and neutrophils on immunopathogenesis of leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2017. p. 1437. doi:10.3389/fimmu.2017.01437
8. Anderson CF, Stumhofer JS, Hunter CA, Sacks D. IL-27 Regulates IL-10 and IL-17 from CD4 + Cells in Nonhealing *Leishmania major* Infection . *J Immunol*. 2009;183: 4619–4627. doi:10.4049/jimmunol.0804024
9. Quirino GFS, Nascimento MSL, Davoli-Ferreira M, Sacramento LA, Lima MHF, Almeida RP, et al. Interleukin-27 (IL-27) mediates susceptibility to visceral leishmaniasis by suppressing the IL-17-neutrophil response. *Infect Immun*. 2016;84: 2289–2298. doi:10.1128/IAI.00283-16
10. Anderson G, Jenkinson EJ. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat Rev Immunol*. 2001;1: 31–40. doi:10.1038/35095500
11. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2003. pp. 253–257. doi:10.1038/nri1032
12. Ritter MA, Boyd RL. Development in the thymus: it takes two to tango. *Immunol Today*. 1993;14: 462–469. doi:10.1016/0167-5699(93)90250-O
13. Zhang L, Sun L, Zhao Y. Thymic epithelial progenitor cells and thymus regeneration: An update. *Cell Research*. Nature Publishing Group; 2007. pp. 50–55. doi:10.1038/sj.cr.7310114
14. Rodewald H-R. Thymus Organogenesis. *Annu Rev Immunol*. 2008;26: 355–388. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090408
15. Azumi N, Battifora H. The distribution of vimentin and keratin in epithelial and nonepithelial neoplasms. A comprehensive immunohistochemical study on formalin- and alcohol-fixed tumors. *Am J Clin Pathol*. 1987;88: 286–296. doi:10.1093/ajcp/88.3.286

16. Pearse G. Normal Structure, Function and Histology of the Thymus. *Toxicol Pathol.* 2006;34: 504–514. doi:10.1080/01926230600865549
17. Duijvestijn AM, Hoefsmit ECM. Ultrastructure of the rat thymus: The micro-environment of T-lymphocyte maturation. *Cell Tissue Res.* 1981;218: 279–292. doi:10.1007/BF00210344
18. Throsby, M, Herbelin, A, Pléau, JM, Dardenne, M. CD11c+ eosinophils in the murine thymus: developmental regulation and recruitment upon MHC class I-restricted thymocyte deletion. *The Journal of Immunology.*2000; 165(4): 1965-1975. doi: 10.4049/jimmunol.165.4.1965
19. Losada-Barragán M, Umanã-Pérez A, Cuervo-Escobar S, Berbert LR, Porrozzi R, Morgado FN, et al. Protein malnutrition promotes dysregulation of molecules involved in T cell migration in the thymus of mice infected with *Leishmania infantum*. *Sci Rep.* 2017;7: 45991. doi:10.1038/srep45991
20. Silva AVA, Souza TL, Figueiredo FB, Mendes AA V., Ferreira LC, Figueira CPB, et al. Detection of amastigotes and histopathological alterations in the thymus of *Leishmania infantum* -infected dogs. *Immunity, Inflamm Dis.* 2020;8: 127–139. doi:10.1002/iid3.285
21. Schnur L, Zuckerman A, Montilio B. Dissemination of leishmanias to the organs of Syrian hamsters following intrasplenic inoculation of promastigotes. *Exp Parasitol.* 1973;34: 432–447. doi:10.1016/0014-4894(73)90103-3
22. Cuervo-Escobar S, Losada-Barragán M, Umaña-Pérez A, Porrozzi R, Saboia-Vahia L, Miranda LHM, 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.* 2014;9: 1–22. doi:10.1371/journal.pone.0114584
23. Tafuri WL, Santos RDL, Arantes RME, Gonçalves R, De Melo MN, Michalick MSM, et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods.* 2004;292: 17–23. doi:10.1016/j.jim.2004.05.009

24. van Baarlen J, Schuurman HJ, Huber J. Acute thymus involution in infancy and childhood: A reliable marker for duration of acute illness. *Hum Pathol.* 1988;19: 1155–1160. doi:10.1016/S0046-8177(88)80146-1
25. Bozzetta E, Pezzolato M, Maurella C, Varello K, Richelmi GB, Draisci R, et al. Development of an enhanced histopathological approach to detect low-dose dexamethasone illicit treatment in veal calves. *Food Addit Contam - Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2011;28: 1187–1192. doi:10.1080/19440049.2011.584909
26. Sia SF, Yan LM, Chin AWH, Fung K, Choy KT, Wong AYL, et al. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature.* 2020;583: 834–838. doi:10.1038/s41586-020-2342-5
27. Parviainen S, Ahonen M, Diaconu I, Kipar A, Siurala M, Vähä-Koskela M, et al. GMCSF-armed vaccinia virus induces an antitumor immune response. *Int J Cancer.* 2015;136: 1065–1072. doi:10.1002/ijc.29068
28. Subimerb C, Pinlaor S, Lulitanond V, Khuntikeo N, Okada S, McGrath MS, et al. Circulating CD14+CD16+ monocyte levels predict tissue invasive character of cholangiocarcinoma. *Clin Exp Immunol.* 2010;161: 471–479. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04200.x
29. Zotto H Del, Massa L, Rafaeloff R, Pittenger GL, Vinik A, Gold G, et al. Possible relationship between changes in islet neogenesis and islet neogenesis-associated protein-positive cell mass induced by sucrose administration to normal hamsters. *J Endocrinol.* 2000;165: 725–733. doi:10.1677/joe.0.1650725
30. Seco-Rovira V, Beltrán-Frutos E, Ferrer C, Sáez FJ, Madrid JF, Pastor LM. The death of sertoli cells and the capacity to phagocytize elongated spermatids during testicular regression due to short photoperiod in Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). *Biol Reprod.* 2014;90: 1–10. doi:10.1095/biolreprod.113.112649
31. Nieto A, Domínguez-Bernal G, Orden JA, De La Fuente R, Madrid-Elena N, Carrión J. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. *Veterinary Research. BioMed Central;* 2011. pp. 1–13. doi:10.1186/1297-9716-42-39

32. Corbett CE, Paes RA, Laurenti MD, Andrade Júnior HF, Duarte MI. Histopathology of lymphoid organs in experimental leishmaniasis. *Int J Exp Pathol.* 1992;73: 417–33. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1390190><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2002360>
33. Raviola E, Karnovsky MJ. Evidence for a blood-thymus barrier using electron-opaque tracers. *J Exp Med.* 1972;136: 466–498. doi:10.1084/jem.136.3.466
34. Elmore SA. Enhanced Histopathology of the Thymus. *Toxicol Pathol.* 2006;34: 656–665. doi:10.1080/01926230600865556
35. Losada-Barragán M, Umaña-Pérez A, Durães J, Cuervo-Escobar S, Rodríguez-Vega A, Ribeiro-Gomes FL, et al. Thymic microenvironment is modified by malnutrition and *Leishmania infantum* infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9: 1–19. doi:10.3389/fcimb.2019.00252
36. Savino W, Dardenne M, Velloso LA, Silva-barbosa SD. The thymus is a common target in malnutrition and infection. *British Journal of Nutrition.* Cambridge University Press; 2007. pp. S11–S16. doi:10.1017/S0007114507832880
37. González FB, Calmon-Hamaty F, Nô Seara Cordeiro S, Fernández Bussy R, Spinelli SV, D’Attilio L, et al. *Trypanosoma cruzi* Experimental Infection Impacts on the Thymic Regulatory T Cell Compartment. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10. doi:10.1371/journal.pntd.0004285
38. González FB, Villar SR, Fernández Bussy R, Martin GH, Pérol L, Manarin R, et al. Immunoendocrine dysbalance during uncontrolled *T. cruzi* infection is associated with the acquisition of a Th-1-like phenotype by Foxp3+ T cells. *Brain Behav Immun.* 2015;45: 219–232. doi:10.1016/j.bbi.2014.11.016
39. Shamri R, Xenakis JJ, Spencer LA. Eosinophils in innate immunity: An evolving story. *Cell and Tissue Research.* Springer; 2011. pp. 57–83. doi:10.1007/s00441-010-1049-6
40. Morrot A, Terra-Granado E, Pérez AR, Silva-Barbosa SD, Milićević NM, Farias-de-Oliveira DA, 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 Negl Trop Dis*. 2011;5. doi:10.1371/journal.pntd.0001268

41. Osborn M, Debus E, Weber K. Monoclonal antibodies specific for vimentin. *Eur J Cell Biol*. 1984;34: 137–143. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6428888/>

42. Jablonska-Mestanova V, Sisovsky V, Danisovic L, Polak S, Varga I. The normal human newborns thymus. *Bratislava Med J*. 2013;114: 402–408. doi:10.4149/BLL_2013_086

43. Milicevic NM, Milicevic Z, Colic M, Mujovic S. Ulstructural study of macrophages in the rat thymus, with special reference to the cortico-medullary zone. *J Anat*. 1987;Vol. 150: 89–98. Available: </pmc/articles/PMC1261667/?report=abstract>

44. Hale LP. Histologic and Molecular Assessment of Human Thymus. *Ann Diagn Pathol*. 2004;8: 50–60. doi:10.1016/j.anndiagpath.2003.11.006

45. Miličević Ž, Živanović V, Todorović J, Čolić M, Kamperdijk EWA, Heefsmit ECM, et al. Differential effect of cyclosporin application on epithelial cells of the rat thymus. Immunohistochemical study. *J Comp Pathol*. 1992;106: 25–35. doi:10.1016/0021-9975(92)90065-3

46. Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, Klein L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *J Immunol*. 2016;196: 2915–2922. doi:10.1038/ni723

47. Nitta T, Murata S, Ueno T, Tanaka K, Takahama Y. Chapter 3 Thymic Microenvironments for T-Cell Repertoire Formation. *Advances in Immunology*. Academic Press; 2008. pp. 59–94. doi:10.1016/S0065-2776(08)00603-2

48. Boehm T, Scheu S, Pfeffer K, Bleul CC. Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LT β R. *J Exp Med*. 2003;198: 757–769. doi:10.1084/jem.20030794

49. Wu L, Li CL, Shortman K. Thymic dendritic cell precursors: Relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J Exp Med*. 1996;184: 903–911. doi:10.1084/jem.184.3.903
50. Weiss A, Imboden J, Hardy K, Manger B, Terhorst C, Stobo J. The role of the T3/antigen receptor complex in T-cell activation. *Annual review of immunology*. *Annu Rev Immunol*; 1986. pp. 593–619. doi:10.1146/annurev.iy.04.040186.003113
51. Leite-de-Moraes MC, Hontebeyrie-Joskowicz M, Dardenne M, Savino W. Modulation of thymocyte subsets during acute and chronic phases of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology*. 1992;77: 95–8. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1398769>
52. Crompton T, Mooreu M, MacDonald HR, Malissen B. Double-negative thymocyte subsets in CD3 γ chain-deficient mice: Absence of HSA+CD44–CD25– cells. *Eur J Immunol*. 1994;24: 1903–1907. doi:10.1002/eji.1830240828
53. Tourigny MR, Mazel S, Burtrum DB, Petrie HT. T cell receptor (TCR)- β gene recombination: Dissociation from cell cycle regulation and developmental progression during T cell ontogeny. *J Exp Med*. 1997;185: 1549–1556. doi:10.1084/jem.185.9.1549
54. Goncalves da Costa SG, Calabrese KS, Bauer PG, Savino W, Lagrange PH. Studies of the thymus in Chagas' disease: III. Colonization of the thymus and other lymphoid organs of adult and newborn mice by *Trypanosoma cruzi*. *Pathol Biol*. 1991;39: 91–97. Available: <https://europepmc.org/article/med/1901987>
55. Yamano T, Nedjic J, Hinterberger M, Steinert M, Koser S, Pinto S, et al. Thymic B Cells Are Licensed to Present Self Antigens for Central T Cell Tolerance Induction. *Immunity*. 2015;42: 1048–1061. doi:10.1016/j.immuni.2015.05.013
56. Cepeda S, Cantu C, Orozco S, Xiao Y, Brown Z, Semwal MK, et al. Age-Associated Decline in Thymic B Cell Expression of Aire and Aire-Dependent Self-Antigens. *Cell Rep*. 2018;22: 1276–1287. doi:10.1016/j.celrep.2018.01.015

APÊNDICE A- REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ACKERMAN, G. A.; KNOUFF, R. A. The epithelial origin of the lymphocytes in the thymus of the embryonic hamster. **The Anatomical Record**, [s. l.], v. 152, n. 1, p. 35–53, 1965. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ar.1091520106>>. Acesso em: 2 nov. 2020.

ANDERSON, C. F.; MENDEZ, S.; SACKS, D. L. Nonhealing Infection despite Th1 Polarization Produced by a Strain of *Leishmania major* in C57BL/6 Mice . **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 174, n. 5, p. 2934–2941, 2005. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/174/5/2934>>. Acesso em: 3 out. 2020.

ANDERSON, C. F.; STUMHOFER, J. S.; HUNTER, C. A.; SACKS, D. IL-27 Regulates IL-10 and IL-17 from CD4 + Cells in Nonhealing *Leishmania major* Infection . **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 183, n. 7, p. 4619–4627, 2009. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/183/7/4619>>. Acesso em: 3 out. 2020.

ANDERSON, G.; JENKINSON, E. J. Lymphostromal interactions in thymic development and function. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 31–40, 2001.

BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGU, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniasis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 24, n. 7, p. 324–330, 2008.

BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, [s. l.], v. 28, n. 7, p. 329–337, 2006.

BLACKBURN, C. C.; MANLEY, N. R.; PALMER, D. B.; BOYD, R. L.; ANDERSON, G.; RITTER, M. A. **One for all and all for one: Thymic epithelial stem cells and regeneration**, Elsevier Current Trends, 2002.

BOEHM, T.; SCHEU, S.; PFEFFER, K.; BLEUL, C. C. Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LT β R. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 198, n. 5, p. 757–769, 2003. Disponível em: <<http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20030794>>. Acesso em: 5 out. 2020.

CAMPBELL, J. J.; HASHIMOTO, Y. Recombinase activating gene expression in thymic subpopulations. A transitional cell type has lost RAG-2 but not RAG-1. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 150, n. 4, 1993.

COLIC, M.; JOVANOVIĆ, S.; MITROVIĆ, S.; DUJIC, A. Immunohistochemical identification of six cytokeratin-defined subsets of the rat thymic epithelial cells. In: THYMUS 1989, **Anais...** [s.l.: s.n.] Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/2482555>>. Acesso em: 9 nov. 2020.

CORBETT, C. E.; PAES, R. A.; LAURENTI, M. D.; ANDRADE JÚNIOR, H. F.; DUARTE, M. I. Histopathology of lymphoid organs in experimental leishmaniasis. **International journal of experimental pathology**, [s. l.], v. 73, n. 4, p. 417–33, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1390190><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2002360>>

COSTA, F. A. L.; GOTO, H.; SALDANHA, L. C. B.; SILVA, S. M. M. S.; SINHORINI, I. L.; SILVA, T. C.; GUERRA, J. L. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 677–684, 2003.

CROMPTON, T.; MOOREU, M.; MACDONALD, H. R.; MALISSEN, B. Double-negative thymocyte subsets in CD3⁺ chain-deficient mice: Absence of HSA⁺CD44⁺CD25⁻ cells. **European Journal of Immunology**, [s. l.], v. 24, n. 8, p. 1903–1907, 1994. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/eji.1830240828>>. Acesso em: 7 out. 2020.

CUERVO-ESCOBAR, S.; LOSADA-BARRAGÁN, M.; UMAÑA-PÉREZ, A.; PORROZZI, R.; SABOIA-VAHIA, L.; MIRANDA, L. H. M.; MORGADO, F. N.; MENEZES, R. C.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, M.; CUERVO, P.; STAGER, S. 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, p. 1–22, 2014.

DE WAAL, E. J.; SCHUURMAN, H. J.; VAN LOVEREN, H.; VOS, J. G. Differential effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, bis(tri-n-butyltin)oxide and cyclosporine on thymus histophysiology, Informa Healthcare, 1997. Disponível em:

<<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10408449709089900>>. Acesso em: 23 set. 2020.

DERBINSKI, J.; SCHULTE, A.; KYEWSKI, B.; KLEIN, L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. **Journal of Immunology**, [s. l.], v. 196, n. 7, p. 2915–2922, 2016. Disponível em: <<http://immunol.nature.com>>. Acesso em: 5 out. 2020.

DONSKOY, E.; GOLDSCHNEIDER, I. Two Developmentally Distinct Populations of Dendritic Cells Inhabit the Adult Mouse Thymus: Demonstration by Differential Importation of Hematogenous Precursors Under Steady State Conditions. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 170, n. 7, p. 3514–3521, 2003. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/170/7/3514><http://www.jimmunol.org/content/170/7/3514.full#ref-list-1>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

DUIJVESTIJN, A. M.; HOEFSMIT, E. C. M. Ultrastructure of the rat thymus: The micro-environment of T-lymphocyte maturation. **Cell and Tissue Research**, [s. l.], v. 218, n. 2, p. 279–292, 1981. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF00210344>>. Acesso em: 31 ago. 2020.

GONZÁLEZ, F. B.; CALMON-HAMATY, F.; NÔ SEARA CORDEIRO, S.; FERNÁNDEZ BUSSY, R.; SPINELLI, S. V.; D'ATTILIO, L.; BOTTASSO, O.; SAVINO, W.; COTTA-DE-ALMEIDA, V.; VILLAR, S. R.; PÉREZ, A. R. Trypanosoma cruzi Experimental Infection Impacts on the Thymic Regulatory T Cell Compartment. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004706>>. Acesso em: 23 set. 2020.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. **Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis**, Associação Brasileira de Divulgação Científica, 2004.

GUYDEN, J. C.; PEZZANO, M. Thymic nurse cells: A microenvironment for thymocyte development and selection, Academic Press Inc., 2002.

ISAACSON, P. G.; NORTON, A. J.; ADDIS, B. J. THE HUMAN THYMUS CONTAINS A NOVEL POPULATION OF B LYMPHOCYTES. **The Lancet**, [s. l.], v. 330, n. 8574, p. 1488–1491, 1987.

JENKINSON, W. E.; JENKINSON, E. J.; ANDERSON, G. Differential requirement for mesenchyme in the proliferation and maturation of thymic epithelial progenitors. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 198, n. 2, p. 325–332, 2003. Disponível em: <<http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20022135>>. Acesso em: 5 nov. 2020.

KAPPLER, J. W.; ROEHM, N.; MARRACK, P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. **Cell**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 273–280, 1987. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/009286748790568X/fulltext>>. Acesso em: 29 out. 2020.

KAYE, P. M.; SVENSSON, M.; ATO, M.; MAROOF, A.; POLLEY, R.; STAGER, S.; ZUBAIRI, S.; ENGWERDA, C. R. **The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis**, 2004.

KIMA, P. E. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 37, n. 10, p. 1087–1096, 2007.

KISIELOW, P.; TEH, H. S.; BLÜTHMANN, H.; VON BOEHMER, H. Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. **Nature**, [s. l.], v. 335, n. 6192, p. 730–733, 1988. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3262831/>>. Acesso em: 29 out. 2020.

KOHNEN, P.; WEISS, L. An electron microscopic study of thymic corpuscles in the guinea pig and the mouse. **The Anatomical Record**, [s. l.], v. 148, n. 1, p. 29–57, 1964. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ar.1091480104>>. Acesso em: 17 set. 2020.

LEITE-DE-MORAES, M. C.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; DARDENNE, M.; SAVINO, W. Modulation of thymocyte subsets during acute and chronic phases of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, [s. l.], v. 77, n. 1, p. 95–8, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1398769>>. Acesso em: 27 set. 2020.

LEÓN, B.; LÓPEZ-BRAVO, M.; ARDAVÍN, C. Monocyte-Derived Dendritic Cells Formed at the Infection Site Control the Induction of Protective T Helper 1 Responses against *Leishmania*. **Immunity**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 519–531, 2007.

LIND, E. F.; PROCKOP, S. E.; PORRITT, H. E.; PETRIE, H. T. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 194, n. 2, p. 127–134, 2001.

LOSADA-BARRAGÁN, M.; UMANÑA-PÉREZ, A.; CUERVO-ESCOBAR, S.; BERBERT, L. R.; PORROZZI, R.; MORGADO, F. N.; MENDES-DA-CRUZ, D. A.; SAVINO, W.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, M.; CUERVO, P. 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, n. 1, p. 45991, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep45991>>. Acesso em: 18 mar. 2019.

LOSADA-BARRAGÁN, M.; UMAÑA-PÉREZ, A.; DURÃES, J.; CUERVO-ESCOBAR, S.; RODRÍGUEZ-VEGA, A.; RIBEIRO-GOMES, F. L.; BERBERT, L. R.; MORGADO, F.; PORROZZI, R.; MENDES-DA-CRUZ, D. A.; AQUINO, P.; CARVALHO, P. C.; SAVINO, W.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, M.; PADRÓN, G.; CUERVO, P. Thymic microenvironment is modified by malnutrition and *Leishmania infantum* infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. JUL, p. 1–19, 2019.

MELBY, P. C.; CHANDRASEKAR, B.; ZHAO, W.; COE, J. E. The Hamster as a Model of Human Visceral Leishmaniasis: Progressive Disease and Impaired Generation of Nitric Oxide in the Face of a Prominent Th1-Like Cytokine Response. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 166, n. 3, p. 1912–1920, 2001.

MICHEL, G. Beitrag zur Anatomie des Thymus des Syr. Goldhamsters (*Mesocricetus auratus* W.). **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, [s. l.], v. 5, n. 7, p. 675–691, 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0442.1958.tb00206.x>>. Acesso em: 5 nov. 2020.

MILIĆEVIĆ, N. M.; MILIĆEVIĆ, Ž. Thymus cell-cell interactions. **International Review of Cytology**, [s. l.], v. 235, p. 1–52, 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15219780/>>. Acesso em: 11 nov. 2020.

MILICEVIC, N. M.; MILICEVIC, Z.; COLIC, M.; MUJOVIC, S. Ulstructural study of macrophages in the rat thymus, with special reference to the cortico-medullary zone. **Journal of Anatomy**, [s. l.], v. Vol. 150, p. 89–98, 1987. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC1261667/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15219780/)>. Acesso em: 27 set. 2020.

MILIĆEVIĆ, Ž.; MILIĆEVIĆ, N. M. Ultrastructure of different types of thymic epithelial cells in normal and cyclosporin-A-treated rats. **Anatomy and Embryology**, [s. l.], v. 196, n. 2, p. 171–183, 1997. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9278161/>>. Acesso em: 27 set. 2020.

MILIĆEVIĆ, Ž.; ŽIVANOVIĆ, V.; TODOROVIĆ, J.; ČOLIĆ, M.; KAMPERDIJK, E. W. A.; HEOFSMIT, E. C. M.; MILIĆEVIĆ, N. M. Differential effect of cyclosporin application on epithelial cells of the rat thymus. Immunohistochemical study. **Journal of Comparative Pathology**, [s. l.], v. 106, n. 1, p. 25–35, 1992.

MOHR, U.; DUNGWOTTH, D. L. Blood and lymphoid, respiratory, urinary, cardiovascular, and reproductive systems WashingtonCC. Capen (IEUs). Pathobiology of the aging rat. [s.l.] : ILSI Press, 1992.

MOREIRA, N. das D.; VITORIANO-SOUZA, J.; ROATT, B. M.; VIEIRA, P. M. de A.; KER, H. G.; DE OLIVEIRA CARDOSO, J. M.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; DE LANA, M.; REIS, A. B. Parasite Burden in Hamsters Infected with Two Different Strains of *Leishmania (Leishmania) infantum*: “Leishman Donovan Units” versus Real-Time PCR. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 10, p. e47907, 2012. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0047907>>. Acesso em: 9 nov. 2020.

MULLA, S. A.; OSMAN HUSSIEN, M.; MOHAMED ELHUSSEIN, A. *Leishmania donovani* infection in the domestic dog (*Canis familiaris*) in easternArticle in International Journal of Biological & Pharmaceutical Research. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.ijbpr.com>. Acesso em: 7 nov. 2020.

MÜLLER, S. M.; TERSZOWSKI, G.; BLUM, C.; HALLER, C.; ANQUEZ, V.; KUSCHERT, S.; CARMELIET, P.; AUGUSTIN, H. G.; RODEWALD, H. R. Gene targeting of VEGF-A in thymus epithelium disrupts thymus blood vessel architecture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 102, n. 30, p. 10587–10592, 2005. Disponível em: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0502752102>. Acesso em: 31 out. 2020.

NICOLAS, J. F.; REANO, A.; KAISERLIAN, D.; THIVOLET, J. Epithelial cell heterogeneity in the guinea pig thymus: Immunohistochemical characterization of four thymic epithelial subsets defined by monoclonal anti-keratin antibodies. **European Journal of Immunology**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 457–464, 1986.

NIETO, A.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; ORDEN, J. A.; DE LA FUENTE, R.; MADRID-ELENA, N.; CARRIÓN, J. **Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model**, BioMed Central, 2011. Disponível em: <<https://link.springer.com/articles/10.1186/1297-9716-42-39>>. Acesso em: 23 set. 2020.

NITTA, T.; MURATA, S.; UENO, T.; TANAKA, K.; TAKAHAMA, Y. **Chapter 3 Thymic Microenvironments for T-Cell Repertoire Formation**, Academic Press, 2008.

NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological perspectives of leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 135, 2010.

OWEN, J. J. T.; JENKINSON, E. J. Early events in T lymphocyte genesis in the fetal thymus. **American Journal of Anatomy**, [s. l.], v. 170, n. 3, p. 301–310, 1984. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/aja.1001700306>>. Acesso em: 31 ago. 2020.

PACIELLO, O.; WOJCIK, S.; GRADONI, L.; OLIVA, G.; TRAPANI, F.; IOVANE, V.; POLITANO, L.; PAPPARELLA, S. Syrian hamster infected with *Leishmania infantum*: A new experimental model for inflammatory myopathies. **Muscle and Nerve**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 355–361, 2010.

PEARSE, G. Normal Structure, Function and Histology of the Thymus. **Toxicologic Pathology**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 504–514, 2006. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1080/01926230600865549>>. Acesso em: 5 set. 2020.

PERUHYPE-MAGALHAES, V.; MARTINS-FILHO, O. A.; PRATA, A.; DE A. SILVA, L.; RABELLO, A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; FIGUEIREDO, R. M.; GUIMARAES-CARVALHO, S. F.; FERRARI, T. C. A.; CORREA-OLIVEIRA, R. 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. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3083.2005.01686.x>>. Acesso em: 7 nov. 2020.

PETRI, H. T.; SCOLLAY, R.; SHORTMAN, K. Commitment to the T cell receptor- $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ lineages can occur just prior to the onset of CD4 and CD8 expression among immature thymocytes. **European Journal of Immunology**, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 2185–2188, 1992. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/eji.1830220836>>. Acesso em: 23 set. 2020.

Plan de Acción para fortalecer la vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas 2017-2022 - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud. [s.d.]. Disponível em: <<https://www.paho.org/es/documentos/plan-accion-para-fortalecer-vigilancia-control-leishmaniasis-americas-2017-2022>>. Acesso em: 19 set. 2020.

QUIRINO, G. F. S.; NASCIMENTO, M. S. L.; DAVOLI-FERREIRA, M.; SACRAMENTO, L. A.; LIMA, M. H. F.; ALMEIDA, R. P.; CARREGARO, V.; SILVAA, J. S. Interleukin-27 (IL-27) mediates susceptibility to visceral leishmaniasis by suppressing the IL-17-neutrophil response. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 84, n. 8, p. 2289–2298, 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 3 out. 2020.

RAVIOLA, E.; KARNOVSKY, M. J. Evidence for a blood-thymus barrier using electron-opaque tracers. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 136, n. 3, p. 466–498, 1972. Disponível em: <<http://rupress.org/jem/article-pdf/136/3/466/470978/466.pdf>>. Acesso em: 8 set. 2020.

REQUENA, J. M.; SOTO, M.; DORIA, M. D.; ALONSO, C. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [s. l.], v. 76, n. 3–4, p. 269–281, 2000.

RITTER, M. A.; BOYD, R. L. Development in the thymus: it takes two to tango. **Immunology Today**, [s. l.], v. 14, n. 9, p. 462–469, 1993. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/0167569993902500/fulltext>>. Acesso em: 28 set. 2020.

RODEWALD, H.-R. Thymus Organogenesis. **Annual Review of Immunology**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 355–388, 2008. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090408>>. Acesso em: 31 ago. 2020.

ROSENTHAL, L. A.; SUTTERWALA, F. S.; KEHRLI, M. E.; MOSSER, D. M. Leishmania major-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 64, n. 6, 1996.

SAINTE-MARIE, G. Tridimensional reconstruction of the rat thymus. **The Anatomical Record**, [s. l.], v. 179, n. 4, p. 517–526, 1974. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ar.1091790412>>. Acesso em: 8 set. 2020.

SAVINO, W. The Thymus Is a Common Target Organ in Infectious Diseases. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 2, n. 6, p. e62, 2006. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.0020062>>. Acesso em: 29 set. 2020.

SAVINO, W.; DARDENNE, M.; VELLOSO, L. A.; SILVA-BARBOSA, S. D. The thymus is a common target in malnutrition and infection. In: BRITISH JOURNAL OF NUTRITION 2007, **Anais...** : Cambridge University Press, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S0007114507832880>>. Acesso em: 22 set. 2020.

SCHNUR, L.; ZUCKERMAN, A.; MONTILIO, B. Dissemination of leishmanias to the organs of Syrian hamsters following intrasplenic inoculation of promastigotes. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 432–447, 1973. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0014489473901033>>. Acesso em: 29 set. 2020.

SILVA, A. V. A.; SOUZA, T. L.; FIGUEIREDO, F. B.; MENDES, A. A. V.; FERREIRA, L. C.; FILGUEIRA, C. P. B.; CUERVO, P.; PORROZZI, R.; MENEZES, R. C.; MORGADO, F. N. Detection of amastigotes and histopathological alterations in the thymus of *Leishmania infantum* -infected dogs. **Immunity, Inflammation and Disease**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 127–139, 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/iid3.285>>. Acesso em: 23 set. 2020.

STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis, 2007.

STUTMAN, O. **Two main features of T-cell development: thymus traffic and postthymic maturation.**, Springer, Boston, MA, 1977. Disponível em:

<https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4684-3054-7_1>. Acesso em: 26 set. 2020.

SUNIARA, R. K.; JENKINSON, E. J.; OWEN, J. J. T. An essential role for thymic mesenchyme in early T cell development. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 191, n. 6, p. 1051–1056, 2000. Disponível em: <<http://www.jem.org/cgi/current/full/191/6/1051>>. Acesso em: 11 nov. 2020.

THROSBY, M.; HERBELIN, A.; PLÉAU, J.-M.; DARDENNE, M. CD11c + Eosinophils in the Murine Thymus: Developmental Regulation and Recruitment upon MHC Class I-Restricted Thymocyte Deletion . **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 165, n. 4, p. 1965–1975, 2000. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/165/4/1965><http://www.jimmunol.org/content/165/4/1965.full#ref-list-1>>. Acesso em: 9 nov. 2020.

TOURIGNY, M. R.; MAZEL, S.; BURTRUM, D. B.; PETRIE, H. T. T cell receptor (TCR)- β gene recombination: Dissociation from cell cycle regulation and developmental progression during T cell ontogeny. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 185, n. 9, p. 1549–1556, 1997. Disponível em: <<http://rupress.org/jem/article-pdf/185/9/1549/966966/5505.pdf>>. Acesso em: 25 set. 2020.

UENO, N.; BRATT, C. L.; RODRIGUEZ, N. E.; WILSON, M. E. Differences in human macrophage receptor usage, lysosomal fusion kinetics and survival between logarithmic and metacyclic *Leishmania infantum chagasi* promastigotes. **Cellular Microbiology**, [s. l.], v. 11, n. 12, p. 1827–1841, 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-5822.2009.01374.x>>. Acesso em: 13 nov. 2020.

VAN EWIJK, W. T-Cell Differentiation is Influenced by Thymic Microenvironments. **Annual Review of Immunology**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 591–615, 1991. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.iy.09.040191.003111>>. Acesso em: 2 set. 2020.

VAN EWIJK, W. **The thymus: “Interactive teaching during lymphopoiesis”**, Immunol Lett, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21333687/>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

VAN EWIJK, W.; BREKELMANS, P. J. M.; JACOBS, R.; WISSE, E. Lymphoid microenvironments in the thymus and lymph node. **Scanning Microscopy**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 2129–2140, 1988. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/3266367>>. Acesso em: 27 set. 2020.

WANDERLEY, J. L. M.; MOREIRA, M. E. C.; BENJAMIN, A.; BONOMO, A. C.; BARCINSKI, M. A. Mimicry of Apoptotic Cells by Exposing Phosphatidylserine Participates in the Establishment of Amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in Mammalian Hosts . **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 176, n. 3, p. 1834–1839, 2006. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/176/3/1834><http://www.jimmunol.org/content/176/3/1834.full#ref-list-1>>. Acesso em: 13 nov. 2020.

WARBURG, A.; SCHLEIN, Y. The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 926–930, 1986. Disponível em: <<https://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.1986.35.926>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

WEISS, A.; IMBODEN, J.; HARDY, K.; MANGER, B.; TERHORST, C.; STOBO, J. **The role of the T3/antigen receptor complex in T-cell activation.**, Annu Rev Immunol, 1986. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2939858/>>. Acesso em: 30 set. 2020.

WHO | Epidemiological situation. **WHO**, [s. l.], 2020. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: 22 set. 2020.

WU, L.; LI, C. L.; SHORTMAN, K. Thymic dendritic cell precursors: Relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 184, n. 3, p. 903–911, 1996. Disponível em: <<https://europepmc.org/articles/PMC2192802>>. Acesso em: 17 set. 2020.

YAMANO, T.; NEDJIC, J.; HINTERBERGER, M.; STEINERT, M.; KOSER, S.; PINTO, S.; GERDES, N.; LUTGENS, E.; ISHIMARU, N.; BUSSLINGER, M.; BRORS, B.; KYEWSKI, B.; KLEIN, L. Thymic B Cells Are Licensed to Present Self Antigens for Central T Cell Tolerance Induction. **Immunity**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 1048–1061, 2015.

ZHANG, L.; SUN, L.; ZHAO, Y. **Thymic epithelial progenitor cells and thymus regeneration: An update**, Nature Publishing Group, 2007. Disponível em: <www.cell-research.com>. Acesso em: 4 set. 2020.

ANEXO A- FIGURAS e TABELA SUPLEMENTARES

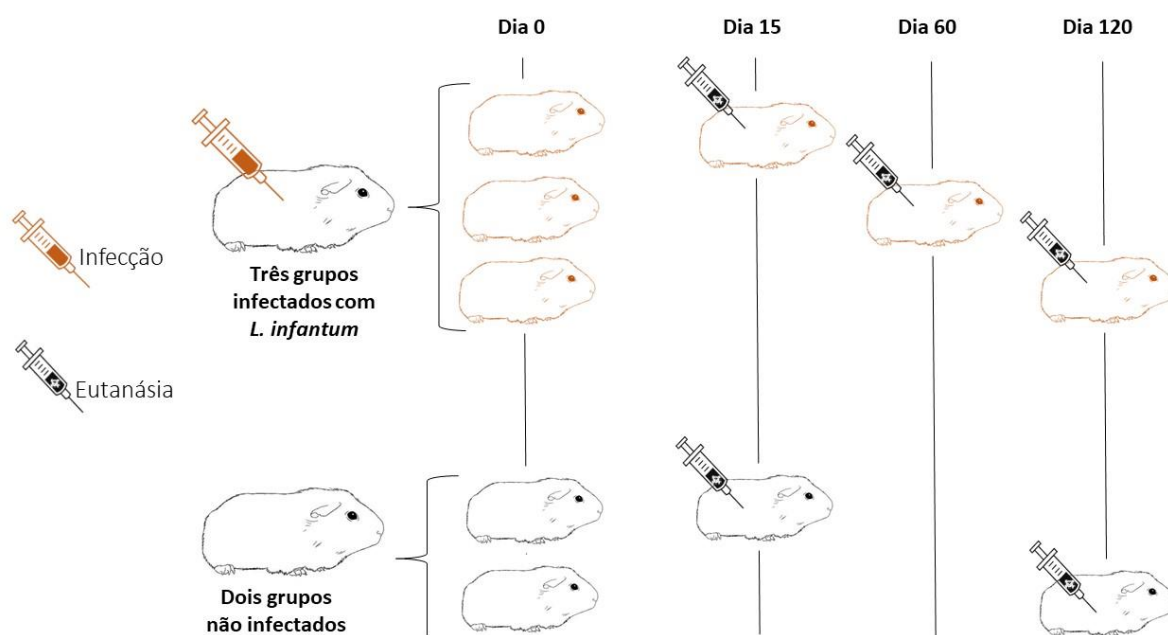


Fig S1. Esquema do delineamento experimental da pesquisa. Foram utilizados 21 hamsters, 15 deles foram infectados experimentalmente com *L. infantum chagasi* AM-46 e divididos em 3 grupos eutanasiados em diferentes tempos pós-infecção (15, 60 e 120 dias). Seis hamsters não infectados foram divididos em 2 grupos controles eunasiados com do 15 e 120 pós infecção.

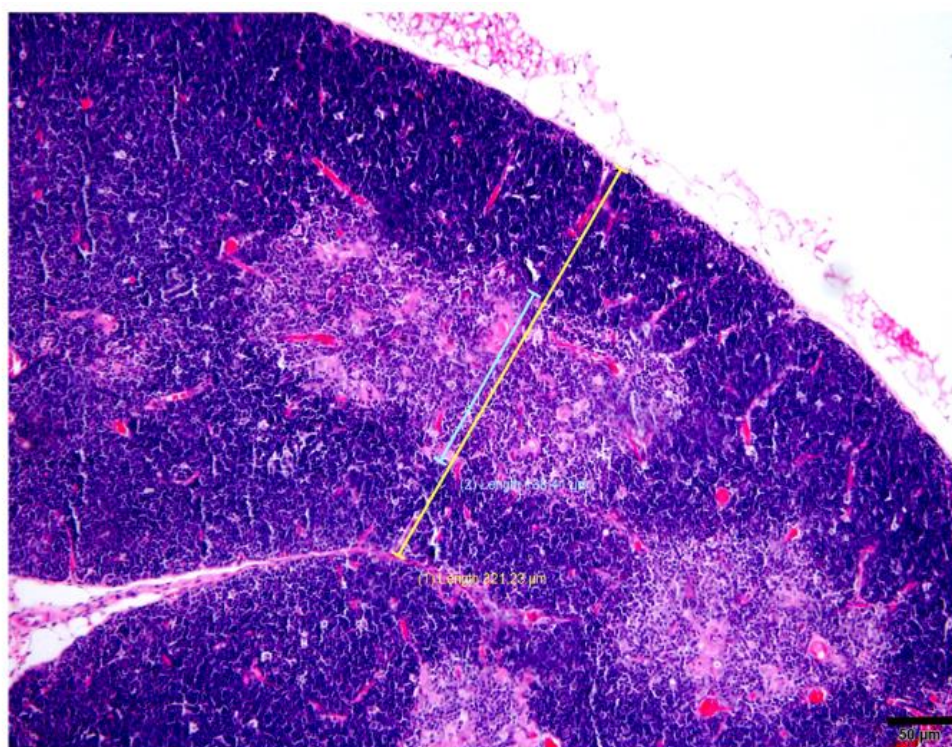


Fig S2. Imagem capturada e avaliada no software cellSens, exemplificando a medida de espessura do córtex e medula para o cálculo da razão córtex:medula.

A linha amarela começando e terminando no tecido conjuntivo capsular representa a espessura da cortical somada a medular. A linha azul, traçada paralela a primeira, representado a medida da espessura medular. Bar= 50µm.

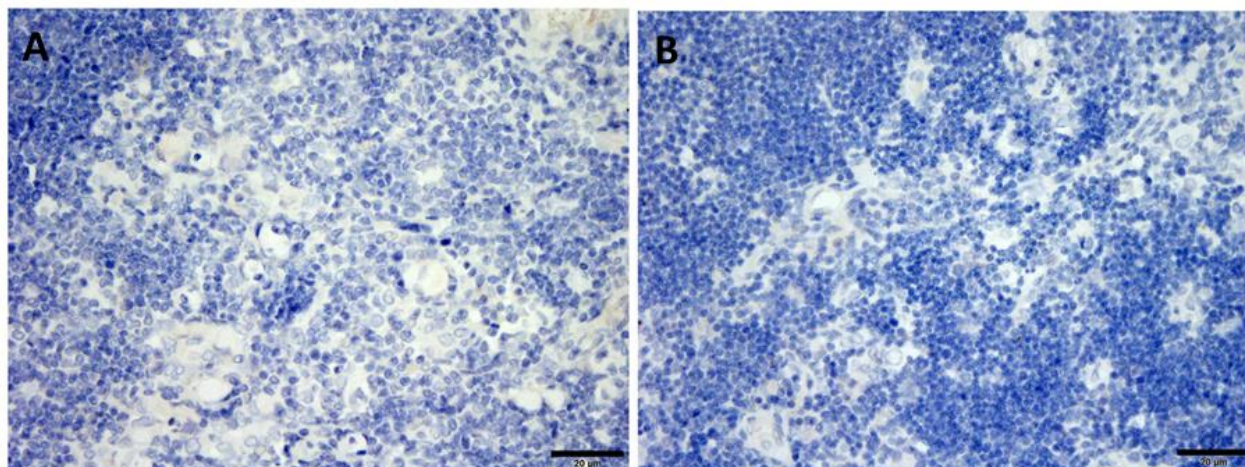


Fig S3. Controles negativos das reações imuno-histoquímicas. (A) Controle negativo para reações utilizando citrato pH 6,0 para recuperação de antígenos. (B) Controle negativo pra reações utilizando Tris Hcl pH 9 (EnVision™ FLEX, High pH - Dako®) para recuperação de antígenos.

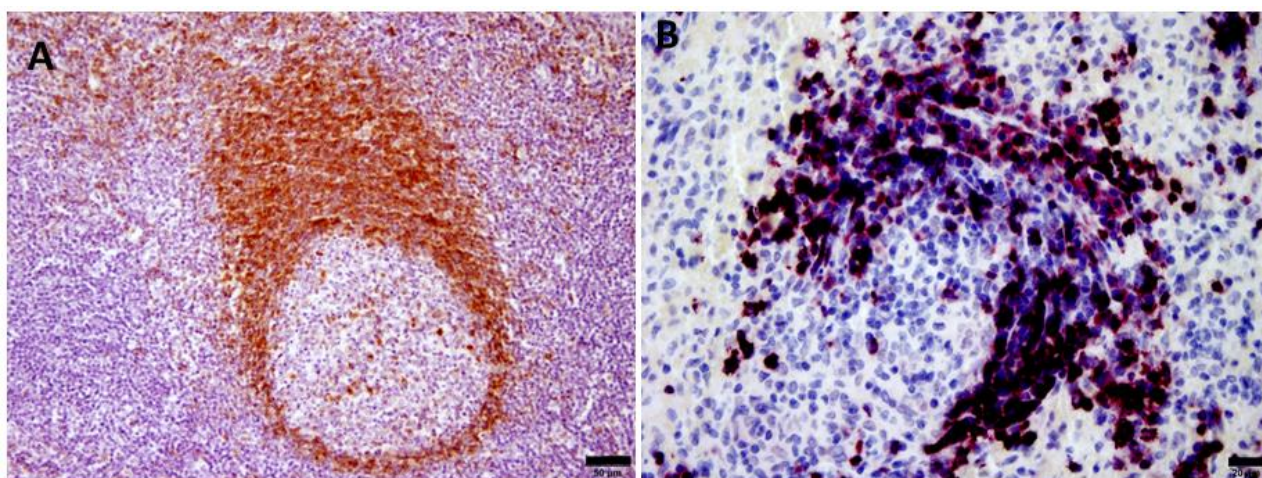


Fig S4- Controle positivo do anticorpo primário anti-CD79a. (A) Tonsila humana (Anti-CD79a Clone 11E3/Novocastra™ + 3,3'-diaminobezidine- DAKO). (B) Baço Hamster (Anti-CD79a Clone 11E3/Novocastra™ + ImmPACT™VIP-VECTOR).

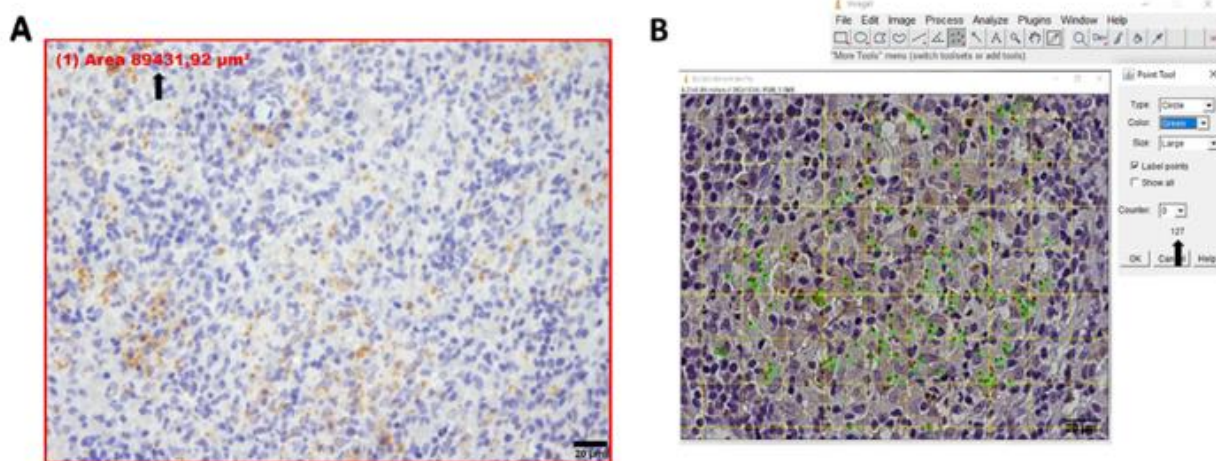


Fig S5. Demonstração da mensuração de área total da foto e contagem de amastigotas. A e B Imagens obtidas com auxílio do dispositivo de microimagem digital Olympus BX 50 acoplado a Câmera e computador para captura de imagem. **A-** Realização da medida da área total da foto em μm^2 (seta) representada pela linha vermelha realizada utilizando o software cellSens (Olympus Life Science). Objetiva 40, ampliação 400x. **B-** Contagem de amastigotas imunomarcadas com revelador 3,3'-diaminobezidine (DAKO) no software ImageJ, em verde amastigotas selecionadas utilizando ferramenta do programa, na seta contagem feita pelo programa das amastigotas selecionadas, linhas amarelas grid feito pelo programa para auxiliar na contagem. Bar= 20 μm .

Tabela S1- Tabela com dados brutos do experimento

Tempo (dias)	Animal	Peso (g)	Razão cortex:medula (μm^2)	Grau de atrofia	Área em Azul Massom(%)	Grau Inflamação do Parenquima	Grau de Inflamação Peritímica	Carga Parasitária Baço (Amastigotas/ μm^2)	Carga Parasitária Fígado (Amastigotas/ μm^2)	Vimentina (%)	Citoqueratina (%)	MAC387 (3%)	MAC387 cortical (Células/ μm^2)	CD79a (%)	CD3+
15	C1	0,0335	1,759	0,00	0,5400	0,00	1,00	-	-	43,776	53,277	1,528	9,06E-05	2,745	41,013
	C2	0,0419	1,845	0,00	0,9200	1,00	1,20	-	-	44,566	46,690	1,902	1,14E-04	1,931	39,416
	C3	0,0489	1,941	0,00	1,5800	0,00	0,80	-	-			0,944	5,59E-05	1,453	44,944
15	I1	0,0435	2,774	1,50	1,3000	1,50	0,80	1,23E-05	2,35E-05	54,523	39,286	0,968	7,60E-05	-	54,201
	I2	0,0070	2,085	1,00	1,5199	1,50	1,00	8,95E-06	0,00E+00	58,164	30,225	1,287	7,04E-05	3,522	54,944
	I3	0,0409	1,905	1,25	0,8893	1,50	0,80	1,34E-05	3,35E-06	44,477	49,472	1,113	2,24E-05	5,156	-
	I4	0,0380	-	0,00	2,7081	1,50	1,20	1,34E-05	5,59E-06	31,005	18,452	1,069	7,72E-05	3,670	55,221
	I5	0,0361	1,954	0,00	1,3988	1,50	0,80	2,24E-06	1,01E-05	54,746	31,741	1,784	9,50E-05	2,243	54,276
60	I1	0,0431	2,635	0,00	1,1256	2,00	0,80	2,90E-04	8,39E-05	49,549	32,819	0,698	3,24E-05	3,732	31,568
	I2	0,0244	2,217	0,00	2,1422	0,00	0,60	2,80E-05	3,80E-05	47,565	36,473	0,513	3,91E-05	2,390	39,435
	I3	0,0265	2,456	1,75	1,1396	1,00	1,00	3,24E-05	1,79E-05	45,811	32,526	0,833	5,59E-05	3,392	43,304
	I4	0,0146	1,390	1,25	3,3580	0,00	1,00	4,36E-05	3,35E-06	50,552	40,484	4,146	2,05E-04	4,448	36,857
	I5	0,0346	1,595	1,50	1,0849	0,00	1,60	7,60E-05	1,12E-06			1,723	7,83E-05	3,528	42,965
120	I1	0,0298	1,217	2,38	6,6923	0,00	1,60	3,99E-04	3,13E-05	-	-	1,169	7,38E-05	0,293	37,915
	I2	0,0169	0,962	2,60	6,5024	2,00	1,20	3,06E-03	5,86E-04	40,823	56,852	3,101	1,93E-04	1,786	42,751
	I3	0,0176	0,965	2,13	1,7372	0,00	0,60	5,11E-04	2,12E-05	-	-	1,567	1,13E-04	0,294	-
	I4	0,0245	0,931	0,00	3,0366	1,00	1,00	2,05E-04	3,35E-05	60,343	42,601	0,498	3,35E-05	2,948	47,880
	I5	0,0163	2,074	2,00	1,7493	0,00	1,60	5,73E-04	1,68E-05	26,044	40,792	1,100	7,16E-05	1,270	42,344
120	C1	0,034	1,260	2,13	6,7600	1,00	1,20	-	-	46,157	51,974	1,265	6,37E-05	6,917	42,344
	C2	0,0288	1,110	2,25	5,0900	1,50	0,80	-	-	60,404	51,036	1,053	6,04E-05	2,531	48,282
	C3	0,0269	1,000	1,25	5,3900	0,00	1,60	-	-	58,565	52,721	1,576	7,16E-05	4,141	48,841

ANEXO B- COMISSÃO DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Caracterização morfológica, e do perfil de expressão gênica de citocinas do timo de hamsters infectados com Leishmania Infantum**", Processo FOA nº 00620-2019, sob responsabilidade de Gisele Fabrino Machado apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 27 de Agosto de 2019.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 31 de Janeiro de 2021.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 03 de Março de 2021.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Morphological characterization, and of profile of genic expression of cytokines in thymus of hamsters infected with Leishmania Infantum**", Protocol FOA nº 00620-2019, under the supervision of Gisele Fabrino Machado presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on August 27, 2019.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: January 31, 2021.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: March 03, 2021.

Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

ANEXO C- NORMAS DE SUBMISSÃO

Modified February 2020

PLOS ONE

MANUSCRIPT BODY FORMATTING GUIDELINES

1 Abstract ←

2 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
 3 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor
 4 interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec
 5 pharetra quam, vitae convallis nunc. Mauris in mattis sapien. Fusce
 6 sodales vulputate auctor. Nam lacus felis, fermentum sit amet nulla
 7 ac, tristique ultrices tellus. Integer rutrum aliquet sapien, eu
 8 fermentum magna pellentesque vitae. Integer semper viverra mauris
 9 vel pulvinar. Suspendisse sagittis malesuada urna. Praesent mauris
 10 diam, fringilla id fringilla ac, posuere non lorem. Vestibulum mauris
 11 ante, fringilla quis tortor sit amet, accumsan fermentum quam. Nulla
 12 dictum consectetur leo. Ut vulputate ipsum purus, a interdum nibh
 13 viverra et. Praesent aliquam sapien vel massa sodales bibendum.
 14 Nulla interdum accumsan lectus, sed auctor elit accumsan a.
 15 Suspendisse quis rhoncus nibh. The verum est de illic.

16

17 Introduction ←

18 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
 19 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor
 20 interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec
 21 pharetra quam, vitae convallis nunc.

22 Materials and methods

23 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
 24 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae (Fig 1) ←
 25 interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec
 26 pharetra quam, vitae convallis nunc. Mauris in mattis sapien. Fusce
 27 sodales vulputate auctor. Nam sit amet nulla lacus a, (Figs 1 and 2) ←
 28 ultrices tellus. Integer rutrum aliquet sapien, eu fermentum magna
 29 pellentesque vitae.

30

31 **Fig 1. This is the Fig 1 Title.** This is the Fig 1 legend.

32 **Fig 2. This is the Fig 2 Title.** This is the Fig 2 legend.

33

File Naming for Figures

- Figure files should be saved as "Fig1.tif", "Fig2.eps", etc.
- Acceptable file formats for figures are ".tif", ".tiff", and ".eps"
- Figures should be uploaded separately as individual files.
- PLOS ONE guidelines for figures can be found here:
<http://journals.plos.org/plosone/s/figures>

34

1

Level 1 Heading

- Use Level 1 heading for all major sections (Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, etc.).
- Bold type, 18pt font.
- Only use italics and text formatting where needed (e.g. genus and species names, genes, etc.).
- Headings should be written in sentence case (capitalize only the first word of the heading, the first word of the subheading, and any proper nouns and genus names).

NOTE: Do not cite figures, tables, supporting information, or references in the Abstract.

Figure Citations

- Cite figures as "Fig 1", "Fig 2", etc.
- Cite figures and tables in order.
- Do not cite "Fig 2" before "Fig 1".
- Cite multiple figures as "Figs 1 and 2", "Figs 1-3", etc.

Figure Captions

- Each figure caption should appear directly after the paragraph in which they are first cited.
- Do not include tables within captions.
- Use bold type for the figure titles.

PLOS ONE

MANUSCRIPT BODY FORMATTING GUIDELINES

35

36

37 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
38 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor
39 interdum. Donec p^2 et q^2 tincidunt porta sem nec hendrerit.

40
$$p^2 + 2pq + q^2 = 1 \quad (1)$$

41 Vestibulum nec pharetra quam, vitae convallis nunc. Mauris
42 in mattis sapien. Fusce sodales vulputate auctor. Nam lacus felis,
43 fermentum sit amet nulla ac, tristique ultrices tellus. Integer rutrum
44 aliquet sapien, eu fermentum magna pellentesque vitae. Integer
45 semper viverra mauris vel pulvinar dolor sit amet en $(p + q)^2 = 1$.

46

47 Genotyping

48 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
49 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor
50 interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Omnes tuum
51 basi sunt pertinent ad nos. Mauris in mattis sapien. Fusce sodales
52 vulputate auctor. Nam lacus felis, fermentum sit amet nulla ac,
53 tristique ultrices tellus. Integer rutrum aliquet sapien, eu fermentum
54 magna pellentesque vitae. Integer semper viverra mauris vel
55 pulvinar et alst.

56 Whole genome RFLP analysis

57 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
58 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor
59 interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec
60 pharetra quam, vitae convallis nunc. Mauris in mattis sapien. Fusce
61 sodales vulputate auctor. Numquam iens dare tibi up.

62 **NOTE:** This document is presented in single-space paragraph
63 format for ease of use. Please submit your manuscript in
64 double-space paragraph format.

64

Display/Numbered Equation

- Format display equations in Mathtype or Equation Tools.
- Do not use Graphic Objects.

Inline Equation

- Format in regular text or as an inline equation in Mathtype or Equation Tools.
- Do not use Symbol Font.
- Do not use Graphic Objects.

Level 2 Heading

- Use Level 2 headings for sub-sections of major sections.
- Bold type, 16pt font.
- Only use italics and text formatting where needed.
- Use sentence case.

Level 3 heading

- Use Level 3 headings for sub-sections within Level 2 headings.
- Bold type, 14pt font.
- Only use italics and text formatting where needed.
- Use sentence case.

PLOS ONE

MANUSCRIPT BODY FORMATTING GUIDELINES

65 Results and discussion

66 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
67 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, et bland **Table 1**
68 Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec pharetra
69 quam, vitae convalli. Fido nemo.

70 **Table 1. This is the Table 1 Title.**

	Chemical W	Chemical X	Chemical Y	Chemical Z
Chemical 1	Reaction 1W	Reaction 1X	Reaction 1Y	Reaction 1Z
Chemical 2	Reaction 2W	Reaction 2X	Reaction 2Y	Reaction 2Z
Chemical 3	Reaction 3W ^a	Reaction 3X	Reaction 3Y ^b	Reaction 3Z
Chemical 4	Reaction 4W	Reaction 4X	Reaction 4Y	Reaction 4Z
Chemical 5	Reaction 5W	Reaction 5X	Reaction 5Y	Reaction 5Z

71 This is the Table 1 legend.

72 ^aTable footnotes belong here.

73 ^bFootnotes should have corresponding symbols in the table.

74

75

76 Conclusions

77 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing **[1-5]**.
78 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor
79 interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec
80 pharetra quam, vitae convallis nunc. Mauris in mattis sapien. Fusce
81 sodales vulputate auctor **S1 Fig**. Dolor sit amet **S1 and S2 Tables**.

82

83

3

Tables and Table Citations

- Tables should be cited as "Table 1", "Table 2", etc.
- Cite multiple tables as "Tables 1 and 2", "Tables 1-3", etc.
- Tables should be included directly after the paragraph in which they are first cited.
- Tables must be cell-based in Microsoft Word or embedded with Microsoft Excel.
- Do not use empty rows to create spacing.
- Do not include graphic objects, images, or colored text.
- See PLOS ONE Table Guidelines for more complete instructions: <http://journals.plos.org/plosone/s/tables>

Reference Citations

- Cite references in brackets (for example, "[1]" or "[2-5]" or "[3,7,9]").
- References must be cited in order at first mention.

Supporting Information Citations

- Format Supporting Information Citations as "S1 Fig", "S1 Table", etc.
- Cite multiple files as "S1 and S2 Figs", "S1-S3 Figs", etc.
- It is not required to cite each Supporting Information file.
- Supporting information should be uploaded separately as individual files.

84

85 **Acknowledgments**

86 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
87 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor
88 interdum.

89

90

91 **References**

- 92 1. Doe J, Data A, van Stats J, Testperson M, Ribosome D Jr,
93 McBio GHT, et al. This is the article title. PLoS ONE.
94 2017;12(12):e000000. doi: 10.1371/journal.pone.0000000
95 2. Doe J, Data A, van Stats J, Testperson M, Ribosome D Jr,
96 McBio GHT, et al. Bunny dynamics in cartoon landscapes.
97 PLoS ONE. Forthcoming 2017.

98

99

100 **Supporting information**

101 **S1 Fig. This is the S1 Fig Title.** This is the S1 Fig legend.

102 **S2 Fig. This is the S2 Fig Title.** This is the S2 Fig legend.

103 **S1 Table. This is the S1 Table Title.** This is the S1 Table legend.

104 **S2 Table. This is the S2 Table Title.** This is the S2 Table legend.

105 **S1 File. This is the S1 File Title.** This is the S1 File legend.

File Naming for Supporting Information

- Supporting Information files should be saved as “S1_Fig.tif”, “S1_File.pdf”, etc.
- All file types are supported.
- Please see the PLOS ONE guidelines for Supporting Information here: <http://journals.plos.org/plosone/s/supporting-information>

Acknowledgments

- Do not include funding or competing interests information in Acknowledgments.

References

- References should be listed after the main text, before the supporting information.
- References with more than six authors should list the first six author names, followed by “et al.”
- Please see the PLOS ONE guidelines for References here: <http://journals.plos.org/plosone/s/submission-guidelines#loc-references>

Supporting Information Captions

- List Supporting Information captions at the end of the manuscript in a section titled “Supporting information”.
- Use a Level 1 heading.
- Use bold type for the titles.
- Supporting Information files do not require full captions; only labels (“S1 Fig”) are fully required.

Please also see the PLOS ONE Submission Guidelines which can be found here: <http://journals.plos.org/plosone/s/submission-guidelines>

4

For assistance preparing figures, please contact figures@plos.org

For assistance with other formatting requirements, contact plosone@plos.org