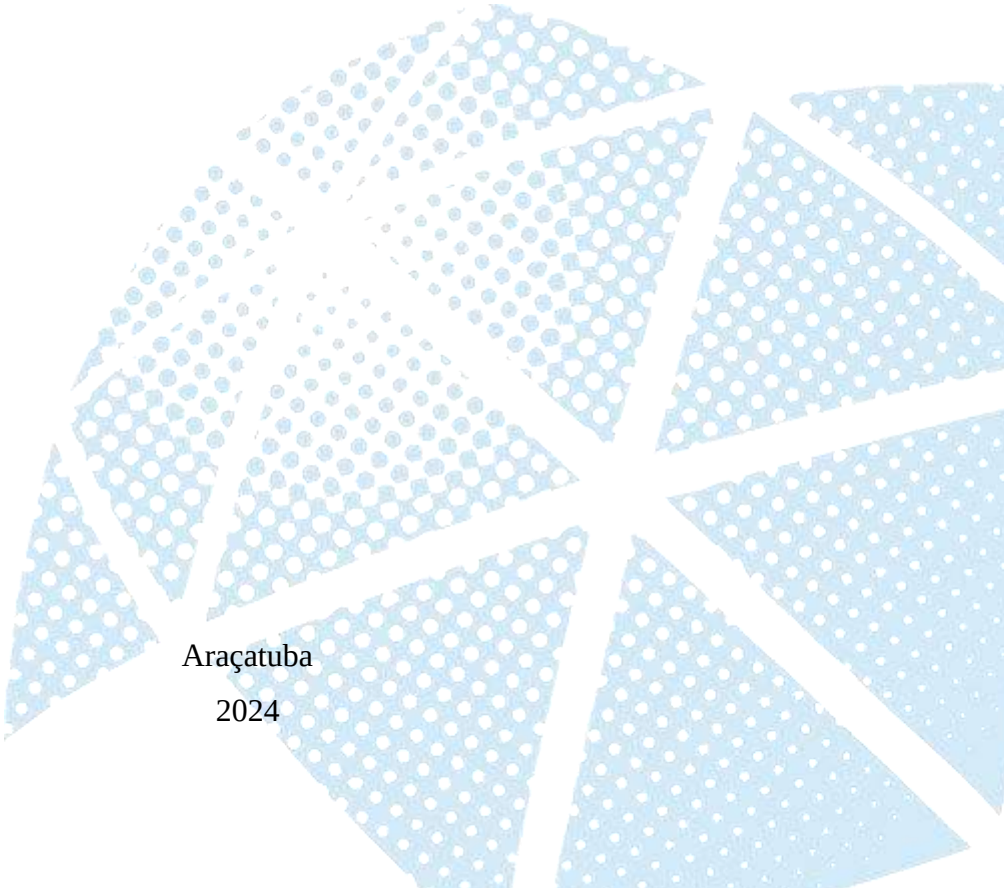


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Faculdade de medicina veterinária - Campus de Araçatuba

KAREN SANTOS MARÇO

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA
DE CITOCINAS DO TIMO DE HAMSTERS (*Mesocricetus auratus*) INFECTADOS
COM *Leishmania infantum***

Araçatuba
2024



KAREN SANTOS MARÇO

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA
DE CITOCINAS DO TIMO DE HAMSTERS (*Mesocricetus auratus*) INFECTADOS
COM *Leishmania infantum***

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Área de Concentração: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Fabrino Machado

Araçatuba

2024

M321c

Março, Karen Santos

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA
DE CITOCINAS DO TIMO DE HAMSTERS (*Mesocricetus auratus*)
INFECTADOS COM *Leishmania infantum* / Karen Santos Março. --
Araçatuba, 2024

42 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba
Orientadora: Gisele Fabrino Machado

1. Leishmaniose visceral. 2. Células T. 3. Ácido ribonucleico. I.
Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE KAREN SANTOS MARÇO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL, DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA - CÂMPUS DE ARAÇATUBA.

Aos 03 dias do mês de dezembro do ano de 2024, às 09:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de KAREN SANTOS MARÇO, intitulada **CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS DO TIMO DE HAMSTERS (*Mesocricetus auratus*) INFECTADOS COM *Leishmania infantum***. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Associada GISELE FABRINO MACHADO (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP, Pesquisador GUILHERME DIAS DE MELO (Participação Virtual) do(a) Unité Lyssavirus Epidemiologie et Neuropathologie / Instituto Pasteur de Paris, Profa. Dra. MÁRCIA DALASTRA LAURENTI (Participação Virtual) do(a) Departamento de Patologia / Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - USP. Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Associada  GISELE FABRINO MACHADO



AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão à minha orientadora, Prof.^a Dr.^a. Gisele Fabrino Machado, aceitar ser minha orientadora e por sua dedicação e apoio contínuo ao longo de minha jornada acadêmica.

À Prof.^a. Márcia Dalastra Laurenti da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e às suas orientadas, Gabriela e Carmen, que contribuíram fornecendo não apenas as amostras, mas também compartilhando seus conhecimentos práticos e teóricos.

Ao pesquisar Dr. Guilherme Dias de Melo, por sua gentil contribuição para este estudo, dividindo seus profundos conhecimentos em pesquisa.

À Prof.^a. Valéria Félix Marçal de Lima, pela disponibilização de espaço e equipamentos em seu laboratório além, de compartilhar seus conhecimentos teórico práticos.

Agradeço também à Giulia Gonçalves Jussiani, pela colaboração nos experimentos e por ser uma colega e companheira de pós-graduação com quem pude dividir tanto as dificuldades quanto os aprendizados.

Agradeço ao meu namorado, Leandro Barbosa Fais, pelo apoio e motivação na conclusão do projeto, elaboração da tese e na sua defesa.

Por fim, sou imensamente grata aos meus pais, Ivete Domingos dos Santos Março e Edson Roberto Março, e à minha irmã, Éllem Santos Março, que sempre me apoiaram nas minhas escolhas e me ofereceram todo o suporte necessário para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 8887.606195/2021-00;

À FAPESP, pelo apoio financeiro, concedido por meio do Processo nº 2021/03902-1, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

A leishmaniose é uma zoonose negligenciada que afeta entre 50.000 e 90.000 pessoas anualmente, sendo a leishmaniose visceral (LV) sua forma mais grave, causada principalmente pela *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum/chagasi*. Apesar da alta prevalência, a maioria dos infectados não desenvolve a doença, cuja progressão sintomática está associada ao equilíbrio entre respostas imunes adaptativas celular (Th1) e humoral (Th2). Os linfócitos T, fundamentais para essas respostas, têm sua maturação no timo regulada por citocinas que influenciam eventos como diferenciação e proliferação, rearranjo genético do receptor de células T (TCR), e as seleções positiva e negativa. Este estudo analisou a expressão de citocinas (IFN- γ , IL-12, IL-10, TGF- β , IL-4 e IL-2) no timo de hamsters infectados experimentalmente por *L. infantum*, visando compreender as alterações tímicas que podem impactar a maturação e diferenciação dos linfócitos T durante a infecção através da técnica de RT-qPCR. O estudo observou um aumento significativo na expressão de IFN- γ decorrente da leishmaniose visceral, portanto, a doença leva alterações na expressão de citocinas e consequentemente o microambiente tímico o que impacta na maturação dos linfócitos T que são liberados para periferia, afetando a resposta imune periférica.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral; Células T; Ácido ribonucleico;

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected zoonosis that affects between 50,000 and 90,000 people annually, with visceral leishmaniasis (VL) being its most severe form, primarily caused by *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum/chagasi*. Despite its high prevalence, most infected individuals do not develop the disease, whose symptomatic progression is associated with the balance between cellular (Th1) and humoral (Th2) adaptive immune responses. T lymphocytes, which are essential for these responses, undergo maturation in the thymus, regulated by cytokines that influence processes such as differentiation and proliferation, T-cell receptor (TCR) genetic rearrangement, and positive and negative selection. This study analyzed the expression of cytokines (IFN- γ , IL-12, IL-10, TGF- β , IL-4, and IL-2) in the thymus of hamsters experimentally infected with *L. infantum*, aiming to understand thymic alterations that may impact T cell maturation and differentiation during infection, using the RT-qPCR technique. The study observed a significant increase in IFN- γ expression resulting from visceral leishmaniasis. Therefore, the disease induces changes in cytokine expression and, consequently, in the thymic microenvironment, impacting the maturation of T lymphocytes released to the periphery, ultimately affecting the peripheral immune response.

Keywords: Visceral leishmaniasis; T-cell; Ribonucleic acid.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.1	LEISHMANIOSE VISCERAL	9
2.1.1	Resposta Imune e Leishmaniose Visceral	10
2.2	TIMO.....	12
2.2.1	Função do timo.....	13
2.2.2	Citocinas no timo	17
2.2.3	Alterações no timo durante a leishmaniose visceral	19
2.3	MODELO EXPERIMENTAL	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	ANIMAIS	21
3.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	21
3.3	ÉTICA	22
3.4	COLHEITA DO MATERIAL	22
3.5	COMPROVAÇÃO DA INFECÇÃO	22
3.6	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS.....	22
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
4	RESULTADOS	24
5	DISCUSSÃO	27
6	CONCLUSÃO.....	29
	REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma zoonose listada entre as 10 doenças tropicais negligenciadas, afetando cerca de 50.000 a 90.000 pessoas anualmente (PAHO, 2024; WHO, 2024). A leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave desta doença e tem como principais agentes etiológicos a *L. donovani* e *L. infantum/chagasi* (MULLA *et al.*, 2016).

Apesar alta incidência de casos, a maioria das pessoas infectadas com espécies visceralizantes de *Leishmania* nunca desenvolve a doença. Entretanto, a apresentação sintomática e progressiva da LV está fortemente associada ao equilíbrio entre as respostas imunes adaptativas celular (Th1) e humoral (Th2) (R & NYLÉN, 2012; NYLÉN & GAUTAM, 2010). Onde, uma resposta imune predominantemente celular, caracterizada pela produção de citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12, além da proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, está associada à proteção contra a doença. Em contraste, uma resposta humoral predominante, com a liberação de citocinas Th2 como IL-4, IL-10 e TGF- β , está relacionada à ocorrência de lesões sistêmicas e à progressão da LV (BARBIÉRI, 2006).

Os linfócitos T, que desempenham um papel central na coordenação das respostas imunes adaptativas, desenvolvem-se e amadurecem no timo por meio de processos como diferenciação, proliferação, rearranjo genético do receptor de células T (TCR) e as seleções positiva e negativa (LIND *et al.*, 2001; PEARSE, 2006b; PETRIE, 2002). Esses processos são, ao menos em parte, regulados por citocinas como IFN- γ , IL-2, IL-12 e TGF- β .

No timo, o IFN- γ influencia a adesão dos timócitos às células epiteliais tímicas (TECs), impactando a migração dos timócitos (LAGROTA-CÂNDIDO *et al.*, 1996; LANNES-VIEIRA, J. *et al.*, 1991). Além disso, induz a expressão de várias moléculas de superfície, incluindo as classes I e II do MHC interferindo nas etapas de seleção positiva e negativa dos timócitos (PATEL *et al.*, 1995). A IL-12, assim como na periferia, estimula a produção de IFN- γ afetando a migração, diferenciação e morte celular de células T imaturas (LÚDVÍKSSON *et al.*, 1999; RODRIGUEZ-GALÁN *et al.*, 2005).

Paralelamente, outras citocinas, como IL-2 e TGF- β , estão envolvidos na maturação dos linfócitos T reguladores (Treg) no timo, garantindo a formação adequada de um compartimento normal de células Treg periféricas e ajudando a prevenir a autoimunidade (BAYER *et al.*, 2007; MALEK *et al.*, 2000, 2001; MCCARRON *et al.*, 2019).

Por outro lado, citocinas imunossupressoras como IL-4 e IL-10, relacionadas à progressão da LV, têm sido associadas a efeitos deletérios no timo. Estudos indicam que essas citocinas promovem a redução do número de timócitos, involução e aplasia tímica,

evidenciando sua influência negativa no desenvolvimento das células T (ROULEAU *et al.*, 1999; SHEN *et al.*, 2018).

A presença de *Leishmania*, bem como alterações decorrentes da LV já foram descritas no timo de humanos, cães, camundongos e hamsters. Em humanos a LV causou atrofia tímica (ELTOUM *et al.*, 1992). Em cães, atrofia tímica, timite granulomatosa ou piogranulomatosa e alterações nas populações de linfócitos T e B, macrófagos e células epiteliais tímicas (JUSSIANI *et al.*, 2022; SILVA *et al.*, 2020). Em camundongos, foi observado aumento de peso do órgão, porcentagem de células T simples positiva (CD4 + e CD8 +) e da expressão gênica e produção de IL-12 (CUERVO-ESCOBAR *et al.*, 2014; LOSADA-BARRAGÁN *et al.*, 2017, 2019) e em hamsters alterações na população de linfócitos T e B (MARÇO *et al.*, 2023).

A LV está associada a desequilíbrios na resposta imune adaptativa, contudo, ainda são pouco compreendidos os mecanismos pelos quais a infecção afeta o microambiente tímico, essencial para a maturação dos linfócitos T. Alterações no timo, como mudanças na expressão de citocinas podem prejudicar o desenvolvimento de células T e comprometer a resposta imunológica, contribuindo para a progressão da doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL

As leishmanioses são doenças zoonóticas causadas por parasitas do gênero *Leishmania*, apresentando-se nas formas cutânea, mucocutânea e visceral. A LV é a forma mais grave da doença, podendo ser letal se não tratada (BANETH *et al.*, 2008; BARBIÉRI, 2006; DESJEUX, 2001).

A LV está entre as dez principais doenças tropicais negligenciadas, com mais de 12 milhões de pessoas infectadas com uma estimativa de 50.000 a 90.000 novos casos anuais em todo o mundo, com apenas 25-45% desses casos notificados à organização mundial da saúde (OMS). É endêmica em 80 países, com a maioria dos casos concentrados no Brasil, leste da África e Índia (WHO, 2024). Nas Américas, é endêmica em 13 países, com uma média anual de 2.488 casos e uma taxa de letalidade de cerca de 8% entre 2001 e 2021, considerada a mais alta em comparação com outros continentes (PAHO, 2024).

As espécies *L. donovani* e *L. infantum/chagasi* são as principais causadoras da LV (Mulla; Osman Hussien; Mohamed Elhousseini, 2016), sua transmissão envolve um ciclo complexo entre humanos, animais e flebotomíneos, podendo ocorrer de forma antroponótica (humano para humano) ou zoonótica (animal para humano) (ZIJLSTRA, 2016).

Na transmissão zoonótica, os cães são o principal reservatório doméstico, sendo que, cães infectados aumentam o risco da doença em humanos, tornando o controle da infecção em populações caninas essencial para o manejo da doença em regiões endêmicas (BANETH *et al.*, 2008; STANLEY; ENGWERDA, 2007).

O vetor, especialmente *Lutzomyia longipalpis*, é o principal responsável pela transmissão do parasita entre hospedeiros. Fêmeas de flebotomíneos picam o hospedeiro para se alimentar de sangue, inoculando a forma promastigota infectante do parasita na pele. Essas promastigotas são rapidamente fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocítico, como macrófagos e células dendríticas. Dentro dos macrófagos, as promastigotas se transformam em amastigotas, que são adaptadas ao ambiente ácido dos fagolisossomos. As amastigotas se multiplicam por divisão binária, causando a ruptura dos macrófagos e liberando novos parasitas nos tecidos adjacentes. As amastigotas liberadas infectam outros macrófagos e podem se disseminar pela corrente sanguínea, atingindo órgãos do sistema mononuclear fagocítico, como baço, fígado e medula óssea (BANETH *et al.*, 2008; MURRAY *et al.*, 2005) e levando aos principais sintomas da Leishmaniose Visceral, como febre prolongada, pancitopenia, hipergamaglobulinemia e esplenomegalia (SINGH *et al.*, 2014).

2.1.1 Resposta Imune e Leishmaniose Visceral

A resposta imune a LV é complexa e determinante na progressão da doença, o que explica porque alguns indivíduos infectados nunca desenvolvem doença clínica e outros progridem para manifestações graves. A capacidade do sistema imune de controlar a infecção é resultado do equilíbrio entre as respostas protetoras e patogênicas, sendo este influenciado pela interação entre diversos tipos de células do sistema imunológico e as citocinas que elas secretam (KUMAR; NYLÉN, 2012).

Os neutrófilos estão entre as primeiras células a responder à infecção, sendo recrutados em grande número para o local com objetivo de combater a infecção utilizando-se de atividades antiparasitárias tais como a fagocitose, formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), liberação de espécies reativas (RNS e ROS) e compostos tóxicos derivados de grânulos no ambiente local ou no fagossomo. E através desta interação com os parasitas modulam respostas imunes inatas e adaptativas subsequentes (KUPANI *et al.*, 2021), secretando citocinas pró-inflamatórias tais como IL-12, IFN- γ , TNF- α e (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004, 2007) e/ou imunossupressoras de células T, tais como IL-10 e TGF- β (KUPANI *et al.*, 2021; SHARMA *et al.*, 2017; YANG; UNANUE, 2013).

Os monócitos/macrófagos são um dos principais tipos de células recrutadas para o local da picada e o principal local de replicação do parasita na fase aguda da infecção (BOGDAN, 2020; GOUNDRY *et al.*, 2018). A polarização dos macrófagos pode determinar o resultado da doença e esta polarização depende da interação dos macrófagos com moléculas de superfície nos parasitas de *Leishmania* (LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVAEZ, 2020).

Os receptores inatos Toll-like (TLRs) ativam a produção de citocinas pró-inflamatórias e moléculas coestimuladoras em resposta à infecção por *Leishmania* (BECKER *et al.*, 2003; CARRADA *et al.*, 2007). Contudo, as moléculas coestimuladoras da família B7-CD28 que regulam a ativação das células T tem sua expressão reduzida em macrófagos infectados por *Leishmania* levando a falha na apresentação de antígenos e prejudicando a proliferação das células T (PINELLI *et al.*, 1994).

Embora o espectro fenotípico dos macrófagos seja dinâmico, em geral macrófagos M1 tem espectro pró-inflamatório e expressam ROS, NO, iNOS, NOX-1, IL-12, IL-1 β e TNF- α com consequente efeito protetor durante a leishmaniose enquanto os M2 tem espectro anti-inflamatório (arginase-1, IL-10, TGF- β , CD206 e CD163) contribuindo para susceptibilidade (KUMAR *et al.*, 2018; VOLPEDO *et al.*, 2021).

A resposta adaptativa está envolvida tanto na proteção quanto na susceptibilidade a LV. Embora a polarização das respostas Th1 e Th2 tenham papel determinante na apresentação clínica, durante a doença ocorrem interações complexas entre componentes imunológicos, tais como a resposta Th17, células T reguladoras (Treg), citocinas e quimiocinas (KUMAR *et al.*, 2017).

A resposta Th1 (celular) é essencial para o controle do parasita e a resolução da doença. É caracterizada pela produção de citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12, e proliferação de linfócitos T CD4 $^{+}$ e CD8 $^{+}$ (GOTO; LINDOSO, 2004; KUMAR *et al.*, 2017; NYLÉN; GAUTAM, 2010; PERUHYPE-MAGALHAES *et al.*, 2005). Já a resposta Th2 (humoral) caracteriza-se pela predominância de citocinas como IL-4, IL-10 e TGF- β leva a supressão da resposta Th1, multiplicação descontrolada do parasita e ocorrência de lesões sistêmicas, com proliferação de linfócitos B, plasmocitose, hipergamaglobulinemia e formação de imunocomplexos (BARBIÉRI, 2006; NYLÉN; GAUTAM, 2010; PERUHYPE-MAGALHAES *et al.*, 2005; ZIJLSTRA, 2016).

No entanto, a doença clínica tem ocorrido em humanos e em hamsters apesar de evidências de ativação da resposta Th1 como a expressão aumentada de mRNA de citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-12, sugerindo que não carecem de uma resposta Th1 protetora, mas

que este mecanismo é suprimido por mecanismos regulatórios que impedem o controle do crescimento do parasita (KUMAR; NYLÉN, 2012; MELBY *et al.*, 2001).

A IL-10 está envolvida em diversos defeitos imunológicos associados LV, como a modulação dos macrófagos hospedeiros para favorecer a sobrevivência e o crescimento do parasita, tornando-os não responsivos aos sinais de ativação e inibindo a morte de amastigotas, por meio da regulação negativa da produção de TNF α e NO (NYLÉN *et al.*, 2007; NYLÉN; GAUTAM, 2010). Além disso, promove a sobrevivência das células B, a proliferação de células plasmáticas e a mudança do isótipo de IgG para IgG1 e IgG3 levando a altos títulos de anticorpos e a formação de complexos imunes e consequente declínio progressivo do estado imunológico do hospedeiro (CALDAS *et al.*, 2005).

O papel da resposta Th17 ainda permanece controverso. Neutrófilos de indivíduos saudáveis expostos à *Leishmania* induzem fortemente IL-17 e IL-22 levando ao recrutamento de células Th1, além disso, promovem o reparo do tecido fortalecendo as barreiras epiteliais e contribuindo assim para a imunovigilância, desempenhando um possível papel complementar a resposta Th1 na proteção contra a LV (PITTA *et al.*, 2009). No entanto, a IL-21, outra citocina característica da Th17, foi identificada como parte de um mecanismo de controle de feedback que promove a expansão de células T produtoras de IL-10, contribuindo para a supressão da resposta Th1 (ANSARI *et al.*, 2011).

Os linfócitos Treg foram implicados na susceptibilidade à LV através da supressão da resposta Th1 pela IL-10 (ANDERSON *et al.*, 2005). Contudo, um estudo mais recente relatou pouca contribuição das Treg na supressão da imunidade antiparasitária durante a LV e ainda que células T CD4⁺ convencionais e células dendríticas foram as fontes celulares mais importantes de IL-10. Além disso, as Tregs atuaram no retardo do desenvolvimento da patologia esplênica e restrição da expansão de leucócitos de forma independente da IL-10 (BUNN *et al.*, 2018).

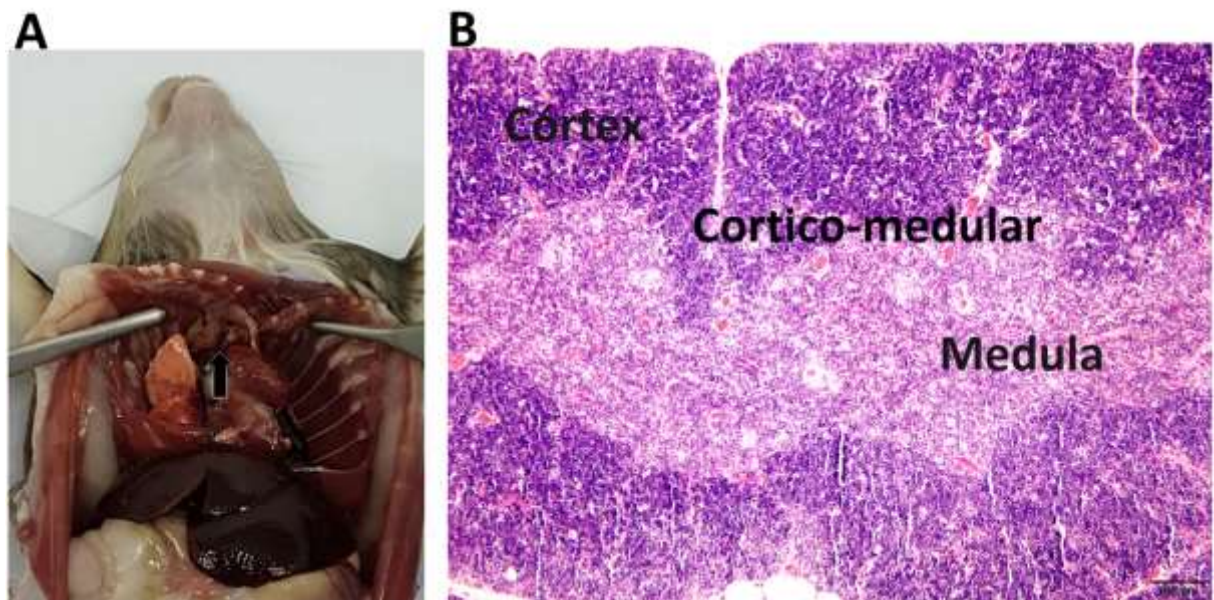
2.2 TIMO

O timo é um órgão linfoide primário com papel essencial no desenvolvimento e maturação dos linfócitos T (THAPA; FARBER, 2019). Nos mamíferos é composto por dois lobos circundados por uma cápsula de tecido conectivo de onde se originam septos que penetram o parênquima formando vários lóbulos. Cada lóbulo tímico possui três regiões distintas, córtex, medula e região corticomedular. O córtex é densamente povoado com células T em desenvolvimento e células epiteliais associadas, enquanto a medula contém células T em estágio maturação mais avançado e uma proporção maior de tipos de células epiteliais

(PEARSE, 2006a, 2006b). A região medular do timo é rodeada pelo córtex, e na transição entre estas é denominada região corticomedular (DUIJVESTIJN; HOEFSEMIT, 1981).

O parênquima do timo é composto de linfócitos e células não linfocitárias. Entre as células não linfocitárias estão fibroblastos, células endoteliais, macrófagos, células dendríticas e células epiteliais tímicas (TECs). As TECs representam o principal componente celular do microambiente tímico, e consistem em dois subconjuntos principais: células epiteliais tímicas corticais e medulares (cTEC e mTEC respectivamente) (MILIĆEVIĆ; MILIĆEVIĆ, 2004) (Figura 1).

Figura 1- Localização anatômica e histologia do timo.



Fonte: (MARÇO, 2020)

Legenda: A- Localização anatômica do timo (seta preta) em um hamster. À direita, imagem histológica mostrando as regiões do córtex, zona córtico-medular e medula, destacando a organização do tecido tímico..

2.2.1 Função do timo

O desenvolvimento e maturação dos tímocitos no timo envolve várias etapas, tais como diferenciação e proliferação, rearranjo genético do receptor de células T (TCR), e as seleções positiva e negativa (LIND *et al.*, 2001; PEARSE, 2006b; PETRIE, 2002).

Inicialmente, células-tronco hematopoiéticas ou células pré-T originadas na medula óssea deixam este sítio e circulam externamente. E aquelas que expressam o ligante 1 da glicoproteína selecionado pelas plaquetas (P) (PSGL1) entram no timo através de interação com a selectina P nas TECs (LIND *et al.*, 2001; STUTMAN, 1977; TAKAHAMA, 2006).

Após adentrarem o timo através da região córtico-medular, as células pré T agora denominadas de tímocitos, migram em direção ao córtex, retornando posteriormente à região

medular, de onde deixam o timo para a periferia. Esse movimento é guiado por diversas citocinas e quimiocinas (PESCHON *et al.*, 1994; RADTKE *et al.*, 1999).

Durante o desenvolvimento, os timócitos passam por três estágios principais de maturação: duplo-negativos (DN), duplo-positivos (DP) e simples-positivos (SP). No primeiro estágio os timócitos imaturos não expressam o receptor de células T (TCR) nem as moléculas CD4 e CD8 e são chamados de duplo-negativos (DN). Os DN podem ser divididos em quatro subestágios: DN-1, DN-2, DN-3 e DN-4 (LIND *et al.*, 2001; MA *et al.*, 1995; NORMENT *et al.*, 2003).

No subestágio DN1 (CD44+CD25-), os timócitos têm o potencial de se diferenciar em várias linhagens, incluindo linfócitos T, linfócitos B e células dendríticas. À medida que migram pelo córtex, os timócitos DN1 evoluem para o estágio DN2 (CD44+CD25+), acumulando-se na região subcapsular (IKAWA *et al.*, 1999; LIND *et al.*, 2001; PORRITT *et al.*, 2004). No estágio DN2, essas células ainda têm a capacidade de gerar tanto linhagens T quanto células dendríticas, e o comprometimento com as linhagens $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ é iniciado (CARPENTER; BOSSELUT, 2010).

Os timócitos DN3 estão totalmente comprometidos com a linhagem T, mas ainda podem se diferenciar em células α/β ou γ/δ , sendo geralmente encontradas no terço externo do córtex (CARPENTER; BOSSELUT, 2010; LIND *et al.*, 2001).

O pareamento do TCR β com a pré-T α forma o pré-TCR, que sinaliza os timócitos DN3 para passarem por um processo chamado "seleção β ". Esse processo envolve eventos como o comprometimento com a linhagem de células T $\alpha\beta$, diferenciação contínua, proliferação, sobrevivência e interrupção da recombinação no locus TCR β . Após a seleção β , os timócitos entram no estágio DN4 antes de regular positivamente as moléculas CD4 e CD8, gerando os timócitos "duplo positivos" (DP) (MICHIE; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2002).

Os DP correspondem ao segundo estágio de diferenciação no timo. Essa população de células expressa simultaneamente os marcadores CD4 e CD8. Após um rearranjo produtivo do TCR α e pareamento com o TCR β para produzir um $\alpha\beta$ TCR maduro, as células DP são submetidas à seleção positiva e negativa (HOGQUIST *et al.*, 2005).

A seleção positiva consiste na exposição das DP a peptídeos próprios apresentados por moléculas de MHC, e apenas as capazes de responder passam para próxima etapa de maturação. Esta etapa garante que células T respondam a antígenos estranhos em conjunto com moléculas de MHC resultando na diferenciação de timócitos T CD4+CD8–TCR alto ou CD4–CD8+TCR alto simples positivos (SP) (BEVAN; FINK, 1978; KATTMAN *et al.*, 2005; ZINKERNAGEL, 1978).

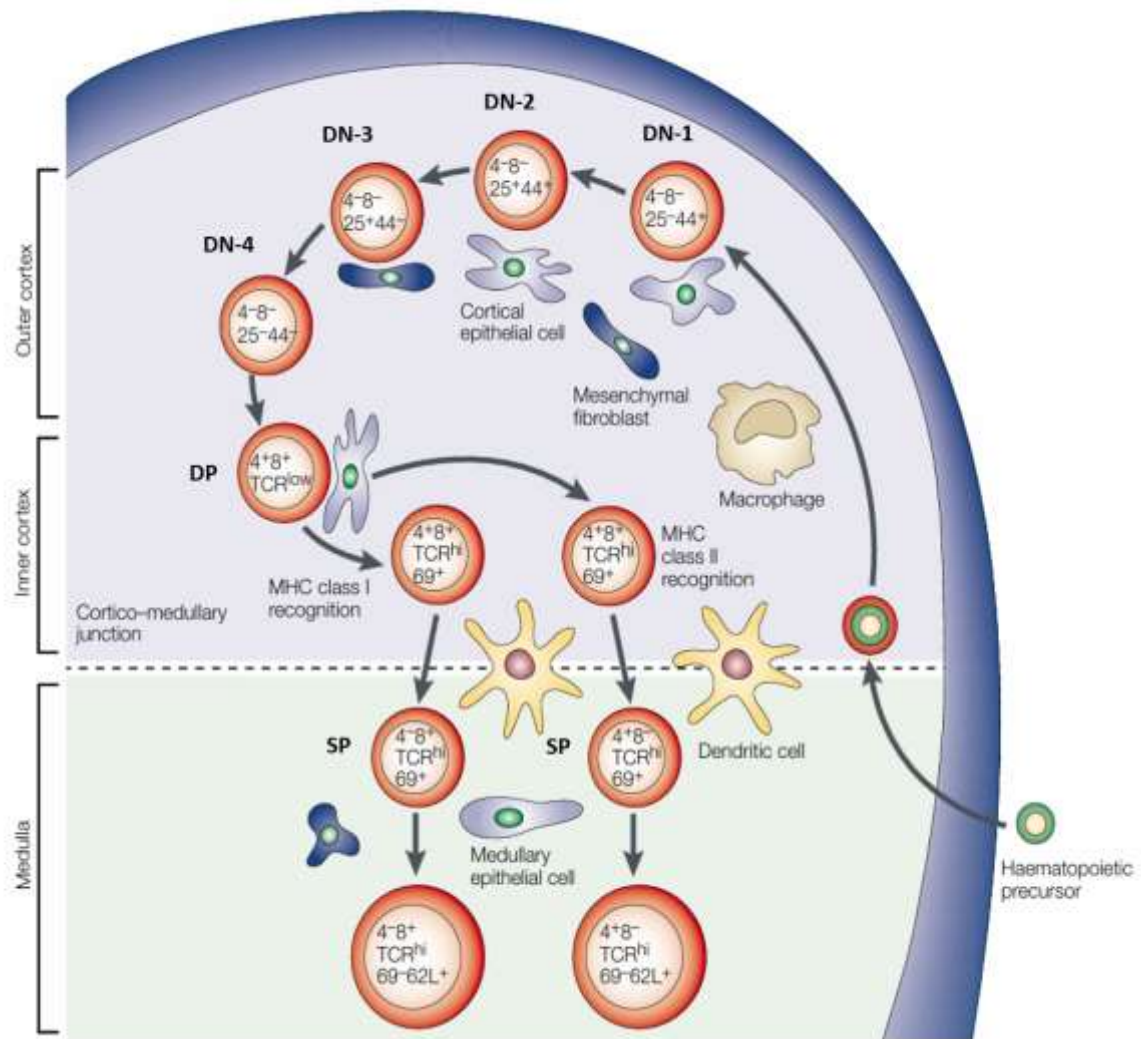
A afinidade entre TCR e o complexo MHC-I-peptídeo ou II em cTECs determina o destino dos timócitos em desenvolvimento. A interação com MHC I leva à diferenciação em precursores de células T citotóxicas/supressoras CD8+, enquanto o envolvimento com MHC II leva à diferenciação em precursores de células T auxiliares CD4+ (GRUSBY *et al.*, 1991; KLEIN *et al.*, 2014; SASAKI *et al.*, 2015). Mais de 90% desses timócitos serão eliminados, pois expressam receptores de células T (TCRs) que não mediam a seleção positiva (KLEIN *et al.*, 2014).

Após se tornarem simples positivas, as células T passam pela seleção negativa que consiste na eliminação ou inativação das que reconhecem peptídeos próprios com alta afinidade (KLEIN *et al.*, 2014). Enquanto a seleção positiva é restrita ao córtex, o processo de seleção negativa ocorre em duas ondas localizadas primeiro no córtex e depois na medula (STRITESKY *et al.*, 2013).

Timócitos simples-positivos (SPs) que passam pela seleção positiva e migram para a medula são submetidos à seleção negativa através da interação com células dendríticas residentes e migratórias, células epiteliais tímicas medulares (mTECs) e células B (KLEIN *et al.*, 2014).

Após passarem por todas estas etapas de maturação e pelas criteriosas etapas de seleção, os linfócitos T funcionais são liberados do timo para se juntarem ao grupo de linfócitos periféricos (Figura 1).

Figura 1. Etapas do desenvolvimento dos timócitos no timo



Fonte: Adaptada de ANDERSON; JENKINSON, 2001.

Legenda : As células progenitoras hematopoiéticas entram no córtex externo, onde passam pelas fases 4 fases duplo negativas (DN-1 a DN-4), caracterizadas pela não expressão dos marcadores de superfície CD4 ou CD8. Após a transição para timócitos duplo positivos (DP), que expressam CD4 e CD8, ocorre a seleção positiva e negativa mediada por células epiteliais, dendríticas e macrófagos. Timócitos que sobrevivem ao processo de seleção tornam-se células T maduras, simples positivas (SP), expressando CD4+ ou CD8+, e migram para a periferia.

Interações intrincadas entre vários tipos de células (TECs, macrófagos e células dendríticas), a matriz extracelular e timócitos e ainda a produção de polipeptídeos solúveis como quimiocinas e citocinas criam microambientes dinâmicos e complexos que coordenam os vários estágios da maturação dos timócitos no timo (ANDERSON; JENKINSON, 2001b; GAMEIRO *et al.*, 2010; GRAY *et al.*, 2005; JENKINSON *et al.*, 2003; MUÑOZ; ZAPATA, 2019).

As quimiocinas estão implicadas na regulação da proliferação e migração de células T no timo. O eixo biológico CXCL12-CXCR4 regula o deslocamento dos timócitos da região subcapsular para a corticomedular e a entrada de timócitos positivos únicos na região medular

(BLEUL; BOEHM, 2000). O CCR9 medeia a quimiotaxia em resposta ao CCL25 e é expresso em todos os estágios de diferenciação das células T, exceto em timócitos maduros (CARRAMOLINO *et al.*, 2001). Enquanto o eixo CCL19/CCR7 atuam na emigração de células T maduras do timo para os órgãos linfoides periféricos (MENDES-DA-CRUZ *et al.*, 2004).

2.2.2 Citocinas no timo

As citocinas produzidas no timo são semelhantes às do sistema imunológico periférico durante a inflamação, mas suas funções no timo podem diferir significativamente das citocinas periféricas (YARILIN; BELYAKOV, 2005). Externamente ao timo o IFN- γ é produzido por linfócitos T auxiliares Th1, linfócitos CD8, células B, células NKT e células apresentadoras de antígenos, como monócitos, macrófagos e células dendríticas (BOLD; ERNST, 2012; KAMBAYASHI *et al.*, 2003). Sua produção é estimulada pelas citocinas IL-12 e IL-18 enquanto IL-4, IL-10, TGF- β e glicocorticoides a inibem (ALMAWI *et al.*, 1998; TOMINAGA *et al.*, 2000). O IFN- γ regula as respostas imunes inata e adquirida, ativando macrófagos, células NK e a resposta Th1. Além disso, aumenta a expressão das moléculas de histocompatibilidade principal (MHC) Classe I e II, que ajudam na apresentação de antígenos às células apresentadoras de antígenos (APCs) e na regulação das funções das células B (SCHRODER *et al.*, 2004).

No timo o IFN- γ atua na adesão e migração de timócitos afetando a expressão de proteínas da matriz extracelular (ECM) e a expressão de receptores de ECM nas TECs. Estudos com culturas de células estimuladas com IFN- γ demonstraram que em baixas doses o IFN- γ aumenta a expressão dos receptores de fibronectina e laminina (VLA-5 e VLA-6) enquanto doses altas levam ao efeito inverso (LAGROTA-CÂNDIDO *et al.*, 1996; LANNES-VIEIRA, *et al.*, 1991). Além disso, o IFN- γ induz a expressão MHC de classes I e II nas TECs (PATEL *et al.*, 1995), afetando as etapas de seleção positiva e negativa (GRUSBY *et al.*, 1991; KLEIN *et al.*, 2014; SASAKI *et al.*, 2015).

Uma maior expressão de IFN- γ em estudos com camundongos transgênicos levou a aumento no número de timócitos SP e redução proporcional de DPs, reforçando seu papel na migração e seleção negativa e positiva dos timócitos (YOUNG *et al.*, 1997).

IL-12 é produzida no timo por células estromais tímicas e está envolvida na proliferação de timócitos, especialmente nas populações SP (CD3+CD4-CD8+ e CD3+CD4+CD8-), DP (CD3+CD4+CD8+) e triplo negativos (CD3-CD4-CD8-) (GODFREY *et al.*, 1994). A secreção de IL-12 é necessária para a apoptose de timócitos induzida por antígenos, ou seja, para seleção negativa. Em camundongos transgênicos OVA-TCR neonatais a síntese IL-12 intratímica

aumenta durante a seleção negativa induzida por peptídeo OVA. Essa seleção negativa ocorreu no estágio $\alpha\beta\text{TCR}^+ \text{CD4}^- \text{CD8}^-$ e foi prevenida pela coadministração de anti-IL-12. Esses camundongos apresentaram depleção de timócitos dependente de IL-12 e em decorrência de apoptose intratímica, também prevenido pela administração de anti-IL-12. Além disso, camundongos IL-12 p40^{-/-} apresentaram seleção negativa aberrante de timócitos $\text{CD4}^+ \text{CD8}^+$ duplos positivos quando injetados com mAb anti-CD3 (LÚDVÍKSSON *et al.*, 1999).

A combinação IL-12 e IL-18 gera mudanças fenotípicas e funcionais em timócitos, afetando a migração, diferenciação e morte celular de células T imaturas (LÚDVÍKSSON *et al.*, 1999; RODRIGUEZ-GALÁN *et al.*, 2005). Timócitos estimulados *in vitro* com IL-12 e IL-18 produzem grandes quantidades de IFN- γ , induzem a expressão gênica de CCR5 e apoptose significativa de timócitos e ainda a expressão de MHC em células epiteliais tímicas corticais e medulares de uma maneira dependente de IFN- γ (RODRIGUEZ-GALÁN *et al.*, 2005).

No timo o TGF- β é expresso principalmente pelas TECs subcapsulares e corticais. E a interação entre as TECs inibitórias expressando TGF- β regula a taxa na qual as células precursoras DN ($\text{CD4}^- \text{CD8}^-$) podem progredir pelo ciclo celular para estágio DP ($\text{CD4}^+ \text{CD8}^+$) (TAKAHAMA *et al.*, 1994). A ausência da sinalização do TGF- β nos timócitos afeta a seleção negativa, permitindo que timócitos altamente autorreativos escapem da seleção negativa cortical e progridam para a próxima etapa de maturação onde adquirem um fenótipo semelhante ao Th1 e acumulam-se aberrantemente na junção córtico-medular e, subsequentemente, não conseguem sustentar a expressão de AIRE na medula, escapando da seleção negativa medular e são liberados para a periferia onde induzem múltiplas lesões autoimunes de órgãos (MCCARRON *et al.*, 2019). Além disso a sinalização de TGF- β é necessária para indução da expressão do gene Foxp3 e comprometimento da linhagem de células Treg. As células Treg atuam mantendo sob controle as células T autorreativas que escapam da seleção negativa (FEUERER *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2008; SHEVACH *et al.*, 2008).

Assim como o TGF- β , a IL-2 atua no desenvolvimento e manutenção de células Treg no timo. Embora linfócitos Treg também sejam gerados extratimicamente a partir de células T convencionais, a maioria deles tem origem no timo (CHEN *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2011). A IL-2 é essencial para a formação de um compartimento funcional de células T reguladoras (Treg) periféricas, prevenindo a autoimunidade por seu papel no desenvolvimento tímico e na expansão periférica dessas células (BAYER *et al.*, 2005). Estudos com camundongos deficientes em IL-2R β demonstraram a expressão transgênica tímica de IL-2R β selvagem restaura um compartimento normal de Tregs e previne a autoimunidade letal (BAYER *et al.*, 2007; MALEK *et al.*, 2000; MALEK; BAYER, 2004).

O fator de transcrição FOXP3 é fundamental para o desenvolvimento, função e estabilidade das Tregs (DEVAUD *et al.*, 2014), sendo que a IL-2 regula diretamente FOXP3 e CD25 via ativação de STAT5, que se liga ao promotor de *foxp3* para promover sua expressão. Este papel foi demonstrado em estudos com camundongos IL-2R β ^{-/-}, onde a expressão ectópica de *foxp3* em células T CD4⁺ resgata o desenvolvimento de Tregs e previne a autoimunidade (BURCHILL *et al.*, 2007; MALEK *et al.*, 2008). Os linfócitos Treg são, em sua maioria, derivados do timo, mas também podem ser gerados extratimicamente a partir de células T convencionais em condições específicas (CHEN *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2011).

A IL-4 e IL-10 embora não tenham demonstrado um papel importante na função tímica normal, foram relacionadas a eventos de involução e/ou atrofia tímica. Um estudo de cultura de órgãos tímicos fetais com células Th2 demonstrou que estas desempenham um papel fundamental na inibição do desenvolvimento de timócitos embrionários, e a IL-4, a principal citocina secretada por células Th2, foi sugerida como o fator-chave desta inibição. (SHEN *et al.*, 2018). Enquanto a superexpressão de IL-10 em camundongos transgênicos levou a uma rápida aplasia tímica pós-nascimento em decorrência de bloqueio no estágio de células pré-T (ROULEAU *et al.*, 1999).

2.2.3 Alterações no timo durante a leishmaniose visceral

A resposta imune a leishmaniose visceral (LV) é dinâmica e pode variar entre diferentes tecidos. A infecção do timo por *Leishmania*, assim como as alterações tímicas decorrentes, foram relatadas em várias espécies, incluindo humanos, cães, camundongos e hamsters (CUERVO-ESCOBAR *et al.*, 2014; JUSSIANI *et al.*, 2022; LOSADA-BARRAGÁN *et al.*, 2017, 2019; MARÇO *et al.*, 2023; TEIXEIRA *et al.*, 2020a).

A presença de *Leishmania spp.* foi descrita no timo acompanhada de atrofia tímica, com perda da demarcação corticomedular e redução de linfócitos corticais em humanos com Leishmaniose congênita (ELTOUM *et al.*, 1992).

Em cães, o DNA de *Leishmania spp.* foi detectado no timo, assim como a presença de amastigotas por meio de marcação imuno-histoquímica (JUSSIANI *et al.*, 2022; TEIXEIRA *et al.*, 2020b). Estes cães apresentaram atrofia tímica, caracterizada pela diminuição do parênquima, infiltração de tecido adiposo e conjuntivo próximo à cápsula e entre os lóbulos, rarefação linfóide e perda da demarcação córtico-medular; e ainda timite granulomatosa ou piogranulomatosa (SILVA *et al.*, 2020). Também foi observada a diminuição do número de linfócitos T CD3⁺ e macrófagos, bem como um aumento de linfócitos B (CD79a⁺) (JUSSIANI *et al.*, 2022; SILVA *et al.*, 2020).

Em camundongos infectados com *L. Donovanii* amastigotas intracelulares foram observadas na região medular do timo em secções coradas com Giemsa, e o seu DNA detectado por qPCR (DOMÍNGUEZ-ASENJO et al., 2021).

A presença de *Leishmania* no timo de camundongos foi descrita em infecções por *L. infantum* por meio de imunomarcacão (LOSADA-BARRAGÁN et al., 2017). Além disso, observou-se um aumento no peso do timo e no número total de células em decorrência da infecção. Nos camundongos infectados e desnutridos, houve um aumento relativo de células TCD4⁺ e uma redução nas células DP, além de uma diminuição na expressão de mRNA de IL-10 e IL-12. Em contraste, em camundongos infectados e bem nutridos, o mRNA de IL-12 no timo apresentou aumento da expressão, assim como da quantidade de proteína de IL-12 secretada. Adicionalmente, os níveis de IL-10 estavam elevados em camundongos desnutridos e infectados, enquanto os níveis do fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) foram significativamente maiores nos animais infectados (CUERVO-ESCOBAR et al., 2014; LOSADA-BARRAGÁN et al., 2017, 2019).

Em hamsters infectados com *L. infantum*, a presença de amastigotas no timo foi observada em cortes histológicos (BINHAZIM et al., 1993) e com auxílio de imunohistoquímica (MARÇO et al., 2023). Nesses animais não foi observado atrofia tímica como descrito em cães (JUSSIANI et al., 2022; SILVA et al., 2020). Contudo, a infecção por LV alterou a população de linfócitos T e B, resultando em um aumento de linfócitos T CD3⁺ e na presença de linfócitos T imaturos na região medular após 15 dias de infecção, além de uma redução de linfócitos B após 120 dias de infecção (MARÇO et al., 2023).

2.3 MODELO EXPERIMENTAL

O hamster apresenta alta suscetibilidade a infecções por diferentes cepas de *Leishmania sp.*, o que resulta em carga parasitária visceral progressiva, esplenomegalia, disfunção da medula óssea e caquexia características semelhantes às observadas na doenças humana e canina (MELBY et al., 2001; REQUENA et al., 2000).

A infecção do hamster sírio (*Mesocricetus auratus*) com *Leishmania donovani* gerou características clínicas e patológicas similares às da LV humana. No hamster, o parasita se replicou de forma descontrolada no fígado, baço e medula óssea, mesmo diante de uma forte resposta de citocinas do tipo Th1 (IL-2, IFN- γ e TNF/linfotóxina), sugerindo uma falha na função efetora dos macrófagos (MELBY et al., 2001). Assim como os humanos, os hamsters têm uma produção limitada de óxido nítrico (NO). Em hamsters infectados por *L. donovani*, a expressão do mRNA da óxido nítrico sintase (NOS) 2, responsável pela codificação da iNOS

em resposta ao IFN γ , não é regulada positivamente. Esse fenômeno foi atribuído à menor atividade do promotor NOS2 nos hamsters, em comparação com os camundongos (PEREZ *et al.*, 2006).

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

Portanto o hamster sírio é considerado um excelente modelo experimental para o estudo das características patológicas da LV ativa.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

As amostras de tecido de hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) usadas neste estudo foram fornecidas pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os hamsters eram todos machos, com idade entre seis e oito semanas e pesavam de 50 a 80 g. Durante o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas com temperatura constante e em um ciclo claro/escuro de 12 horas, alimentados com ração comercial e água até a eutanásia no Biotério do Instituto de Medicina Tropical da faculdade de medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Quinze hamsters foram inoculados intraperitonealmente com 10^7 promastigotas de *L. infantum* (MHOM/BR/1972/BH46) em fase de crescimento estacionária mantida por um máximo de quatro passagens em meio de cultura Schneider suplementado com 10% de soro bovino fetal. Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos de cinco animais, que foram eutanasiados em diferentes momentos pós-infecção: 15 (I-15), 60 (I-60) e 120 (I-120) dias pós-infecção (DPIs). Os grupos de controle consistiram em 15 animais saudáveis, divididos em 3 grupos pareados por idade com os grupos infectados eutanasiados em 15 (C-15), 60 (C-60) e 120 (C-120) dias.

3.3 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, nº 0213-2021, e FMUSP-São Paulo/SP, nº 172/14.

3.4 COLHEITA DO MATERIAL

A eutanásia foi realizada com dose letal de tiopental sódico (120mg/kg) (CONCEA, 2013), seguido de necropsia para coleta do timo, baço e fígado dos animais. Uma porção do timo foi congelada a -80°C até o momento do processamento para extração do RNA total.

3.5 COMPROVAÇÃO DA INFECÇÃO

A infecção sistêmica foi confirmada pela detecção de amastigotas no fígado e no baço pela técnica de imuno-histoquímica em um estudo anterior (Março et al., 2023). Amastigotas foram detectados no baço de 15/15 (100%) e no fígado em 14/15 (93,3%) dos hamsters infectados experimentalmente e calculada a densidade parasitária (amastigotas/ μm^2) (Tabela 3). No timo, amastigotas de *Leishmania spp.* imunocoradas foram identificadas em 9/15 dos hamsters infectados experimentalmente.

Tabela 3 - Densidade parasitária em fígado e baço de hamsters infectados por *Leishmania infantum*.

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

Fonte: (MARÇO, 2020) .

Legenda : Densidade parasitária média $\pm$ desvio padrão (DP) nos órgãos fígado e baço de hamsters infectados por *L. infantum*, calculada pela contagem de amastigotas marcadas por imuno-histoquímica (amastigotas/ μm^2). Os valores são apresentados para diferentes grupos de infecção: I-15 (15 dias), I-60 (60 dias) e I-120 (120 dias).

3.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS

A extração do RNA do timo foi realizada com Kit comercial RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN®), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração do RNA extraído (ng/ μL) e o grau de pureza (coeficiente $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) foi avaliado em espectrofotômetro (NanoDrop Technologies ND 1000 UV/VIS, EUA), utilizando as amostras

com valores entre 1,9 e 2,1. O cDNA foi produzido utilizando o kit comercial Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems®) conforme recomendações do fabricante, utilizando 1000ng de RNA para amostras e 2000ng para confecção da curva padrão em um volume final de 20 µL.

O qRT-PCR (real-time reverse transcription-polymerase chain reactions) foi realizado utilizando 5x HOT FIREPol® Evagreen® qPCR Supermix (Solis BioDyne, Tartu, Estonia) seguindo protocolo do fabricante. Os valores de eficiência de reação, os coeficientes de correlação (r^2) e *Slope* foram obtidos a partir de amplificação de no mínimo três diluições em série de um pool cDNA. A expressão de cada gene foi analisada pelo método de quantificação relativa com correção de eficiência descrito por Pfaffl (2004) utilizando a média geométrica da expressão gênica dos genes de referência HPRT-1 e GAPDH e foram representadas pela expressão gênica relativa (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de eficiência, coeficientes de correlação (r^2) e *Slope* da curva padrão a partir de no mínimo 3 diluições de cDNA.

Gene	Eficiência	r^2	<i>Slope</i>
GAPDH	99	0,948	-3,342
HPRT	108	0,976	-3,151
IL-12	110	0,998	-3,106
IL-10	96	0,989	-3,435
TGF- β	100	1,000	-3,329
IFN- γ	97	0,995	-3,405
IL-2	83	0,984	-3,823
IL4	92	0,998	-3,521

Fonte: elaborada pelo autor.

Os primers específicos para análise de citocinas e dos genes de referência dos hamsters foram utilizados conforme citado por (GUPTA *et al.*, 2012; MELBY *et al.*, 1998; RIBEIRO-ROMÃO *et al.*, 2014) para interleucinas (IL) de hamster IL-12, IL-10, TGF- β e IFN- γ (Tabela 2).

Tabela 2- Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores senso, antisenso utilizados nas RTqPCRs.

Citocina	Forward	Reverse	Citação
HPRT-1	GATAGATCCACTCCCATAACTG	TACCTTCAACAATCAAGACATTC	(Gupta <i>et al.</i> , 2012)
GAPDH	GTGGAGCCAAGAGGGTTCATC	GGTTCACACCCATCACAAACAT	(Ribeiro-Romão <i>et al.</i> , 2014)
IL-12	TATGTTGTAGAGGTGGACTG	TTGTGGCAGGTGTATTGG	(Gupta <i>et al.</i> , 2012)

IL-10	TGCCAAACCTTATCAGAAATG	AGTTATCCTTCACCTGTTCC	(Gupta <i>et al.</i> , 2012)
IFG-γ	GCTTAGATGTCGTGAATGG	GCTGCTGTTGAAGAAGTTAG	(Gupta <i>et al.</i> , 2012)
TGF-β	ACGGAGAAGAACTGCTGTG	GGTTGTGTTGGTTGTAGAGG	(Gupta <i>et al.</i> , 2012)
IL-2	ATGTACAGCAKGCAGCTCGC	TGTTGAGATGRYRCTTTGAC	(MELBY <i>et al.</i> , 1998)
IL4	GCCATCCTGCTCTGCCTTC	TCCGTGGAGTTCTTCCTTGC	Gupta <i>et al.</i> , 2011

Fonte: elaborada pelo autor.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças entre os grupos infectados e seus controles pareados foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney, com dados expressos como mediana e intervalo interquartil. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. A análise estatística multivariada (análise de componentes principais) foi realizada para comparar a expressão de citocinas e carga parasitária no fígado e baço. Todas as análises estatísticas foram feitas com o software Prism (GraphPad, La Jolla, CA, EUA).

4 RESULTADOS

A expressão gênica de citocinas no timo de hamsters foi avaliada por RT-qPCR em diferentes tempos pós-infecção experimental com *L. infantum*. Utilizou-se 30 hamsters, metade infectados experimentalmente, divididos em três grupos de cinco animais e eutanasiados aos 15, 60 e 120 dias pós-infecção (DPI). Os demais hamster, foram distribuídos em três grupos controles, pareados com os infectados por idade, compostos por cinco hamsters saudáveis, eutanasiados nos mesmos tempos.

A expressão gênica relativa de IFN- γ aumenta gradualmente ao longo do tempo da infecção (Tabela 4; Figura 2), sendo observada aos 60 DPI e sendo significativa apenas aos 120 DPI (I-120) em comparação com o controle C-120 ($p=0,0134$) (Figura 3). Apesar da expressão do gene para IL-12 estar mais proeminente nos grupos infectados aos 15 e 60 DPI que nos controles pareados e reduzida aos 120 DPI, estas diferenças não foram significativas (Tabela 4; Figura 3).

Tabela 4- Expressão gênica relativa de INF- γ , IL-12, IL-2, TGF- β , IL4 e IL-10 no timo dos hamster infectados e não infectados.

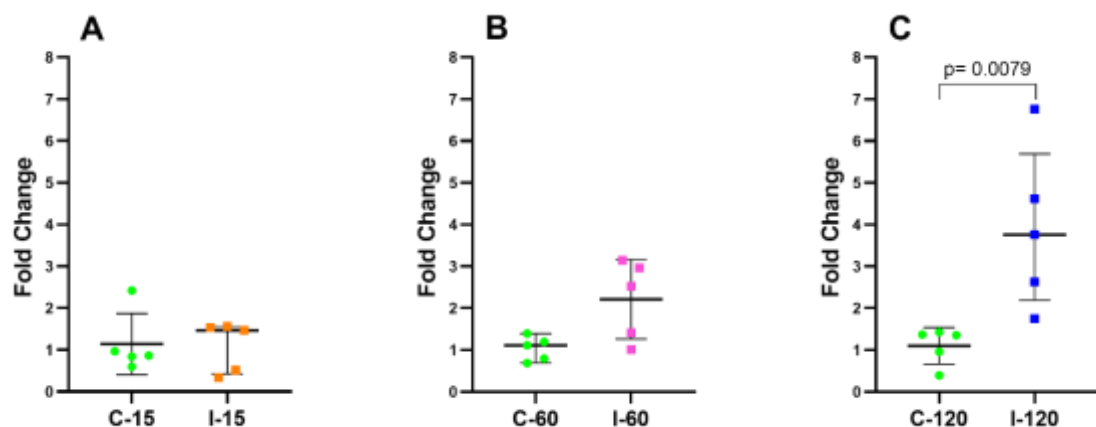
	Controle	Infectado
--	----------	-----------

Citocina	Tempo	Mediana (Quartis 25 e 75%)		Mediana (Quartis 25 e 75%)	
IFN- γ	15	0,8607	(0,717-1,692)	1,465	(0,425-1,545)
	60	1,109	(0,7394-1,291)	2,522	(1,212-3,053)
	120	2,522	(1,212-3,053)	3,755	(2,191-5,689) **
IL-12	15	0,6974	(0,3977-3,016)	2,844	(1,721-7,095)
	60	1,394	(0,3763-2,522)	3,880	(2,662-14,620)
	120	1,784	(0,2391-4,128)	0,663	(0,452-1,317)
IL-2	15	0,937	(0,856-1,209)	0,760	(0,215-19,71)
	60	1,229	(0,457-2,036)	1,469	(0,384-2,058)
	120	1,122	(0,6515-1,518)	1,101	(0,6295-1,696)
TGF- β	15	0,970	(0,745-1,380)	0,800	(0,600-1,160)
	60	0,890	(0,795-1,365)	1,520	(1,095-1,865)
	120	0,850	(0,785-1,395)	0,960	(0,715-1,365)
IL-4	15	0,760	(0,680-1,710)	0,880	(0,665-3,825)
	60	0,990	(0,790-1,320)	1,760	(1,200-5,360)
	120	1,330	(0,525-1,670)	0,990	(0,865-2,685)
IL-10	15	0,820	(0,720-1,595)	0,970	(0,620-6,525)
	60	1,050	(0,700-1,410)	1,180	(0,755-3,060)
	120	1,060	(0,845-1,190)	1,850	(1,360-3,440)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Valores medianos (quartis 25% e 75%) da expressão relativa de citocinas (IFN- γ , IL-12, IL-2, TGF- β , IL-4 e IL-10) em hamsters controles e infectados por *Leishmania infantum* nos tempos de 15, 60 e 120 dias pós-infecção. Diferenças estatisticamente significativas entre grupos no teste Mann Whitney são indicadas (**p < 0,05).

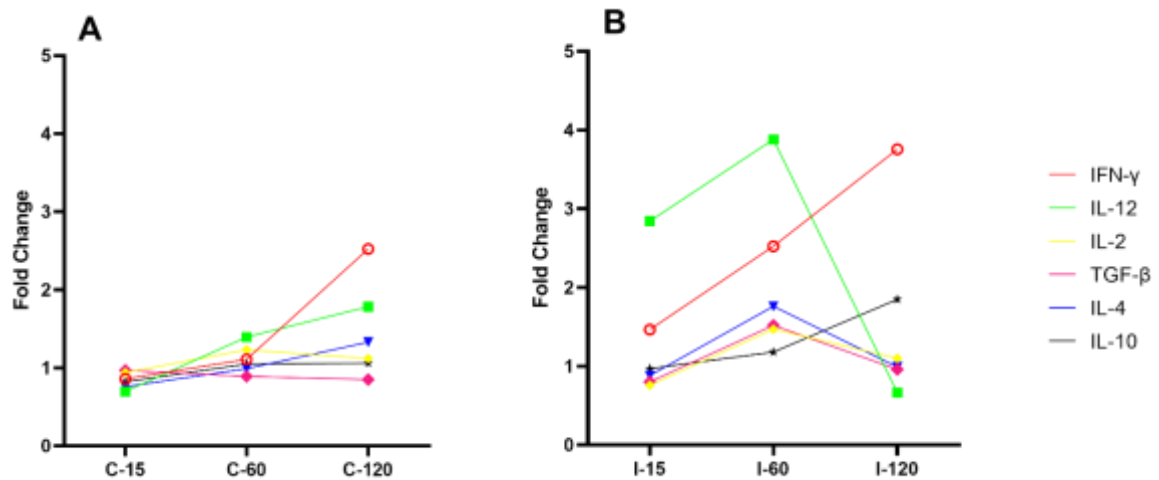
Figura 3- Expressão gênica relativa de IFN- γ no timo de hamsters com leishmaniose visceral.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Expressão relativa do gene IFN- γ em hamsters infectados (I) e controles (C) nos tempos de 15, 60 e 120 dias pós-infecção (DPI). Os resultados são apresentados como razão entre a média de expressão do gene-alvo e a média geométrica dos genes de referência GAPDH e HPRT-1. Cada ponto representa um animal, e as barras indicam a mediana e os quartis 25% e 75%. Diferenças estatisticamente significativas são indicadas (**p = 0,0079, teste de Mann-Whitney**). Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 4- Expressão gênica relativa de INF- γ , IL-12, IL-2, TGF- β , IL4 e IL-10 ao longo do tempo de infecção, no timo dos hamster infectados e não infectados.



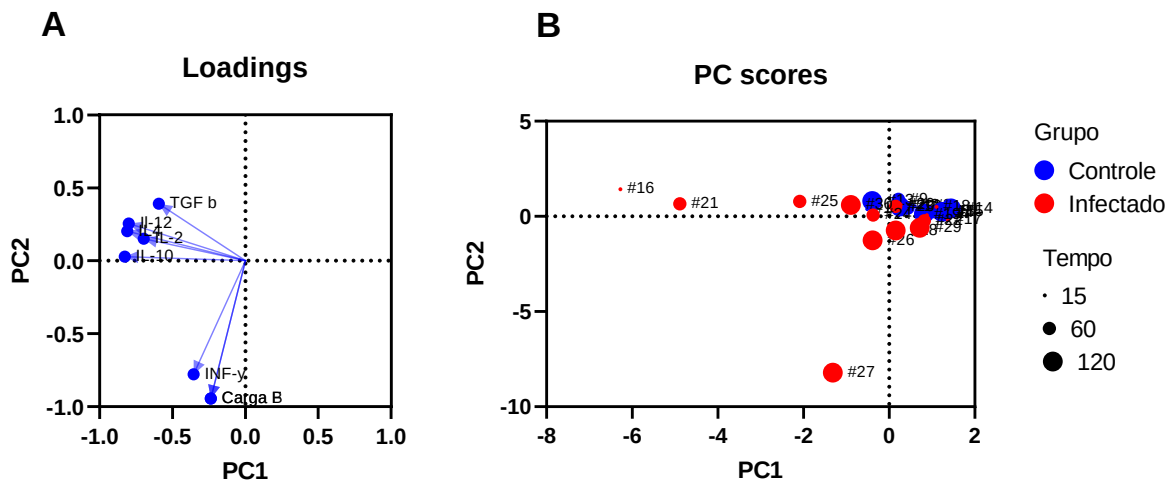
Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Expressão relativa das citocinas em hamsters infectados (*I*) e controles (*C*) nos tempos de 15, 60 e 120 dias pós-infecção (DPI). Os resultados são apresentados como razão entre a média de expressão do gene-alvo e a média geométrica dos genes de referência GAPDH e HPRT-1. Cada linha colorida representa uma citocina, e cada ponto indica a mediana do grupo. A- Grupo controle. B- Grupo infectado. Fonte: elaborado pelo autor. **P=0,0079- Mann Whitney.

Não houve diferença na expressão gênica relativa das demais citocinas, IL-2, TGF- β , IL4 e IL-10 (Tabela 4; Figura 4). Contudo, a expressão IL-4 e IL-10 foi mais proeminente nos infectados em comparação aos controles, em todos os tempos, principalmente aos 120 DPI e TGF- β estava levemente mais expresso nos hamster infectados aos 120 DPI.

Na análise dos componentes principais há uma separação parcial entre os grupos infectado e controle dados principalmente por PC1. A combinação de PC1 e PC2 explicam 71,72% da variabilidade das amostras, sendo que o IFN- γ e a carga parasitária do baço foram os principais fatores que levaram a variabilidade (Figura 5).

Figura 5- Figura 4. Análise de componentes principais (PCA) da expressão gênica relativa de INF- γ , IL-12, IL-2, TGF- β , IL4 e IL-10 ao longo do tempo de infecção, 15, 60 e 120 dias, no timo dos hamster infectados e não infectados.



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: A- (Loadings)- Mostra as cargas dos componentes principais (PC1 e PC2) para cada variável. B- Scores - Representa as amostras plotadas de acordo com os escores de PC1 e PC2. As amostras são codificadas por cores e rótulos: Pontos azuis: Grupo controle. Pontos vermelhos: Grupo infectado. O tamanho dos pontos reflete o "Tempo," com pontos pequenos, médios e grandes representando 15, 60 e 120 dias, respectivamente. Uma separação parcial entre os grupos infectado e controle foi observada, sendo explicada principalmente por PC1 e PC2, que, em conjunto, correspondem a 71,72% da variabilidade das amostras, com influência do IFN- γ e da carga parasitária do baço.

5 DISCUSSÃO

Alterações morfológicas, na população de células e na expressão de citocinas decorrentes da LV já foram descritas no timo de camundongos (CUERVO-ESCOBAR et al., 2014; LOSADA-BARRAGÁN et al., 2017, 2019). Estas podem interferir na maturação e desenvolvimento dos linfócitos T, e consequentemente na resposta imune durante o curso da infecção. O desenvolvimento e maturação dos linfócitos T no timo é dependente, pelo menos em parte, da ação de citocinas. Neste estudo, avaliamos a expressão gênica de citocinas no timo de hamsters em diferentes tempos pós-infecção experimental com *L. infantum* (MHOM/BR/1972/BH46).

Hamsters sírios são altamente suscetíveis à infecção por *Leishmania*, desenvolvendo severas alterações imunológicas e orgânicas. A expressão proeminente de mRNAs de citocinas Th1 como IFN- γ e IL-12, bem como Th2, IL-10 e TGF- β ocorrem dependendo do órgão avaliado e a fase da infecção, assim como em outras espécies a resposta imune parece ser órgão específica (MELBY et al., 2001). Este é o primeiro estudo que pesquisa o perfil de citocinas em timo de hamsters infectados.

A infecção por *L. infantum* levou a variação da expressão genética de citocinas no timo, e essa variabilidade foi observada principalmente no IFN- γ (Figura 5), que teve sua expressão gênica relativa aumentada ($p < 0,05$) aos 120 DPI (Figura 3 C). YOUNG et al., (1997)

descreveram uma maior expressão de IFN- γ no timo em camundongos transgênicos que resultou em aumento no número de timócitos SP e redução proporcional de DP. Essa alteração na quantidade de timócitos também foi descrita no timo de camundongos experimentalmente infectados com *L. infantum*, possivelmente associada a alterações na migração dos timócitos que resultam em maturação acelerada (CUERVO-ESCOBAR et al., 2014; LOSADA-BARRAGÁN et al., 2017).

O aumento de linfócitos SP, no entanto, também pode decorrer de problemas na emigração tímica dos linfócitos. Hamsters sírios infectado com *L. infantum* apresentam redução de linfócitos no sangue, e os efeitos do INF- γ sobre a emigração dos timócitos pode estar relacionada a esta alteração (DORES MOREIRA et al., 2016). Além disso, no estudo de YOUNG et al., (1997), citado anteriormente, o aumento SP no timo ocorreu paralelamente a uma redução de linfócitos T no baço.

As alterações na maturação e emigração de linfócitos decorrentes de altas concentrações de IFN- γ podem ser explicadas pela redução da expressão de proteínas da matriz extracelular (ECM) no timo, tais como fibronectina e laminina e seus receptores, VLA-5 e VLA-6. Proteínas como fibronectina e laminina tem importante papel nos eventos de adesão e desprendimento entre os timócitos em maturação com outras células do microambiente tímico (GAMEIRO et al., 2010; UTSUMI et al., 1991, LAGROTA-CÂNDIDO et al., 1996; LANNES-VIEIRA, J. et al., 1991). Portanto, o aumento da expressão genica de IFN- γ observado em nosso trabalho pode resultar em alterações na adesão dos timócitos às células epiteliais tímicas (TECs) e afetar os processos de maturação e emigração como sugerido por CUERVO-ESCOBAR et al. (2014) e LOSADA-BARRAGÁN et al. (2017).

A maior expressão genica do IFN- γ também pode influenciar na seleção de linfócitos. Esta citocina aumenta a expressão de MHC, e este está relacionado as etapas de seleção negativa e positivas, que tem a apoptose como mecanismo de eliminação das células que não atendem aos requisitos de cada etapa de seleção (LANNES-VIEIRA, 1991; PATEL et al., 1995). O aumento de apoptose em resposta ao aumento de INF- γ cria espaço no timo o que pode levar a reentrada de linfócitos maduros polarizados, como já descrito em outras infecções que ativam a resposta Th1, tais como infecção por *Candida albicans* e *Trypanosoma cruzi* (HODGE et al., 2012). Esse fluxo de linfócitos polarizados pode comprometer sua função do timo durante a infecção, além de influenciar a polarização de timócitos em diferenciação. Como consequência, os linfócitos podem deixar o timo com um viés Th1 ou Th2, impactando a resposta imune periférica (RODRIGUEZ-GALÁN et al., 2005).

6 CONCLUSÃO

Este estudo evidenciou a complexidade da resposta imune no timo de hamsters sírios infectados por *Leishmania infantum*, destacando a interação entre a expressão gênica de citocinas e a maturação dos linfócitos T. A resposta Th1 foi predominante no timo, com aumento da expressão gênica de IFN- γ o que afeta o microambiente tímico e pode impactar na maturação dos linfócitos T que são liberados, afetando a resposta imune periférica. Estes resultados contribuem para o entendimento da participação do timo na resposta imune da leishmaniose visceral e abrem possibilidades para pesquisas futuras.

REFERÊNCIAS

- ALMAWI, W. Y.; HESS, D. A.; RIEDER, M. J. Multiplicity of glucocorticoid action in inhibiting allograft rejection. *Cell Transplantation*, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 511–523, 1998. Disponível em: Multiplicity of glucocorticoid action in inhibiting allograft rejection - ScienceDirect Acesso em: 24 out. 2024.
- ANDERSON, G.; JENKINSON, E. J. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nature Reviews Immunology* 2001 1:1, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 31–40, 2001a. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri35095500>. Acesso em: 28 dez. 2024.
- ANDERSON, G.; JENKINSON, E. J. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nature Reviews Immunology*, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 31–40, 2001b.
- 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: 2 out. 2020.
- ANSARI, N. A.; KUMAR, R.; GAUTAM, S.; NYLÉN, S.; SINGH, O. P.; SUNDAR, S.; SACKS, D. IL-27 and IL-21 Are Associated with T Cell IL-10 Responses in Human Visceral Leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, [s. l.], v. 186, n. 7, p. 3977–3985, 2011. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1003588>. Acesso em: 8 nov. 2024.
- BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis - 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. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3024.2006.00840.x>. Acesso em: 24 out. 2024.
- BAYER, A. L.; YU, A.; MALEK, T. R. Function of the IL-2R for Thymic and Peripheral CD4+CD25+ Foxp3+ T Regulatory Cells. *The Journal of Immunology*, [s. l.], v. 178, n. 7, p. 4062–4071, 2007. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4062>. Acesso em: 9 jul. 2023.
- BECKER, I.; SALAIZA, N.; AGUIRRE, M.; DELGADO, J.; CARRILLO-CARRASCO, N.; KOBEH, L. G.; RUIZ, A.; CERVANTES, R.; TORRES, A. P.; CABRERA, N.; GONZÁLEZ, A.; MALDONADO, C.; ISIBASI, A. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Molecular and Biochemical Parasitology*, [s. l.], v. 130, n. 2, p. 65–74, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12946842/>. Acesso em: 9 jan. 2025.
- BEVAN, M. J.; FINK, P. J. The Influence of Thymus H-2 Antigens on the Specificity of Maturing Killer and Helper Cells. *Immunological Reviews*, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 3–19, 1978. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1600-065X.1978.tb00256.x>. Acesso em: 24 out. 2024.
- BINHAZIM, A. A.; CHAPMAN, W. L.; SHIN, S. S.; HANSON, W. L. Determination of virulence and pathogenesis of a canine strain of *Leishmania leishmania infantum* in hamsters

and dogs. *American Journal of Veterinary Research*, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 113–121, 1993. Disponível em: <https://avmajournals.avma.org/view/journals/ajvr/54/1/ajvr.1993.54.01.113.xml>. Acesso em: 10 nov. 2024.

BLEUL, C. C.; BOEHM, T. Chemokines define distinct microenvironments in the developing thymus. *European journal of immunology*, [s. l.], v. 30, p. 3371–3379, 2000. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions>. Acesso em: 9 jan. 2025.

BOGDAN, C. Macrophages as host, effector and immunoregulatory cells in leishmaniasis: Impact of tissue micro-environment and metabolism. *Cytokine: X*, [s. l.], v. 2, n. 4, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33604563/>. Acesso em: 6 nov. 2024.

BOLD, T. D.; ERNST, J. D. CD4⁺ T Cell-Dependent IFN- γ Production by CD8⁺ Effector T Cells in Mycobacterium tuberculosis Infection. *The Journal of Immunology*, [s. l.], v. 189, n. 5, p. 2530–2536, 2012. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1200994>. Acesso em: 24 out. 2024.

BUNN, P. T.; MONTES DE OCA, M.; DE LABASTIDA RIVERA, F.; KUMAR, R.; NG, S. S.; EDWARDS, C. L.; FALEIRO, R. J.; SHEEL, M.; AMANTE, F. H.; FRAME, T. C. M.; MULLER, W.; HAQUE, A.; UZONNA, J. E.; HILL, G. R.; ENGWERDA, C. R. Distinct Roles for CD4⁺ Foxp3⁺ Regulatory T Cells and IL-10-Mediated Immunoregulatory Mechanisms during Experimental Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania donovani*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, [s. l.], v. 201, n. 11, p. 3362–3372, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30355785/>. Acesso em: 8 nov. 2024.

BURCHILL, M. A.; YANG, J.; VOGTENHUBER, C.; BLAZAR, B. R.; FARRAR, M. A. IL-2 Receptor β -Dependent STAT5 Activation Is Required for the Development of Foxp3⁺ Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, [s. l.], v. 178, n. 1, p. 280–290, 2007. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.178.1.280>. Acesso em: 17 dez. 2024.

CALDAS, A.; FAVALI, C.; AQUINO, D.; VINHAS, V.; VAN WEYENBERGH, J.; BRODSKY, C.; COSTA, J.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Balance of IL-10 and interferon- γ plasma levels in human visceral leishmaniasis: Implications in the pathogenesis. *BMC Infectious Diseases*, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 1–9, 2005. Disponível em: <https://link.springer.com/articles/10.1186/1471-2334-5-113>. Acesso em: 9 jan. 2025.

CARPENTER, A. C.; BOSSELUT, R. Decision checkpoints in the thymus. *Nature Immunology* 2010 11:8, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 666–673, 2010. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ni.1887>. Acesso em: 24 out. 2024.

CARRADA, G.; CAÑEDA, C.; SALAIZA, N.; DELGADO, J.; RUIZ, A.; SANCHEZ, B.; GUTIÉRREZ-KOBEH, L.; AGUIRRE, M.; BECKER, I. Monocyte cytokine and costimulatory molecule expression in patients infected with *Leishmania mexicana*. *Parasite immunology*, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 117–126, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17266739/>. Acesso em: 9 jan. 2025.

CARRAMOLINO, L.; ZABALLOS, A.; KREMER, L.; VILLARES, R.; MARTÍN, P.; ARDAVÍN, C.; MARTÍNEZ-A, C.; MÁRQUEZ, G. Expression of CCR9 β -chemokine receptor is modulated in thymocyte differentiation and is selectively maintained in CD8⁺ T

cells from secondary lymphoid organs. *Blood*, [s. l.], v. 97, n. 4, p. 850–857, 2001. Disponível em: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/97/4/850/1671138/h8040100850.pdf>. Acesso em: 9 jan. 2025.

CHEN, W. J.; JIN, W.; HARDEGEN, N.; LEI, K. J.; LI, L.; MARINOS, N.; MCGRADY, G.; WAHL, S. M. Conversion of Peripheral CD4+CD25– Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *The Journal of Experimental Medicine*, [s. l.], v. 198, n. 12, p. 1875, 2003. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2194145/>. Acesso em: 8 nov. 2024.

CONCEA. RESOLUÇÃO NORMATIVA No 13, DE 20 DE SETEMBRO DE 2013 - Imprensa Nacional. [S. l.: s. n.], 2013. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/31061978/do1-2013-09-26-resolucao-normativa-n-13-de-20-de-setembro-de-2013-31061974. Acesso em: 20 mar. 2022.

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.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, [s. l.], v. 95, n. 3, p. 239–243, 2001.

DEVAUD, C.; DARCY, P. K.; KERSHAW, M. H. Foxp3 expression in T regulatory cells and other cell lineages. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, [s. l.], v. 63, n. 9, p. 869–876, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00262-014-1581-4>. Acesso em: 31 out. 2024.

DOMÍNGUEZ-ASENJO, B.; GUTIÉRREZ-CORBO, C.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; IBORRA, S.; BALAÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M. Bioluminescent Imaging Identifies Thymus, As Overlooked Colonized Organ, in a Chronic Model of *Leishmania donovani* Mouse Visceral Leishmaniasis. *ACS Infectious Diseases*, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 871–883, 2021. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsinfecdis.0c00864>. Acesso em: 21 fev. 2022.

DORES MOREIRA, N. Das; VITORIANO-SOUZA, J.; ROATT, B. M.; DE ABREU VIEIRA, P. M.; COURA-VITAL, W.; DE OLIVEIRA CARDOSO, J. M.; REZENDE, M. T.; KER, H. G.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; REIS, A. B. Clinical, hematological and biochemical alterations in hamster (*Mesocricetus auratus*) experimentally infected with *Leishmania infantum* through different routes of inoculation. *Parasites & vectors*, [s. l.], v. 9, n. 1, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27030128/>. Acesso em: 8 nov. 2024.

DUIJVESTIJN, A. M.; HOEFSEMIT, 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: 30 ago. 2020.

ELTOUM, I. A.; ZIJLSTRA, E. E.; ALI, M. S.; GHALIB, H. W.; SATTI, M. M. H.; ELTOUM, B.; EL- HASSAN, A. M. Congenital kala-azar and leishmaniasis in the placenta. *The American*

Journal of Tropical Medicine and Hygiene, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 57–62, 1992. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/1536385>. Acesso em: 31 out. 2024.

ENGWERDA, C. R.; ATO, M.; KAYE, P. M. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. [S. l.: s. n.], 2004. Disponível em: Acesso em: 22 set. 2020.

FEUERER, M.; HILL, J. A.; MATHIS, D.; BENOIST, C. Foxp3⁺ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nature Immunology* 2009 10:7, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 689–695, 2009. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ni.1760>. Acesso em: 31 out. 2024.

GAMEIRO, J.; NAGIB, P.; VERINAUD, L. The thymus microenvironment in regulating thymocyte differentiation. *Cell Adhesion & Migration*, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 382–390, 2010. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cam.4.3.11789>. Acesso em: 23 set. 2024.

GODFREY, D. I.; KENNEDY, J.; GATELY, M. K.; HAKIMI, J.; HUBBARD, B. R.; ZLOTNIK, A. IL-12 influences intrathymic T cell development. *The Journal of Immunology*, [s. l.], v. 152, n. 6, p. 2729–2735, 1994. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.152.6.2729>. Acesso em: 7 jul. 2023.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. [S. l.]: Associacao Brasileira de Divulgacao Cientifica, 2004. Disponível em: Acesso em: 22 set. 2020.

GROUNDY, A.; ROMANO, A.; LIMA, A. P. C. A.; MOTTRAM, J. C.; MYBURGH, E. Inhibitor of serine peptidase 2 enhances *Leishmania major* survival in the skin through control of monocytes and monocyte-derived cells. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 1315–1327, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29097502/>. Acesso em: 6 nov. 2024.

GRAY, D. H. D.; UENO, T.; CHIDGEY, A. P.; MALIN, M.; GOLDBERG, G. L.; TAKAHAMA, Y.; BOYD, R. L. Controlling the thymic microenvironment. *Current Opinion in Immunology*, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 137–143, 2005. Disponível em: Acesso em: 23 set. 2024.

GRUSBY, M. J.; JOHNSON, R. S.; PAPAIOANNOU, V. E.; GLIMCHER, L. H. Depletion of CD4⁺ T Cells in Major Histocompatibility Complex Class II-Deficient Mice. *Science*, [s. l.], v. 253, n. 5026, p. 1417–1420, 1991. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1910207>. Acesso em: 24 out. 2024.

GUPTA, R.; KUSHAWAHA, P. K.; SAMANT, M.; JAISWAL, A. K.; BAHARIA, R. K.; DUBE, A. Treatment of *Leishmania donovani*-infected hamsters with miltefosine: analysis of cytokine mRNA expression by real-time PCR, lymphoproliferation, nitrite production and antibody responses. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, [s. l.], v. 67, n. 2, p. 440–443, 2012. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkr485>. Acesso em: 10 mar. 2021.

HODGE, D. L.; REYNOLDS, D.; CERBÁN, F. M.; CORREA, S. G.; BAEZ, N. S.; YOUNG, H. A.; RODRIGUEZ-GALAN, M. C. MCP-1/CCR2 interactions direct migration of peripheral

B and T lymphocytes to the thymus during acute infectious/inflammatory processes. *European Journal of Immunology*, [s. l.], v. 42, n. 10, p. 2644–2654, 2012. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.201242408>. Acesso em: 3 jul. 2023.

HOGQUIST, K. A.; BALDWIN, T. A.; JAMESON, S. C. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nature Reviews Immunology* 2005 5:10, [s. l.], v. 5, n. 10, p. 772–782, 2005. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri1707>. Acesso em: 24 out. 2024.

IKAWA, T.; KAWAMOTO, H.; FUJIMOTO, S.; KATSURA, Y. Commitment of Common T/Natural Killer (Nk) Progenitors to Unipotent T and Nk Progenitors in the Murine Fetal Thymus Revealed by a Single Progenitor Assay. *Journal of Experimental Medicine*, [s. l.], v. 190, n. 11, p. 1617–1626, 1999. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1084/jem.190.11.1617>. Acesso em: 24 out. 2024.

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: <https://dx.doi.org/10.1084/jem.20022135>. Acesso em: 23 set. 2024.

JUSSIANI, G. G.; MARÇO, K. S.; BERTOLO, P. H. L.; DE OLIVEIRA VASCONCELOS, R.; MACHADO, G. F. Thymic changes due to leishmaniasis in dogs: An immunohistochemical study. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, [s. l.], v. 247, p. 110416, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165242722000368>. Acesso em: 28 mar. 2022.

KAMBAYASHI, T.; ASSARSSON, E.; LUKACHER, A. E.; LJUNGGREN, H.-G.; JENSEN, P. E. Memory CD8⁺ T Cells Provide an Early Source of IFN- γ . *The Journal of Immunology*, [s. l.], v. 170, n. 5, p. 2399–2408, 2003. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.170.5.2399>. Acesso em: 24 out. 2024.

KATTMAN, S. J.; LUKIN, K. R.; OH, J. Z.; BERG, R. E.; STAERZ, U. D. Maturation stage-dependent thymocyte responses to TCR engagement. *European Journal of Immunology*, [s. l.], v. 35, n. 7, p. 2051–2060, 2005. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.200425293>. Acesso em: 30 set. 2024.

KLEIN, L.; KYEWSKI, B.; ALLEN, P. M.; HOGQUIST, K. A. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nature Reviews Immunology* 2014 14:6, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 377–391, 2014. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri3667>. Acesso em: 24 out. 2024.

KUMAR, Ajay; DAS, S.; MANDAL, A.; VERMA, S.; ABHISHEK, K.; KUMAR, Ashish; KUMAR, V.; GHOSH, A. K.; DAS, P. Leishmania infection activates host mTOR for its survival by M2 macrophage polarization. *Parasite immunology*, [s. l.], v. 40, n. 11, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30187512/>. Acesso em: 6 nov. 2024.

KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, [s. l.], v. 3, n. AUG, 2012. Disponível em: Acesso em: 24 out. 2024.

KUMAR, R.; PANDEY, K.; SAHOO, G. C.; DAS, S.; DAS, V. N. R.; TOPNO, R. K.; DAS, P. Development of high efficacy peptide coated iron oxide nanoparticles encapsulated

amphotericin B drug delivery system against visceral leishmaniasis. *Materials Science and Engineering: C*, [s. l.], v. 75, p. 1465–1471, 2017. Disponível em: Acesso em: 31 out. 2024.

KUPANI, M.; PANDEY, R. K.; MEHROTRA, S. Neutrophils and Visceral Leishmaniasis: Impact on innate immune response and cross-talks with macrophages and dendritic cells. *Journal of Cellular Physiology*, [s. l.], v. 236, n. 4, p. 2255–2267, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcp.30029>. Acesso em: 31 out. 2024.

LAGROTA-CÂNDIDO, J. M.; VILLA-VERDE, D. M. S.; VANDERLEI, F. H.; SAVINO, W. Extracellular Matrix Components of the Mouse Thymus Microenvironment. V. Interferon- γ Modulates Thymic Epithelial Cell/Thymocyte Interactions via Extracellular Matrix Ligands and Receptors. *Cellular Immunology*, [s. l.], v. 170, n. 2, p. 235–244, 1996. Disponível em: Acesso em: 24 out. 2024.

LANNES-VIEIRA, J.; DARDENNE, M.; SAVINO, W. Extracellular matrix components of the mouse thymus microenvironment: ontogenetic studies and modulation by glucocorticoid hormones. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, [s. l.], v. 39, n. 11, p. 1539–1546, 1991. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1918928/>. Acesso em: 24 out. 2024.

LANNES-VIEIRA, Joseli; VAN DER MEIDE, P. H.; SAVINO, W. Extracellular matrix components of the mouse thymic microenvironment: II. In vitro modulation of basement membrane proteins by interferon- γ : Relationship with thymic epithelial cell proliferation. *Cellular Immunology*, [s. l.], v. 137, n. 2, p. 329–340, 1991. Disponível em: Acesso em: 10 jul. 2023.

LEE, K.; WON, H. Y.; BAE, M. A.; HONG, J. H.; HWANG, E. S. Spontaneous and aging-dependent development of arthritis in NADPH oxidase 2 deficiency through altered differentiation of CD11b⁺ and Th/Treg cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [s. l.], v. 108, n. 23, p. 9548–9553, 2011. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1012645108>. Acesso em: 31 out. 2024.

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.

LIU, Y.; ZHANG, P.; LI, J.; KULKARNI, A. B.; PERRUCHE, S.; CHEN, W. J. A critical function for TGF- β signaling in the development of natural CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nature Immunology* 2008 9:6, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 632–640, 2008. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ni.1607>. Acesso em: 31 out. 2024.

LORÍA-CERVERA, E. N.; ANDRADE-NARVAEZ, F. The role of monocytes/macrophages in *Leishmania* infection: A glance at the human response. *Acta tropica*, [s. l.], v. 207, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32222362/>. Acesso em: 6 nov. 2024.

LOSADA-BARRAGÁN, M.; UMANÃ-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: 17 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.

LÚDVÍKSSON, B. R.; EHRHARDT, R. O.; STROBER, W. Role of IL-12 in intrathymic negative selection. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), [s. l.], v. 163, n. 8, p. 4349–4359, 1999. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/163/8/4349>. Acesso em: 24 out. 2024.

MA, A.; PENA, J. C.; CHANG, B.; MARGOSIAN, E.; DAVIDSON, L.; ALT, F. W.; THOMPSON, C. B. Bclx regulates the survival of double-positive thymocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [s. l.], v. 92, n. 11, p. 4763–4767, 1995. Disponível em: <https://discovery.researcher.life/article/bclx-regulates-the-survival-of-double-positive-thymocytes/f1977c9d75db36ffba11099380b99bb1>. Acesso em: 23 set. 2024.

MALEK, T. R.; PORTER, B. O.; CODIAS, E. K.; SCIBELLI, P.; YU, A. Normal lymphoid homeostasis and lack of lethal autoimmunity in mice containing mature T cells with severely impaired IL-2 receptors. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), [s. l.], v. 164, n. 6, p. 2905–2914, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10706676/>. Acesso em: 24 out. 2024.

MALEK, T. R.; YU, A.; SCIBELLI, P.; LICHTENHELD, M. G.; CODIAS, E. K. Broad programming by IL-2 receptor signaling for extended growth to multiple cytokines and functional maturation of antigen-activated T cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), [s. l.], v. 166, n. 3, p. 1675–1683, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11160210/>. Acesso em: 24 out. 2024.

MALEK, T. R.; YU, A.; ZHU, L.; MATSUTANI, T.; ADEEGBE, D.; BAYER, A. L. IL-2 family of cytokines in T regulatory cell development and homeostasis. *Journal of Clinical Immunology*, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 635–639, 2008. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10875-008-9235-y>. Acesso em: 17 dez. 2024.

MARÇO, K. S. “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” Campus Araçatuba. [s. l.], 2020. Disponível em: Acesso em: 2 jan. 2025.

MARÇO, K. S.; DA SILVA BORÉGIO, J.; JUSSIANI, G. G.; DE SOUZA FERREIRA, L. F. E.; FLORES, G. V. A.; PACHECO, C. M. S.; LAURENTI, M. D.; MACHADO, G. F. Thymic alterations resulting from experimental visceral leishmaniasis in a Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, [s. l.], v. 257, p. 110558, 2023. Disponível em: Acesso em: 20 abr. 2023.

MCCARRON, M. J.; IRLA, M.; SERGÉ, A.; SOUDJA, S. M.; MARIE, J. C. Transforming Growth Factor-beta signaling in $\alpha\beta$ thymocytes promotes negative selection. *Nature*

communications, [s. l.], v. 10, n. 1, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31857584/>. Acesso em: 31 out. 2024.

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.

MELBY, P. C.; TRYON, V. V.; CHANDRASEKAR, B.; FREEMAN, G. L. Cloning of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) cytokine cDNAs and analysis of cytokine mRNA expression in experimental visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity*, [s. l.], v. 66, n. 5, p. 2135–2142, 1998. Disponível em: <http://iai.asm.org/>. Acesso em: 10 mar. 2021.

MENDES-DA-CRUZ, D. A.; SILVA-MONTEIRO, E.; VILLA-VERDE, D. M. S.; SMANIOTTO, S.; SAVINO, W. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *Journal of Leukocyte Biology*, [s. l.], v. 75, n. 6, p. 951–961, 2004.

MICHIE, A. M.; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, J. C. Regulation of thymocyte differentiation: pre-TCR signals and β -selection. *Seminars in Immunology*, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 311–323, 2002. Disponível em: Acesso em: 24 out. 2024.

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: 10 nov. 2020.

MULLA, S. A.; OSMAN HUSSEIN, 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.], 2016. Disponível em: www.ijbpr.com. Acesso em: 6 nov. 2020.

MUÑOZ, J. J.; ZAPATA, A. G. Thymus Ontogeny and Development. *Thymus Transcriptome and Cell Biology*, [s. l.], p. 19–34, 2019. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-12040-5_2. Acesso em: 23 set. 2024.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. Em: *LANCET*, 2005, [s. l.], . Anais [...]. [S. l.: s. n.], 2005. p. 1561–1577. Disponível em: Acesso em: 22 set. 2020.

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 leishmaniosis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. [S. l.]: BioMed Central, 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/articles/10.1186/1297-9716-42-39>. Acesso em: 22 set. 2020.

NORMENT, A. M.; BOGATZKI, L. Y.; KLINGER, M.; OJALA, E. W.; BEVAN, M. J.; KAY, R. J. Transgenic expression of RasGRP1 induces the maturation of double-negative thymocytes and enhances the production of CD8 single-positive thymocytes. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), [s. l.], v. 170, n. 3, p. 1141–1149, 2003. Disponível em: <https://discovery.researcher.life/article/transgenic-expression-of-rasgrp1-induces-the->

maturation-of-double-negative-thymocytes-and-enhances-the-production-of-cd8-single-positive-thymocytes/b8c38035762730bbb42f8b9279e26d19. Acesso em: 23 set. 2024.

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

NYLÉN, S.; MAURYA, R.; EIDSMO, L.; DAS MANANDHAR, K.; SUNDAR, S.; SACKS, D. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. *Journal of Experimental Medicine*, [s. l.], v. 204, n. 4, p. 805–817, 2007. Disponível em: Acesso em: 17 fev. 2022.

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.

PAHO. Leishmaniasis. [S. l.: s. n.], 2024.

PATEL, D. D.; WHICHARD, L. P.; RADCLIFF, G.; DENNING, S. M.; HAYNES, B. F. Characterization of human thymic epithelial cell surface antigens: phenotypic similarity of thymic epithelial cells to epidermal keratinocytes. *Journal of clinical immunology*, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 80–92, 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7559912/>. Acesso em: 23 set. 2024.

PEARSE, G. Histopathology of the Thymus. *Toxicologic Pathology*, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 515–547, 2006a. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1080/01926230600978458>. Acesso em: 25 out. 2020.

PEARSE, G. Normal Structure, Function and Histology of the Thymus. *Toxicologic Pathology*, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 504–514, 2006b. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1080/01926230600865549>. Acesso em: 4 set. 2020.

PEREZ, L. E.; CHANDRASEKAR, B.; SALDARRIAGA, O. A.; ZHAO, W.; ARTEAGA, L. T.; TRAVI, B. L.; MELBY, P. C. Reduced Nitric Oxide Synthase 2 (NOS2) Promoter Activity in the Syrian Hamster Renders the Animal Functionally Deficient in NOS2 Activity and Unable to Control an Intracellular Pathogen. *The Journal of Immunology*, [s. l.], v. 176, n. 9, p. 5519–5528, 2006. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.176.9.5519>. Acesso em: 9 jan. 2025.

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: 6 nov. 2020.

PESCHON, J. J.; MORRISSEY, P. J.; GRABSTEIN, K. H.; RAMSDELL, F. J.; MARASKOVSKY, E.; GLINIAK, B. C.; PARK, L. S.; ZIEGLER, S. F.; WILLIAMS, D. E.; WARE, C. B.; MEYER, J. D.; DAVISON, B. L. Early lymphocyte expansion is severely

impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine*, [s. l.], v. 180, n. 5, p. 1955–1960, 1994. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1084/jem.180.5.1955>. Acesso em: 23 set. 2024.

PETRIE, H. T. Role of thymic organ structure and stromal composition in steady-state postnatal T-cell production. *Immunological reviews*, [s. l.], v. 189, p. 8–20, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12445261/>. Acesso em: 24 out. 2024.

PFAFFL, M. W. Quantification strategies in real-time PCR. [s. l.], 2004. Disponível em: Acesso em: 15 maio 2023.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infection and immunity*, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 229–235, 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8262632/>. Acesso em: 9 jan. 2025.

PITTA, M. G. R.; ROMANO, A.; CABANTOUS, S.; HENRI, S.; HAMMAD, A.; KOURIBA, B.; ARGIRO, L.; EL KHEIR, M.; BUCHETON, B.; MARY, C.; EL-SAFI, S. H.; DESSEIN, A. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. *Journal of Clinical Investigation*, [s. l.], v. 119, n. 8, p. 2379–2387, 2009. Disponível em: <http://www.jci.org>. Acesso em: 2 out. 2020.

PORRITT, H. E.; RUMFELT, L. L.; TABRIZIFARD, S.; SCHMITT, T. M.; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, J. C.; PETRIE, H. T. Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages. *Immunity*, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 735–745, 2004. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S1074761304001347/fulltext>. Acesso em: 24 out. 2024.

RADTKE, F.; WILSON, A.; STARK, G.; BAUER, M.; VAN MEERWIJK, J.; MACDONALD, H. R.; AGUET, M. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity*, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 547–558, 1999. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S1074761300800540/fulltext>. Acesso em: 23 set. 2024.

RIBEIRO-ROMÃO, R. P.; MOREIRA, O. C.; OSORIO, E. Y.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; GOMES-SILVA, A.; VALVERDE, J. G.; PIRMEZ, C.; DA-CRUZ, A. M.; PINTO, E. F. Comparative evaluation of lesion development, tissue damage, and cytokine expression in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected by inocula with different *Leishmania (Viannia) braziliensis* concentrations. *Infection and Immunity*, [s. l.], v. 82, n. 12, p. 5203–5213, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128>. Acesso em: 10 mar. 2021.

RODRIGUEZ-GALÁN, M. C.; BREM, J. H.; FARR, A.; YOUNG, H. A. Synergistic Effect of IL-2, IL-12, and IL-18 on Thymocyte Apoptosis and Th1/Th2 Cytokine Expression. *The Journal of Immunology*, [s. l.], v. 174, n. 5, p. 2796–2804, 2005. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.174.5.2796>. Acesso em: 14 out. 2024.

ROULEAU, M.; COTTREZ, F.; BIGLER, M.; ANTONENKO, S.; CARBALLIDO, J. M.; ZLOTNIK, A.; RONCAROLO, M.-G.; GROUX, H. IL-10 transgenic mice present a defect in T cell development reminiscent of SCID patients. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, [s. l.], v. 163, n. 3, p. 1420–1427, 1999. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/163/3/1420>. Acesso em: 3 jul. 2023.

SASAKI, K.; TAKADA, K.; OHTE, Y.; KONDO, H.; SORIMACHI, H.; TANAKA, K.; TAKAHAMA, Y.; MURATA, S. Thymoproteasomes produce unique peptide motifs for positive selection of CD8⁺ T cells. *Nature Communications* 2015 6:1, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1–10, 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncomms8484>. Acesso em: 1 out. 2024.

SCHRODER, K.; HERTZOG, P. J.; RAVASI, T.; HUME, D. A. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, [s. l.], v. 75, n. 2, p. 163–189, 2004. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1189/jlb.0603252>. Acesso em: 24 out. 2024.

SHARMA, S.; SRIVASTVA, S.; DAVIS, R. E.; SINGH, S. S.; KUMAR, R.; NYLÉN, S.; WILSON, M. E.; SUNDAR, S. The Phenotype of Circulating Neutrophils during Visceral Leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, [s. l.], v. 97, n. 3, p. 767, 2017. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5590568/>. Acesso em: 6 nov. 2024.

SHEN, H.; YIN, C.; GAO, Y. N.; PEI, X. Y.; SUN, X. Y.; GE, Q.; WANG, W.; ZHANG, Y. Recirculating Th2 cells induce severe thymic dysfunction via IL-4/STAT6 signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, [s. l.], v. 501, n. 1, p. 320–327, 2018. Disponível em: Acesso em: 24 out. 2024.

SHEVACH, E. M.; DAVIDSON, T. S.; HUTER, E. N.; DIPAOLO, R. A.; ANDERSSON, J. Role of TGF- β in the induction of Foxp3 expression and T regulatory cell function. *Journal of Clinical Immunology*, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 640–646, 2008. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10875-008-9240-1>. Acesso em: 31 out. 2024.

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: 22 set. 2020.

SINGH, N.; MISHRA, B. B.; BAJPAI, S.; SINGH, R. K.; TIWARI, V. K. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 18–45, 2014. Disponível em: Acesso em: 6 nov. 2024.

STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. [S. l.: s. n.], 2007. Disponível em: Acesso em: 22 set. 2020.

STRITESKY, G. L.; XING, Y.; ERICKSON, J. R.; KALEKAR, L. A.; WANG, X.; MUELLER, D. L.; JAMESON, S. C.; HOGQUIST, K. A. Murine thymic selection quantified using a unique method to capture deleted T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [s. l.], v. 110, n. 12, p. 4679–4684, 2013. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1217532110>. Acesso em: 1 out. 2024.

STUTMAN, O. Two main features of T-cell development: thymus traffic and postthymic maturation. [S. l.]: Springer, Boston, MA, 1977. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4684-3054-7_1. Acesso em: 25 set. 2020.

TAKAHAMA, Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nature Reviews Immunology* 2006 6:2, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 127–135, 2006. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri1781>. Acesso em: 23 set. 2024.

TAKAHAMA, Y.; LETTERIO, J. J.; SUZUKI, H.; FARR, A. G.; SINGER, A. Early progression of thymocytes along the CD4/CD8 developmental pathway is regulated by a subset of thymic epithelial cells expressing transforming growth factor beta. *Journal of Experimental Medicine*, [s. l.], v. 179, n. 5, p. 1495–1506, 1994. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1084/jem.179.5.1495>. Acesso em: 31 out. 2024.

TEIXEIRA, A. I. P.; SILVA, D. M.; DE FREITAS, L. R. S.; ROMERO, G. A. S. A cross-sectional approach including dog owner characteristics as predictors of visceral leishmaniasis infection in dogs. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, [s. l.], v. 115, n. 1, 2020a. Disponível em: <https://orcid.org/0000-0003-1425-926X>. Acesso em: 29 ago. 2020.

TEIXEIRA, A. I. P.; SILVA, D. M.; DE FREITAS, L. R. S.; ROMERO, G. A. S. A cross-sectional approach including dog owner characteristics as predictors of visceral leishmaniasis infection in dogs. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, [s. l.], v. 115, n. 1, 2020b. Disponível em: <https://orcid.org/0000-0003-1425-926X>. Acesso em: 3 jun. 2021.

THAPA, P.; FARBER, D. L. The Role of the Thymus in the Immune Response. *Thoracic surgery clinics*, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 123–131, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30927993/>. Acesso em: 23 set. 2024.

TOMINAGA, K.; YOSHIMOTO, T.; TORIGOE, K.; KURLMOTO, M.; MATSUI, K.; HADA, T.; OKAMURA, H.; NAKANISHI, K. IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells. *International immunology*, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 151–160, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10653850/>. Acesso em: 24 out. 2024.

UTSUMI, K.; SAWADA, M.; NARUMIYA, S.; NAGAMINE, J.; SAKATA, T.; IWAGAMI, S.; KITA, Y.; TERAOKA, H.; HIRANO, H.; OGATA, M.; HAMAOKA, T.; FUJIWARA, H. Adhesion of immature thymocytes to thymic stromal cells through fibronectin molecules and its significance for the induction of thymocyte differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [s. l.], v. 88, n. 13, p. 5685–5689, 1991. Disponível em: <https://www.pnas.org>. Acesso em: 13 jan. 2025.

VOLPEDO, G.; PACHECO-FERNANDEZ, T.; BHATTACHARYA, P.; OLJUSKIN, T.; DEY, R.; GANNAVARAM, S.; SATOSKAR, A. R.; NAKHASI, H. L. Determinants of Innate Immunity in Visceral Leishmaniasis and Their Implication in Vaccine Development. *Frontiers in immunology*, [s. l.], v. 12, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34712235/>. Acesso em: 6 nov. 2024.

WHO. WHO, [s. l.], 2024. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>. Acesso em: 21 set. 2020.

YANG, C. W.; UNANUE, E. R. Neutrophils control the magnitude and spread of the immune response in a thromboxane A2-mediated process. *Journal of Experimental Medicine*, [s. l.], v. 210, n. 2, p. 375–387, 2013. Disponível em:

<https://profiles.wustl.edu/en/publications/neutrophils-control-the-magnitude-and-spread-of-the-immune-respon>. Acesso em: 31 out. 2024.

YARILIN, A.; BELYAKOV, I. Cytokines in the Thymus: Production and Biological Effects. *Current Medicinal Chemistry*, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 447–464, 2005.

YOUNG, H. A.; KLINMAN, D. M.; REYNOLDS, D. A.; GRZEGORZEWSKI, K. J.; NII, A.; WARD, J. M.; WINKLER-PICKETT, R. T.; ORTALDO, J. R.; KENNY, J. J.; KOMSCHLIES, K. L. Bone Marrow and Thymus Expression of Interferon- γ Results in Severe B-Cell Lineage Reduction, T-Cell Lineage Alterations, and Hematopoietic Progenitor Deficiencies. *Blood*, [s. l.], v. 89, n. 2, p. 583–595, 1997. Disponível em: Acesso em: 14 jul. 2023.

ZIJLSTRA, E. E. The immunology of post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). *Parasites & vectors*, [s. l.], v. 9, n. 1, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27553063/>. Acesso em: 31 out. 2024.

ZINKERNAGEL, R. M. The thymus: Its influence on recognition of “self major histocompatibility antigens” by T cells and consequences for reconstitution of immunodeficiency. *Springer Seminars in Immunopathology*, [s. l.], v. 1, n. 4, p. 405–415, 1978. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01857313>. Acesso em: 24 out. 2024.