Ana Paula Freitas do Rosário

***Análise dos compartimentos de linfócitos
T e B de memória em animais tratados e
não tratados com cloroquina durante a
infecção pelo Plasmodium chabaudi AS***

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
a obtenção do título de Doutor em Ciências
(Imunologia).

**São Paulo
2008**

Ana Paula Freitas do Rosário

***Análise dos compartimentos de linfócitos
T e B de memória em animais tratados e
não tratados com cloroquina durante a
infecção pelo Plasmodium chabaudi AS***

**São Paulo
2008**

Ana Paula Freitas do Rosário

***Análise dos compartimentos de linfócitos
T e B de memória em animais tratados e
não tratados com cloroquina durante a
infecção pelo Plasmodium chabaudi AS***

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Imunologia).

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Profa. Dra. Maria Regina D'Império Lima

**São Paulo
2008**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Freitas do Rosário, Ana Paula.

Análise dos compartimentos de linfócitos T e B de memória em animais tratados e não tratados com cloroquina durante a infecção pelo *Plasmodium chabaudi* AS / Ana Paula Freitas do Rosário. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Maria Regina D'Império Lima.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunologia das Parasitoses - Malária.

Versão do título para o inglês: Analysis of T-and B-cell memory after untreated and drug treated blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria.

Descritores: 1. Malária 2. *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS 3. Linfócitos T 4. Resposta Imune de Memória 5. Anticorpos protetores 6. Resposta proliferativa específica I. Lima, Maria Regina D'Império II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia. III. Título.

ICB/SBIB032/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ana Paula Freitas do Rosário.

Título da Tese: Análise dos compartimentos de linfócitos T e B de memória em animais tratados e não tratados com cloroquina durante a infecção pelo *Plasmodium chabaudi* AS .

Orientador(a): Maria Regina D'Império Lima.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **031** nas fls. **3** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade Profa. Dra. Maria Regina D'Imperio Lima, Coordenadora da Linha de Pesquisa: "*Estudo da resposta imune inata e adquirida contra o plasmodium chabaudi*" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Karina Ramalho Bortoluci Bastos, Rosa Maria Elias, Luiz Roberto Sardinha, Renato Barboza, Cláudia Augusta Zago, Ana Paula Freitas do Rosário, Sheyla Inês Castillo Méndez**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em **20.04.2004**.

São Paulo, 26 de abril de 2004

Profa. Dra. Marília C. Leite Seelaender
Coordenadora da CEEA

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091-7438 e-mail: ced@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL</p>
---	--

Decl. CEEA.036/2007

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 31/04/CEEA, sobre o Projeto: "*Estudo da resposta imune inata e adquirida contra o plasmodium chabaudi*", informo que sua validade será renovada por um período de três anos a contar de 20.04.07.

São Paulo, 29 de novembro de 2007

Atenciosamente,

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEEA
ICB/USP

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia das Parasitoses do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o auxílio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), projeto Número 04/02318-9.

Dedico esta tese

Aos Meus Pais, Helilton e Célia, e aos meus Irmãos, Rodrigo, Damaris e Pedro Henrique, pelo amor e apoio incondicional em todas as horas, e que mesmo separados pela distância, sempre torceram pelo meu sucesso e me incentivaram em todos os momentos;

Ao meu esposo, Nilton, pelo amor e companheirismo de sempre, mesmo quando isso significava ir comigo ao laboratório nos finais de semana, feriados, final de ano, etc, pra fazer parasitemias, coletar soros... Ou seja, obrigada pelo apoio e compreensão, e por estar ao meu lado em todos os momentos...

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por me sustentar em cada passo dessa caminhada.

À Profa. Maria Regina D'Império Lima, pela oportunidade de realizar este trabalho tão desafiador, mas ao mesmo tempo tão instigante. Poder trabalhar com você foi realmente gratificante, uma relação marcada pelo respeito, atenção, apoio e incentivo.

Ao Prof. José Maria Alvarez Mosig (Pepe) pelas grandes contribuições na realização deste trabalho e pelo convívio sempre agradável.

Aos professores Niels, Maurício Rodrigues e Hiro pelas relevantes sugestões apresentadas no exame de qualificação, que certamente contribuíram para melhorar este trabalho.

Aos professores do Departamento de Imunologia ICB/USP que contribuíram para minha formação.

À minha amiga Sandra pela amizade verdadeira, incentivo e colaboração em todos os momentos e experimentos.

Ao meu amigo Sérgio (mais conhecido como “colega”) pelas super dicas parasitárias!

À Cláudia e Sheyla pelo auxílio nos experimentos, pela amizade e companheirismo.

Aos meus amigos e técnicos, Rogério e Meire, que foram absolutamente importantes para que este trabalho pudesse ser realizado, e obrigada também pela atenção e carinho de sempre.

A todos os amigos do laboratório, Daniella, Luiz Sardinha, Christian, André, Fernando, Luis, Alexandra e Henrique, que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho e para a convivência tão agradável no laboratório.

À minha amiga Rosa, pela paciência e atenção, no início do meu estágio neste laboratório. A todos os amigos que já não estão neste laboratório, Karina, Marcos Grisotto (Pira), Cláudio, Renato, mas que certamente foram muito importantes no início dessa caminhada.

A todos os amigos do Departamento de Imunologia, pelo ambiente agradável de convívio.

Aos funcionários dos Biotérios de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia pela manutenção e fornecimento dos camundongos.

A todo o pessoal da secretaria do Departamento, Jotelma (Jô), Valéria, Amarildo, Eny, pela atenção, carinho e paciência.

Ao pessoal da portaria do ICB IV, que sempre me trataram com respeito e carinho durante todos esses anos de convivência.

“Porque d’Ele, e por Ele e para Ele são todas as coisas”

Romanos 11:36

RESUMO

Freitas do Rosário AP. Análise dos compartimentos de linfócitos T e B de memória em animais tratados e não tratados com cloroquina durante a infecção pelo *Plasmodium chabaudi* AS. [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Uma das características marcantes da malária é a intensa ativação policlonal dos linfócitos T e B esplênicos, induzida pelo parasita e a eliminação, por apoptose, de parte dessas células. Porém, a exposição limitada ao estágio eritrocítico do parasita parece induzir uma proeminente imunidade mediada por célula, associada à proteção dos linfócitos T da apoptose. Tendo isto em mente, este estudo teve como objetivo principal verificar a influência da carga parasitária na geração e manutenção dos linfócitos T e B de memória contra o *Plasmodium chabaudi chabaudi* cepa AS. Para isto, camundongos C57BL/6 infectados com 10^6 eritrócitos parasitados (EP) foram submetidos à infecção patente (não tratada) ou subpatente (controlada com doses não curativas de cloroquina sempre que a parasitemia alcançava 1%). Os esplenócitos foram analisados nos dias 20, 60, 120 e 200 após a infecção com relação à proliferação específica de linfócitos T, e de acordo com a expressão das moléculas de superfície CD4, CD8, CD62L, CD45RB, CD44, CD45R-B220 e IgG de superfície (sIgG). A parasitemia e o fenótipo dos esplenócitos também foram monitorados após o desafio com 10^8 PE. Com relação aos linfócitos T de memória, no dia 20 de infecção, as frequências de células $CD4^+$ efetoras/ativadas ($CD62L^{LOW}CD45RB^{LOW/HIGH}$) estavam significativamente aumentadas nos animais do grupo patente, revelando a maior ativação celular, enquanto os números absolutos de célula T ($CD4^+$ e $CD8^+$) esplênicas proliferando em resposta aos EP foram aproximadamente três vezes maior nos animais tratados, evidenciando a proteção dessas células em decorrência da exposição limitada ao parasita. No entanto, em ambos os grupos, esses parâmetros diminuíram rapidamente e se tornaram comparáveis aos dos controles no dia 200 de infecção. Os esplenócitos dos animais patente e subpatente estimulados pelos EP produziram, de forma semelhante, citocinas do tipo Th1 durante todo o período de análise, mas durante a fase inicial da infecção também observamos a presença de citocinas do padrão Th2. Com relação aos linfócitos B de memória, a frequência de células sIgG⁺ foi maior no dia 20 de infecção, quando 11% e 9% das células $CD45R^+$ dos animais patente e subpatente

estavam positivas, respectivamente. Para ambos os grupos, as maiores quantidades de anticorpos IgG2a específicos no soro foram observadas no dia 120 de infecção, porém, no dia 200, é possível observar uma queda significativa desse anticorpo apenas no soro dos animais patente. Assim, no dia 200 de infecção, os camundongos do grupo subpatente apresentam quantidades significativamente maiores de anticorpos IgG2a que reconhecem as formas intracelulares do parasita e a superfícies dos eritrócitos infectados. O monitoramento da parasitemia dos animais desafiados com 10^8 EP mostrou que a imunidade protetora declina com o passar do tempo e que apesar das maiores quantidades de anticorpos específicos nos animais subpatente, ambos os grupos apresentaram proteção semelhante. Através de experimentos de transferência adotiva das células de animais infectados por 200 dias para animais deficientes em CD28, observamos que a resposta humoral após o desafio é dependente de células T $CD4^+$. Além disso, verificamos que as células $CD45R^+$ de camundongos subpatente, quando transferidas para camundongos desprovidos de CD28, produzem maiores quantidades de anticorpos IgG2a e IgG1 específicos, em relação às células de camundongos patentes. Desta forma, podemos concluir, a partir deste trabalho, que a carga parasitária tem grande influência na resposta imune aguda ao *P. chabaudi* e afeta a geração e/ou manutenção das células B de memória. Além disso, de acordo com nossos dados, a perda da imunidade contra este parasita, pelo menos durante o período estudado, não parece ser influenciada pela carga parasitária da fase aguda, mas ela pode ser uma consequência do declínio progressivo da resposta das células T de memória que ocorre nos camundongos dos grupos patentes e subpatentes com o tempo de infecção.

Palavras-chave: Malária. *Plasmodium chabaudi chabaudi*. Resposta Imune de Memória.

ABSTRACT

Freitas do Rosário AP. Analysis of T- and B-cell memory after untreated and drug-treated blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria. [Ph. D. Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

One of the main characteristics of malaria is the intense polyclonal activation of splenic T and B lymphocytes induced by the parasite and the consequent elimination, through apoptosis, of part of these cells. However, the limited exposure to the blood-stage malaria seems to induce a prominent cellular immunity, associated with the protection of T lymphocytes from apoptosis. With this in mind, this study aimed to verify the influence of the parasite load in the generation and maintenance of memory T and B cells specific for *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. In order to evaluate this idea, C57BL/6 mice were infected with 10^6 parasitized red blood cells (pRBC) and submitted to a patent (untreated) or subpatent infection (controlled with sub-curative doses of chloroquine every time parasitemia reached 1%). Splenocytes from these mice were analyzed at 20, 60, 120 and 200 days after infection, regarding the pRBC-specific T cell proliferation and the expression of surface molecules, as CD4, CD8, CD62L, CD45RB, CD44, CD45R-B220 and IgG. The parasitemia and the splenocyte phenotype were also monitored after the challenge with 10^8 pRBC. Regarding T cell memory, at day 20 of infection, the frequencies of effector/activated CD4⁺ T cells (CD62L^{LOW}CD45RB^{LOW/HIGH}) were significantly increased in animals from the patent group, which was strictly linked with the highest cellular activation observed in these animals. On the other hand, the total numbers of pRBC-proliferating T (CD4⁺ and CD8⁺) cells per spleen were approximately 3-fold increased in subpatent animals, indicating that these cells were protected from apoptosis as a result of the limited exposure to the parasite. However, in both groups, these parameters decreased to values similar to those in controls at day 200. The splenocytes from both groups produced Th1 cytokines in response to pRBC in all times of analysis, but at the early phase of infection, Th2 cytokines were also observed, but without differences between the infected groups. Regarding memory B cells, the frequency of sIgG⁺ cells was increased at day 20 of infection, when 11% and 9% of CD45R⁺ cells from patent and subpatent animals were positive,

respectively. For both groups, specific IgG2a antibodies attained maximum serum levels at day 120, but at day 200, it is possible to observe a significant decrease of these levels only in the serum of patent mice. Moreover, at day 200 of infection, mice of subpatent group showed significantly higher amounts of IgG2a that recognized the intra-erythrocytic forms of the parasite and the surface of infected erythrocytes. Challenge of mice with 10^8 pRBC showed that protective immunity progressively decline with time and despite the higher levels of specific antibody in subpatent mice, both groups showed similar protection. In experiments of adoptive transference to CD28^{-/-} mice, cells from 200-day infected mice were able to produce specific IgG2a antibodies, in a T CD4⁺ cell dependent way. In addition, we verified that CD45R⁺ cells of subpatent mice, when transferred to CD28^{-/-} mice, secreted higher amounts of specific IgG2a and IgG1 antibodies, comparing to cells of patent mice. So, from this work, we can conclude that the parasite load has a great influence in the early immune response to *P. chabaudi* malaria and it also affects the generation and/or maintenance of memory B cells. Furthermore, according to our data, at least during the analyzed period, the loss of protective immunity against this parasite does not seem to be influenced by the acute-phase parasite load, but it can be a consequence of the progressive decline of T-cell memory response that occurs in patent and subpatent groups with time of infection.

Keywords: Malaria. *Plasmodium chabaudi chabaudi*. Memory Immune Response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Ocorrência de Malária no Mundo. Adaptado de World Malaria Report, WHO. 2005. Pág.25.

Figura 1.2: Ciclo de vida do *Plasmodium sp.* Adaptado de Tongren et al., 2004. Pág. 27.

Figura 4.1: Estabelecimento de diferentes graus de imunidade contra o *P. chabaudi* AS. Camundongos C57BL/6 infectados com 10^6 EP foram submetidos a diferentes tratamentos com cloroquina: **A** - tratamento por 10 dias a partir do segundo dia de infecção; **B** - tratamento por 10 dias a partir do momento que o animal apresenta 1% de seus eritrócitos parasitados; **C** - tratamento por 10 dias a partir do momento que o animal alcança 10% de parasitemia; **D** - tratamento, por dois dias consecutivos, sempre que o animal apresenta 1% de parasitemia; **E** - animais infectados e não tratados; **F** - animais não infectados com 10^6 EP, apenas desafiados com 10^8 EP (**A**). Após 90 dias da inoculação do parasita todos os animais foram desafiados com 10^8 EP e suas parasitemias acompanhadas por 10 dias (**B**). As curvas de parasitemias são representativas de dois experimentos realizados independentemente. Os dados representam as médias de cada grupo $\pm$ desvios padrão. (n= 3-6). Pág. 53.

Figura 4.2: Avaliação da resposta humoral específica contra o *P. chabaudi* nos diferentes grupos. A resposta humoral nos grupos de animais infectados e controles foi determinada através de ensaios imunoenzimáticos que detectaram a presença de anticorpos séricos IgG2a específicos nesses animais ao longo da infecção. Desta forma, nos dias 30, 60 e 90 após a infecção inicial, amostras dos soros desses animais foram coletadas, assim como nos dias 5, 10 e 15 após o desafio com 10^8 EP ao qual todos os camundongos foram submetidos. A descrição dos grupos está detalhada na figura 1. Os gráficos representam as médias de cada grupo, acompanhadas de seus respectivos desvios padrão. (n=3-6). Pág. 55.

Figura 4.3: Análise do grau de ativação e morte celular desencadeadas pelas infecções patente e subpatente pelo *P. chabaudi*. Histograma da expressão de CD69 e sítios de ligação para Anexina-V em linfócitos esplênicos T CD4⁺ e CD8⁺ provenientes de animais dos grupos patente e subpatente infectados por 7 dias com 10^6 EP. Animais não infectados foram utilizados como controle. Os números nos histogramas correspondem às médias das porcentagens de células positivas dentro da população de CD4⁺ ou CD8⁺, acompanhadas de seus desvios-padrão. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. *p<0,05, ** p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao controle. (n=3-5). Pág. 58.

Figura 4.4: Esquema do protocolo experimental adotado neste trabalho. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 10^6 EP e submetidos às infecções patente ou subpatente. Em cada um dos dias de análise (20, 60, 120 e 200 p.i.), metade dos animais dos grupos patente e subpatente, assim como seus controles, foi sacrificada para análises de diversos parâmetros e a outra metade restante, desafiada com 10^8 EP, suas parasitemias acompanhadas e após 15 dias todos foram sacrificados para análises dos mesmos parâmetros verificados antes do desafio. Os símbolos representam animais sacrificados para experimentação. Pág. 59.

Figura 4.5: Avaliação da esplenomegalia e coloração do baço ao longo da infecção com o *P. chabaudi*. Baços de camundongos infectados com 10^6 EP e submetidos às infecções patente ou subpatente foram analisados quanto ao peso apresentado nos dias determinados (20, 60, 120 e 200 p.i.). Cada ponto representa um indivíduo e os dados apresentados são representativos de três experimentos independentes (**A**). Fotos representativas dos baços dos animais infectados por 20 e 200 dias, acompanhados de seus respectivos controles não infectados (**B**). *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001. (n=4-7). Pág. 60.

Figura 4.6: Análise do número total de células por baço durante a infecção pelo *P. chabaudi*.

Baços de camundongos infectados com 10^6 EP e submetidos às infecções patente ou subpatente foram submetidos à ruptura mecânica nos dias 20, 60, 120 e 200 p.i. e a contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer. Cada barra é referente à média do grupo $\pm$ desvio padrão. Os dados são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (n=3-5). Pág. 61.

Figura 4.7: Avaliação de alterações nas frequências das populações de linfócitos esplênicos T CD4⁺, T CD8⁺ e B220⁺ no decorrer da infecção com o *P. chabaudi*.

Esplenócitos de camundongos infectados com 10^6 EP e submetidos às infecções patente ou subpatente foram marcados com anticorpos monoclonais específicos para as moléculas CD4, CD8 e B220 nos dias 20, 60, 120 e 200 p.i. Cada barra é referente à média do grupo $\pm$ desvio padrão. Os dados são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (n=3-5). Pág. 63.

Figura 4.8: Determinação dos números absolutos das populações de linfócitos esplênicos T CD4⁺, T CD8⁺ e B220⁺ no decorrer da infecção com o *P. chabaudi*.

Os esplenócitos de camundongos infectados com 10^6 EP e submetidos às infecções patente ou subpatente foram marcados com anticorpos monoclonais específicos para as moléculas CD4, CD8 e B220 e os valores referentes a cada população, nos dias de análise, foram obtidos levando-se em consideração as porcentagens de células positivas para cada marcação e os números totais de esplenócitos contados na câmara de Neubauer. Cada barra é referente à média do grupo $\pm$ desvio padrão. Os dados são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (n=3-5). Pág. 65.

Figura 4.9: Avaliação das porcentagens de células ativadas/ experimentadas no compartimento de linfócitos T CD4⁺ durante a infecção com o *P. chabaudi* através dos marcadores CD45RB e CD62L.

Os esplenócitos de camundongos infectados com 10^6 EP e submetidos às infecções patente ou subpatente foram marcados com anticorpos monoclonais específicos para as moléculas de superfície CD4, CD45RB e CD62L e analisados em citometria de fluxo. *Dot plots* representativos das marcações dos esplenócitos T CD4⁺ no dia 20 p.i. podem ser observados (A). Os dados apresentados referem a valores encontrados apenas na população de linfócitos T CD4⁺ ao longo da infecção. Cada ponto refere-se a um indivíduo e os dados apresentados são representativos de três experimentos independentes (B). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (n=3-5). Pág. 67.

Figura 4.10: Avaliação das porcentagens de células ativadas/experimentadas no compartimento de linfócitos T CD4⁺ durante a infecção com o *P. chabaudi* através dos marcadores CD44 e CD62L.

Os esplenócitos de camundongos infectados com 10^6 EP e submetidos às infecções patente ou subpatente foram marcados com anticorpos monoclonais específicos para as moléculas de superfície CD4, CD44 e CD62L e analisados em citometria de fluxo. *Dot plots* representativos das marcações dos esplenócitos T CD4⁺ no dia 20 p.i. podem ser observados (A). Os dados apresentados referem a valores encontrados apenas na população de linfócitos T CD4⁺ ao longo da infecção. Cada ponto refere-se a um indivíduo e os dados apresentados são representativos de três experimentos independentes (B). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (n=3-5). Pág. 69.

Figura 4.11: Avaliação das porcentagens de células ativadas/memória no compartimento de linfócitos B220⁺ durante a infecção com o *P. chabaudi* através da marcação de IgG de superfície.

Os esplenócitos de camundongos infectados com 10^6 EP e submetidos às infecções patente ou subpatente foram marcados com anticorpos monoclonais específicos para as moléculas de superfície B220 e IgG e analisados em citometria de fluxo. *Dot plots* representativos das marcações dos esplenócitos B220⁺ no dia 20 p.i. podem ser observados (A). Os dados apresentados referem a valores encontrados apenas na população de linfócitos B220⁺ ao longo da infecção. Cada ponto refere-se a um indivíduo e os dados apresentados são representativos de três experimentos independentes (B). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (n=3-5). Pág. 70.

Figura 4.12: Avaliação da resposta humoral produzida ao longo da infecção patente ou subpatente pelo *P. chabaudi*. Amostras de soro foram coletadas de camundongos infectados com 10^6 EP e submetidos às infecções patente ou subpatente e a presença de anticorpos do tipo IgG2a determinada através de ensaios imunoenzimáticos. Cada ponto refere-se a um indivíduo e os dados apresentados são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (n=3-7). Pág. 71.

Figura 4.13: Anticorpos de animais de 200 dias p.i. reconhecem especificamente eritrócitos infectados. Anticorpos de animais submetidos às infecções patente ou subpatente foram obtidos 200 dias após infecção. Diluições de 1/100 foram incubadas diretamente com eritrócitos infectados, e controles, sem qualquer tratamento prévio dessas células. As médias das porcentagens de células reconhecidas são apresentadas (A). Para observarmos a capacidade desses anticorpos reconhecerem proteínas do parasita dentro dos eritrócitos, hemáceas infectadas foram fixadas, permeabilizadas, incubadas com as diluições dos soros, posteriormente adicionados anticorpos secundários anti-IgG2a de camundongo e finalmente, marcados com YOYO-1 (B). Diluições seriadas desses anticorpos foram realizadas (preto: 1/100; vermelho:1/400; azul: 1/1600) (C) e o gráfico das IMFs é apresentado (D). As diferenças significativas em relação aos controles (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$) e entre os grupos infectados (** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$ e **** $p < 0,001$) são representadas no gráfico. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. (n=3-5). Pág. 74.

Figura 4.14: Análise da memória celular contra o *Plasmodium* ao longo da infecção. Esplenócitos dos animais infectados e controles foram marcados com CFSE e colocados em cultura por 72 horas em contato com eritrócitos infectados. Após este período, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD4 conjugados a fluorocromos e a proliferação determinada, em citômetro de fluxo, através da queda na fluorescência do CFSE. Cada ponto representa um indivíduo. Os dados são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (n=3-5). Pág. 76.

Figura 4.15: Análise da memória celular contra o *Plasmodium* ao longo da infecção. Esplenócitos dos animais infectados e controles foram marcados com CFSE e colocados em cultura por 72 horas em contato com eritrócitos infectados. Após este período, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD8 conjugados a fluorocromos e a proliferação determinada, em citômetro de fluxo, através da queda na fluorescência do CFSE. Cada ponto representa um indivíduo. Os dados são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (n=3-5). Pág. 76.

Figura 4.16: Análise da produção de citocinas após contato com o *Plasmodium* in vitro. Os sobrenadantes das culturas de esplenócitos incubadas com EP foram testados quanto à presença das citocinas IL-2, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, IL-5 e IL-4 através do kit CBA Th1/Th2. A linha tracejada nos gráficos representa o limite de detecção confiável do método. (ND: não detectado). Cada barra corresponde à média do grupo, seguida por seu respectivo desvio padrão. Os dados são referentes a dois experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (n=3-5). Pág. 77.

Figura 4.17: Tratamento com anti-IL-2 ou anti-CD25 diminuiu a porcentagem de células T CD4⁺ proliferando. Esplenócitos de animais patente ou subpatente do dia 200 p.i. foram incubados por 72hs apenas meio ou com EP pelo *P. chabaudi* em presença, ou não, de anticorpos monoclonais anti-IL2 e anti-CD25. Histogramas representativos de cada grupo são apresentados e mostram a proliferação de linfócitos T CD4⁺. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação à cultura apenas na presença de meio. ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$ e **** $p < 0,001$ comparação com cultura na presença de EP. (n=3-5). Pág. 78.

Figura 4.18: Tratamento com anti-IL-2 ou anti-CD25 diminuiu a porcentagem de células T CD8⁺ proliferando. Esplenócitos de animais patente ou subpatente do dia 200 p.i. foram incubados por 72hs apenas meio ou com EP pelo *P. chabaudi* em presença, ou não, de anticorpos monoclonais anti-IL2 e anti-CD25. Histogramas representativos de cada grupo são apresentados e mostram a proliferação de linfócitos T CD8⁺. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação à cultura apenas na presença de meio. #p<0,05, ##p<0,01 e ###p<0,001 comparação com cultura na presença de EP. (n=3-5). Pág. 79.

Figura 4.19: Linfócitos T CD4⁺ de 200 dias p.i. são incapazes de proliferar em presença de eficientes APCs de 20 dias p.i. Esplenócitos de animais de 20 e 200 dias p.i. foram purificados, através de *microbeads*, segundo a expressão de CD11b, CD11c e B220. Após seleção positiva em coluna LS as frações positiva (APC) e negativa (T) de cada dia foram trocadas e incubadas na proporção 1:1 em presença de EP, por 72hs. A proliferação foi detectada através da queda de fluorescência do CFSE nas células T marcadas. *Dot plots* representativos dos diferentes tratamentos são apresentados (A). O gráfico apresenta as médias de proliferação e respectivos desvios padrão de cada grupo (B). Os dados apresentados são representativos de dois experimentos. (n=3). Pág. 81.

Figura 4.20: Linfócitos T CD8⁺ de 200 dias p.i. são incapazes de proliferar em presença de eficientes APCs de 20 dias p.i. Esplenócitos de animais de 20 e 200 dias p.i. foram purificados, através de *microbeads*, segundo a expressão de CD11b, CD11c e B220. Após seleção positiva em coluna LS as frações positiva (APC) e negativa (T) de cada dia foram trocadas e incubadas na proporção 1:1 em presença de EP, por 72hs. A proliferação foi detectada através da queda de fluorescência do CFSE nas células T marcadas. *Dot plots* representativos dos diferentes tratamentos são apresentados (A). O gráfico apresenta as médias de proliferação e respectivos desvios padrão de cada grupo (B). Os dados apresentados são representativos de dois experimentos. (n=3). Pág. 82.

Figura 4.21: Análise do estabelecimento de imunidade protetora de longa duração nos animais infectados com diferentes cargas antigênicas do *P. chabaudi*. Os camundongos submetidos às infecções patente e subpatente por 20, 60, 120 e 200 dias foram desafiados com 10⁸ EP e as parasitemias acompanhadas diariamente por 15 dias. Cada curva de parasitemia apresenta as médias dos grupos e seus desvios padrão referentes a dois experimentos independentes. #p<0,05, ##p<0,01 e ###p<0,001 comparação entre os grupos infectados. (n=3-4). Pág. 85.

Figura 4.22: Imunidade protetora estabelecida nos animais infectados com diferentes cargas antigênicas do *P. chabaudi* é capaz de proteger também contra parasita recrudescente. Camundongos submetidos às infecções patente e subpatente por 200 dias foram desafiados com 10⁸ EP, provenientes de picos recrudescentes e as parasitemias acompanhadas diariamente por 15 dias. Cada curva de parasitemia apresenta as médias dos grupos e seus desvios padrão referentes a dois experimentos independentes. #p<0,05, ##p<0,01 e ###p<0,001 comparação entre os grupos infectados. (n=3). Pág. 86.

Figura 4.23: Avaliação da esplenomegalia após o desafio com 10⁸ EP pelo *P. chabaudi*. Os baços dos camundongos infectados com 10⁶ EP e submetidos às infecções patente ou subpatente foram avaliados quanto ao peso 15 dias após o desafio de 10⁸ EP em cada um dos dias analisados. As diferenças significativas entre o mesmo grupo antes e após o desafio são apresentadas nos gráficos (α p<0,05, β p<0,01 e δ p<0,001). Cada ponto refere-se a um camundongo e os dados são representativos de três experimentos. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001. (n=4-7). Pág. 88.

Figura 4.24: Efeito do desafio nas porcentagens de células ativadas/experimentadas no compartimento de linfócitos T CD4⁺ durante a infecção com o *P. chabaudi* através dos marcadores CD45RB, CD62L e CD44. Esplenócitos dos camundongos infectados com 10⁶ EP, submetidos às infecções patente ou subpatente e desafiados com 10⁸ EP foram obtidos 15 dias após a inoculação do desafio e marcados com

anticorpos monoclonais específicos para as moléculas CD4, CD45RB, CD62L e CD44 e analisados em citometria de fluxo. Os dados apresentados são referentes apenas à população de linfócitos T CD4⁺. As diferenças significativas entre o mesmo grupo antes e após o desafio são apresentadas nos gráficos (α $p < 0,05$, β $p < 0,01$ e δ $p < 0,001$). Cada ponto refere-se a um camundongo e os dados são representativos de três experimentos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (n=3-5). Pág. 89.

Figura 4.25: Efeito do desafio nas porcentagens de células ativadas/experimentadas no compartimento de linfócitos B220⁺ durante a infecção com o *P. chabaudi*. Os esplenócitos dos camundongos infectados com 10⁶ EP, submetidos às infecções patente ou subpatente e desafiados com 10⁸ EP foram marcados com anticorpos monoclonais específicos para B220 e IgG de superfície 15 dias após a inoculação do desafio e analisados em citometria de fluxo. As diferenças significativas entre o mesmo grupo antes e após o desafio são apresentadas nos gráficos (α $p < 0,05$, β $p < 0,01$ e δ $p < 0,001$). Cada ponto refere-se a um camundongo e os dados são representativos de três experimentos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (n=3-5). Pág. 90.

Figura 4.26: Avaliação do desenvolvimento da resposta humoral por IgG2a após desafio com 10⁸ EP. Amostras de sangue periférico foram coletadas antes da inoculação das altas cargas antigênicas (10⁸ EP) e 5, 10 e 15 dias após. A presença de anticorpos do tipo IgG2a no soro desses animais foi determinada por ensaios imunoenzimáticos utilizando extratos totais do parasita. Curvas de parasitemias representativas dos animais desafiados com parasitas de pico primário $\pm$ desvios padrão (A). Curvas de parasitemias referentes aos animais desafiados com parasitas recrudescentes no dia 200 p.i. $\pm$ desvios padrão (B). ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$ e **** $p < 0,001$ comparação entre os grupos infectados. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparação com o grupo controle. Os dados são representativos de três experimentos independentes. (n=3-5). Pág. 91.

Figura 4.27: Avaliação do desenvolvimento da resposta humoral por IgG1 após desafio com 10⁸ EP. Amostras de sangue periférico foram coletadas antes da inoculação das altas cargas antigênicas (10⁸ EP) e 5, 10 e 15 dias após. A presença de anticorpos do tipo IgG1 no soro desses animais foi determinada por ensaios imunoenzimáticos utilizando extratos totais do parasita. Curvas de parasitemias representativas dos animais desafiados com parasitas de pico primário $\pm$ desvios padrão (A). Curvas de parasitemias referentes aos animais desafiados com parasitas recrudescentes no dia 200 p.i. $\pm$ desvios padrão (B). ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$ e **** $p < 0,001$ comparação entre os grupos infectados. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparação com o grupo controle. Os dados são representativos de três experimentos independentes. (n=3-5). Pág. 92.

Figura 4.28: Animais CD28^{-/-} submetidos à infecção subpatente permaneceram incapazes de produzir anticorpos específicos contra o parasita. Animais C57e CD28^{-/-} foram infectados com 10⁶ EP pelo *P. chabaudi* e submetidos à infecção patente ou subpatente. As parasitemias foram monitoradas por 60 dias (A) e após este período, amostras dos soros desses animais foram coletadas e analisadas quanto à presença de anticorpos dos tipos IgG2a e IgG1 específicos contra o parasita (B). As curvas de parasitemias representam as médias dos grupos $\pm$ desvios padrão. Cada seta $\uparrow$ representa o tratamento com cloroquina, por dois dias consecutivos, sempre que os animais WT alcançassem 1% de parasitemia e as setas $\uparrow$ são correspondentes ao tratamento dos camundongos CD28^{-/-}. Nos gráficos referentes às D.O.s cada ponto corresponde a um indivíduo. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. (n=3). Pág. 96.

Figura 4.29: Animais CD28^{-/-} transferidos com células de animais C57 do grupo patente de 200 dias p.i. apresentam proteção contra a infecção e desafio de forma T CD4⁺ dependente. Animais CD28^{-/-} foram transferidos com células totais de controle ($\blacktriangle$) ou patente ($\blacksquare$), ou suspensões celulares purificadas, desprovidas de linfócitos T CD4⁺, provenientes dos animais controle ($\blacktriangle$) ou patente ($\blacksquare$) de 200 dias p.i. Em todas as transferências, aproximadamente 20x10⁶ células B foram inoculadas em cada animal. Esses camundongos foram então infectados com 10⁶ EP e as parasitemias

acompanhadas por 5 semanas, momento em que os animais foram submetidos ao tratamento com cloroquina por 8 dias, seguido do desafio com 10^8 EP. As parasitemias foram acompanhadas por mais 15 dias (A). Visão detalhada das parasitemias antes e após desafio (B). Animais CD28^{-/-} apenas infectados (—♦—) foram utilizados como controle da infecção. As setas (↑) apontam o dia do desafio com 10^8 EP. As curvas de parasitemias apresentam as médias dos grupos ± desvios padrão. Os dados são referentes a apenas um experimento. (n=3). Pág. 98.

Figura 4.30: Animais CD28^{-/-} transferidos com células de animais C57 do grupo patente de 200 dias p.i. passam a produzir anticorpos do tipo IgG2a. Animais CD28^{-/-} foram transferidos com células totais de controle (▲) ou patente (■), ou suspensões celulares purificadas, desprovidas de linfócitos T CD4⁺, provenientes dos animais controle (Δ) ou patente (□) de 200 dias p.i. Em todas as transferências, aproximadamente 20×10^6 células B foram inoculadas em cada animal. Esses camundongos foram então infectados com 10^6 EP e os soros coletados semanalmente até o desafio e a cada 5 dias posteriormente. A presença de anticorpos séricos do tipo IgG2a foi determinada por ensaios imunoenzimáticos utilizando extratos totais do parasita. Cada ponto refere-se a um camundongo e os dados são representados apenas um experimento. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001. (n=3). Pág. 99.

Figura 4.31: Animais CD28^{-/-} transferidos com células de animais C57 do grupo patente de 200 dias p.i. passam a produzir anticorpos do tipo IgG1. Animais CD28^{-/-} foram transferidos com células totais de controle (▲) ou patente (■), ou suspensões celulares purificadas, desprovidas de linfócitos T CD4⁺, provenientes dos animais controle (Δ) ou patente (□) de 200 dias p.i. Em todas as transferências, aproximadamente 20×10^6 células B foram inoculadas em cada animal. Esses camundongos foram então infectados com 10^6 EP e os soros coletados semanalmente até o desafio e a cada 5 dias posteriormente. A presença de anticorpos séricos do tipo IgG1 foi determinada por ensaios imunoenzimáticos utilizando extratos totais do parasita. Cada ponto refere-se a um camundongo e os dados são representados apenas um experimento. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001. (n=3)

Figura 4.32: Animais CD28^{-/-} transferidos com células de animais C57 do grupo patente de 200 dias p.i. apresentam proteção contra a infecção e desafio de forma T dependente. Animais CD28^{-/-} foram transferidos com células totais de controle (—▲—) ou patente (—■—), ou suspensões celulares purificadas, contendo apenas linfócitos B⁺, provenientes dos animais controle (—Δ—) ou patente (—□—) de 200 dias p.i. Em todas as transferências, aproximadamente 20×10^6 células B foram inoculadas em cada animal. Esses camundongos foram então infectados com 10^6 EP e as parasitemias acompanhadas por 5 semanas, momento em que os animais foram submetidos ao tratamento com cloroquina por 8-10 dias, seguido do desafio com 10^8 EP. As parasitemias foram acompanhadas por mais 15 dias (A). Visão detalhada das parasitemias antes e após desafio (B). Animais CD28^{-/-} apenas infectados (—♦—) foram utilizados como controle da infecção. As setas (↑) apontam o dia do desafio com 10^8 EP. As curvas de parasitemias apresentam as médias dos grupos ± desvios padrão. Os dados são referentes a apenas um experimento. (n=3). Pág. 101.

Figura 4.33: Animais CD28^{-/-} transferidos com células de animais C57 do grupo subpatente de 200 dias p.i. apresentam proteção contra a infecção e desafio de forma T dependente. Animais CD28^{-/-} foram transferidos com células totais de controle (—▲—) ou subpatente (—■—), ou suspensões celulares purificadas, contendo apenas linfócitos B⁺, provenientes dos animais controle (—Δ—) ou subpatente (—□—) de 200 dias p.i. Em todas as transferências, aproximadamente 20×10^6 células B foram inoculadas em cada animal. Esses camundongos foram então infectados com 10^6 EP e as parasitemias acompanhadas por 5 semanas, momento em que os animais foram submetidos ao tratamento com cloroquina por 8-10 dias, seguido do desafio com 10^8 EP. As parasitemias foram acompanhadas por mais 15 dias (A). Visão mais detalhada das parasitemias antes e após desafio (B). Animais CD28^{-/-} apenas infectados (—♦—) foram utilizados como controle da infecção. As setas (↑) apontam o dia do desafio com 10^8 EP.

As curvas de parasitemias apresentam as médias dos grupos $\pm$ desvios padrão. Os dados são referentes a apenas um experimento. (n=3). Pág. 102.

Figura 4.34: Animais CD28^{-/-} transferidos com células de animais C57 do grupo patente e subpatente de 200 dias p.i. passam a produzir anticorpos do tipo IgG2a. Animais CD28^{-/-} foram transferidos com células totais de controle (▲), patente (■), ou suspensões celulares purificadas, contendo apenas células B⁺, provenientes dos animais controle (Δ) ou patente (□) de 200 dias p.i. (A). Animais CD28^{-/-} foram transferidos com células totais de controle (▲), subpatente (■), ou suspensões celulares purificadas, contendo apenas células B⁺, provenientes dos animais controle (Δ) ou subpatente (□) de 200 dias p.i. (B). Em todas as transferências, aproximadamente 20×10^6 células B foram inoculadas em cada animal. Esses camundongos foram então infectados com 10^6 EP e os soros coletados semanalmente até o desafio e a cada 5 dias posteriormente. A presença de anticorpos séricos do tipo IgG2a foi determinada por ensaios imunoenzimáticos utilizando extratos totais do parasita. Cada ponto refere-se a um camundongo e os dados representam apenas um experimento. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001. (n=3). Pág.103.

Figura 4.35: Animais CD28^{-/-} transferidos com células de animais C57 do grupo patente e subpatente de 200 dias p.i. passam a produzir anticorpos do tipo IgG1. Animais CD28^{-/-} foram transferidos com células totais de controle (▲), patente (■), ou suspensões celulares purificadas, contendo apenas células B⁺, provenientes dos animais controle (Δ) ou patente (□) de 200 dias p.i. (A). Animais CD28^{-/-} foram transferidos com células totais de controle (▲), subpatente (■), ou suspensões celulares purificadas, contendo apenas células B⁺, provenientes dos animais controle (Δ) ou subpatente (□) de 200 dias p.i. (B). Em todas as transferências, aproximadamente 20×10^6 células B foram inoculadas em cada animal. Esses camundongos foram então infectados com 10^6 EP e os soros coletados semanalmente até o desafio e a cada 5 dias posteriormente. A presença de anticorpos séricos do tipo IgG1 foi determinada por ensaios imunoenzimáticos utilizando extratos totais do parasita. Cada ponto refere-se a um camundongo e os dados representam apenas um experimento. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001. (n=2-3). Pág. 104.

SUMÁRIO

1 Introdução	23
1.1 Visão geral da malária no mundo e no Brasil	24
1.2 Características gerais da malária	25
1.3 O sistema imune na malária	27
1.4 Modelo de infecção pelo <i>P. chabaudi</i>	31
1.5 Mecanismos envolvidos na manutenção da memória imunológica	32
1.6 A influência da carga parasitária no desenvolvimento da imunidade	37
2 Objetivos	39
3 Materiais e Métodos	41
3.1 Animais, infecções, tratamentos e parasitemias	42
3.2 Obtenção de células esplênicas	43
3.3 Análise fenotípica das células por citometria de fluxo	43
3.4 Preparação do extrato de <i>P. chabaudi chabaudi</i> AS	44
3.5 Detecção de anticorpos séricos específicos	44
3.6 Reconhecimento específico de eritrócitos parasitados	45
3.7 Preparações celulares	45
3.8 Detecção da proliferação específica	46
3.9 Análise da produção de citocinas após contato com parasita	47
3.10 Produção de anticorpos monoclonais e tratamentos	47
3.11 Transferência adotiva de células	48
3.12 Análise Estatística	48
4 Resultados	49
Parte I: Estabelecimento de modelos de infecção com diferentes graus de imunidade	
4.1 Estabelecimento de modelos experimentais com diferentes graus de imunidade ao <i>P. chabaudi</i> AS	51
Parte II: Análise da influência da carga parasitária na resposta imunológica contra o <i>P. chabaudi</i>	
4.2 Análise da indução de ativação precoce e morte celular durante a fase aguda da infecção nos dois modelos adotados	57

4.3 Avaliação de alterações no peso e tamanho dos baços, freqüências e números absolutos das populações de linfócitos esplênicos T CD4⁺, T CD8⁺ e B⁺ em diferentes tempos das infecções.....	58
4.4 Avaliação das mudanças nas freqüências de células experimentadas/memória nas populações de linfócitos T CD4⁺ e B220⁺ esplênicos durante a infecção pelo <i>P. chabaudi</i>.....	66
4.5 Análise da cinética de anticorpos após a infecção primária.....	71
4.6 Avaliação da capacidade dos anticorpos produzidos reconhecerem eritrócitos infectados pelo <i>P. chabaudi</i>.....	72
4.7 Avaliação da proliferação antígeno-específica dos linfócitos T CD4⁺ esplênicos ao longo da infecção	75
<u>Parte III:</u> Análise da influência da carga parasitária na resposta imunológica contra o <i>P. chabaudi</i>	
4.8 Avaliação da geração de imunidade protetora de longa duração nos animais infectados	84
4.9 Determinação de alterações do sistema imune decorrentes do desafio homólogo com 10⁸EP pelo <i>P. chabaudi</i>	87
<u>Parte IV:</u> Análise do requerimento de linfócitos T CD4⁺ para transferência de proteção contra o <i>P. chabaudi</i>	
4.10 Animais CD28^{-/-} mesmo submetidos ao modelo de infecção subpatente não conseguem reverter a incapacidade de produzir anticorpos específicos. .	95
4.11 Células de animais C57 infectados por 200 dias são capazes de transferir imunidade aos animais CD28^{-/-} de forma TCD4⁺-dependente.....	97
5 Discussão	105
6 Conclusões	120
Bibliografia.....	124

1 INTRODUÇÃO

1.1 Visão geral da malária no mundo e no Brasil

A Malária, uma doença parasitária endêmica de regiões tropicais e subtropicais do mundo e também conhecida como paludismo ou maleita, continua sendo um importante problema de saúde pública para as nações em desenvolvimento, em termos de infecção, morbidade e mortalidade (Snow et al., 2004; Mung'Ala-Odera et al., 2004; Snow et al., 2005). Esta doença atinge mais de 100 países, onde aproximadamente 3,2 bilhões de pessoas estão expostas à infecção, perfazendo acima de 40% da população mundial (Bouchaud et al., 2005).

Diversas espécies de *Plasmodium* são capazes de infectar vários grupos de vertebrados, entre eles, roedores, primatas e o homem. Dentre aquelas capazes de causar doença ao homem estão *P. malariae*, *P. ovale*, *P. falciparum* e *P. vivax*, sendo as duas últimas as de maior importância epidemiológica. Destas quatro espécies, o *P. falciparum* é o mais patogênico, podendo causar a morte principalmente em pessoas que não recebem quimioterapia ou em sua primeira infecção (World Health Organization, WHO, 2002). Embora a mortalidade por *P. vivax* seja considerada muito baixa quando comparada àquela causada por *P. falciparum*, sua morbidade é significativa e provavelmente crescente devido ao desenvolvimento de resistência do parasita aos quimioterapêuticos (revisado por Baird, 2004).

Anualmente são registrados de 350 a 600 milhões de casos, dos quais 1 a 3 milhões de indivíduos morrem em decorrência da infecção. Cerca de 70% dos óbitos são registrados na África sub-Saariana, principalmente crianças menores de cinco anos e mulheres grávidas (WHO, 2003) (Figura 1.1).

Snow e colaboradores (2005) estimaram que em 2002 o número de casos de infecção por *P. falciparum* em nível mundial era 50% superior àquele informado pela WHO. Além disso, houve aumento de 200% no número de casos fora da África, compreendendo principalmente o sudeste asiático, região intensamente povoada e que foi responsável por 25% dos casos clínicos mundiais neste mesmo ano.

Figura 1.1: Ocorrência de Malária no Mundo. Adaptado de World Malaria Report, WHO. 2005.

No Brasil, as principais espécies causadoras da malária são *P. vivax*, *P. falciparum* e menos freqüentemente, *P. malariae*. A Amazônia Legal é a principal região de ocorrência da doença no país, concentrando 99,5% de todos os casos de malária registrados no país, sendo os estados do Amazonas, Rondônia, Pará e Acre os responsáveis por 87,9% deste total (Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS, Ministério da Saúde, 2007). Nesta região de maior incidência, as infecções causadas pelo *P. vivax* prevalecem e em 2006 foram registrados cerca de 396.000 casos de malária dessa espécie, correspondendo a 73,4% do registro total de casos no país (SVS, 2007).

1.2 Características gerais da malária

O ciclo vital do *Plasmodium* compreende duas fases: a assexuada, no hospedeiro vertebrado, e a sexuada, no mosquito (*Anopheles sp.*).

A infecção do hospedeiro vertebrado pelo parasita inicia-se com a entrada de esporozoítas na pele através da picada da fêmea do mosquito infectada. A seguir, parte desses parasitas alcançam a corrente sanguínea e através dela chegam ao fígado e infectam os hepatócitos. Com isso, inicia-se a fase assexuada do ciclo vital, que se subdivide em pré-eritrocítica (no fígado) e eritrocítica (nas hemáceas).

Nos hepatócitos, os parasitas proliferam por 2 a 10 dias dependendo da espécie (mínimo de 5,5 dias para espécies que infectam o homem), dando origem a vários merozoítas. Cada esporozoíta pode produzir cerca de 30.000 merozoítas por hepatócito infectado (Good e Doolan, 1999). Desta forma, os milhares de merozoítas produzidos no fígado, ao romperem as células hospedeiras, caem diretamente na corrente sanguínea e prontamente infectam as hemáceas, iniciando assim, a fase eritrocítica. Nas infecções com dois dos parasitas que infectam humanos (*P. vivax* e *P. ovale*), formas latentes do parasita, conhecidas como hipnozoítas, podem se desenvolver no fígado, levando a ataques clínicos tardios, após meses ou anos (Good et al., 2005).

Dentro dos eritrócitos, os merozoítas passam por três diferentes estágios: anel, trofozoíta e esquizonte, gerando novos merozoítas, que são liberados após ruptura dessas células. No caso de *P. falciparum* e *P. vivax*, a ruptura das hemáceas contendo esquizontes maduros ocorre em 48 horas após a invasão do eritrócito, liberando assim, uma progênie de 15 a 30 novos merozoítas de cada hemácea (Good e Doolan, 1999). Parte desses parasitas transforma-se em gametócitos (formas sexuais do parasita), que podem ser ingeridos durante a alimentação do mosquito e então se inicia a fase sexual do ciclo.

No intestino do mosquito, onde a temperatura é mais baixa, os gametas femininos e masculinos emergem das hemáceas infectadas, o que é seguido pela fertilização, gerando zigotos. Estes se desenvolvem em oocistos, dando início à esporogonia. Quando o oocisto se rompe, há liberação de esporozoítas que se deslocam até à glândula salivar, onde se hospedam e de onde serão liberados durante a alimentação da fêmea, e desta forma, o ciclo reinicia. A figura 1.2 ilustra o ciclo de vida do *Plasmodium sp.*

A fase pré-eritrocítica (no fígado) representa o primeiro encontro do hospedeiro vertebrado com o parasita, enquanto a fase eritrocítica do ciclo é a responsável pela patologia e manifestações clínicas da doença. Em indivíduos não-imunes, o paroxismo malárico é a principal característica da malária, constituindo-se por febre, calafrios e cefaléia. Nos indivíduos não tratados, esses sintomas podem progredir para malária cerebral, anemia, falência de órgãos e morte (Good et al., 2005). A malária cerebral consiste em uma das mais importantes complicações da doença e tem como característica o seqüestro de parasitas em vasos sanguíneos cerebrais, levando a óbito cerca de dois milhões de crianças africanas anualmente

(Rénia et al., 2006). Três aspectos particulares são determinantes para o surgimento de sintomas e patologia durante a infecção: o crescimento exponencial dos parasitas durante infecção das hemáceas, a modificação dos eritrócitos infectados em termos de proteínas do parasita que são expressas na membrana da célula, e a concomitante resposta imune do hospedeiro contra o parasita (Good e Doolan, 1999).

A ativação policlonal de linfócitos (do inglês, *polyclonal lymphocyte activation*, PLA) associada à esplenomegalia, hipergamaglobulinemia, produção de auto-anticorpos e imunodepressão também são características marcantes de infecções humanas causadas pelo *Plasmodium*, as quais podem ainda ser observadas em diversos modelos murinos de infecção.

Figura 1.2: Ciclo de vida do *Plasmodium* sp. Adaptado de Tongren et al., 2004.

1.3 O sistema imune na malária

Sabendo que os parasitas inoculados pelo mosquito são capazes de alcançar os hepatócitos em 2-30 minutos, poucos mecanismos imunes efetores são

realmente eficientes para detê-los neste momento (Saul, 1987). Assim, atualmente é aceito de forma geral, que os parasitas em desenvolvimento dentro dos hepatócitos são o melhor alvo para a resposta imune durante o estágio pré-eritrocítico (Hoffman et al., 1996), sendo esta proteção mediada principalmente por linfócitos T CD8⁺ (Hoffman et al., 1996; Good et al., 1988; Hafalla et al., 2006). Citocinas, como IFN- γ e IL-12, e outros fatores (incluindo o óxido nítrico) também são descritos como importantes na proteção contra o estágio pré-eritrocítico da malária (Hoffman et al., 1996; Schofield et al., 1987; Seguin et al., 1994; Doolan e Hoffman, 1997; Klotz et al., 1995; Sedegah et al., 1994; Hoffman et al., 1997).

Durante a fase eritrocítica do ciclo, é no baço, o maior órgão de tecido linfóide no sistema circulatório, que a resposta imune contra o *Plasmodium sp.* é deflagrada. Este órgão é considerado um local com alta capacidade fagocítica, o que está diretamente relacionado à grande quantidade de macrófagos presentes, além de ser um centro de proliferação de linfócitos e produção de anticorpos, este último, devido à sua grande quantidade de linfócitos B. Uma das principais funções do baço é garantir que apenas eritrócitos íntegros continuem circulando no sangue. Assim, durante os estágios eritrocíticos do parasita, este órgão participa tanto na eliminação de hemáceas parasitadas, realizando intensa fagocitose, quanto provendo uma forte resposta hematopoiética durante a infecção aguda (Alves et al., 1996; Grun et al., 1985; Yap e Stevenson, 1992), uma vez que neste momento é observada inibição da eritropoiese na medula óssea (Maggio-Price et al., 1985; Villevall et al., 1990). A importância do baço como órgão central na proteção durante a infecção por malária, em modelos murinos, pôde ser comprovada pelo fato de animais esplenectomizados serem extremamente suscetíveis a várias espécies do *Plasmodium* (Oster et al., 1980; Grun et al., 1985; Weiss, 1989; Yadava et al., 1996).

A capacidade do *Plasmodium* de se replicar em eritrócitos, células anucleadas e desprovidas de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*), via de acesso ao reconhecimento do sistema imunológico, torna este parasita bastante particular. Assim, a dificuldade de reconhecimento dos parasitas que estão dentro dos eritrócitos faz com que, na fase eritrocítica da infecção, os mecanismos efetores do sistema imune atuem especialmente no compartimento extracelular, quando os merozoítas são liberados durante o rompimento dos eritrócitos, ou ainda, através do reconhecimento de antígenos variáveis codificados pelo parasita e que passam a ser

expressos na superfície destas células, tornando-as alvos para a resposta imune mediada por anticorpos.

A proteção desempenhada pelos anticorpos (resposta humoral) durante a infecção por malária é crucial, como mostrado em experimentos de transferência passiva de imunoglobulina de adultos protegidos para crianças não imunes, evidenciando o papel protetor dessas moléculas na malária humana causada pelo *P. falciparum* (Cohen et al., 1961; Sabchareon et al., 1991). Vários trabalhos também apontam para o fato de que anticorpos naturalmente adquiridos contra antígenos expressos nas hemáceas infectadas ou contra antígenos da superfície dos merozoítas mostraram-se diretamente associados à redução de morbidade em crianças infectadas por *P. falciparum* (Marsh et al., 1989; Riley et al., 1992; Tolle et al., 1993; Al-Yaman et al., 1994; Al-Yaman et al., 1996; Egan et al., 1996). Daniel-Ribeiro e Zanini (2000) evidenciam que autoanticorpos naturais e não patogênicos também podem estar envolvidos na proteção contra a malária, uma vez que estes aumentam durante a infecção. No entanto, esse aumento parece não estar diretamente ligado à intensa ativação policlonal de células B que ocorre neste momento, mas possivelmente resultam da ativação específica de linfócitos B autorreativos (Daniel-Ribeiro et al., 1984a; Daniel-Ribeiro, 1988). Estudos confirmam a importância dos anticorpos também na proteção em modelos murinos, pois soros obtidos de camundongos que sobreviveram à infecção pelo *P. yoelii*, *P. berghei* ou *P. chabaudi* podem transferir proteção a recipientes não imunes (Freeman e Parish, 1981; Falanga et al., 1984; Jarra et al., 1986; Cavinato et al., 2001; Elias et al., 2005).

Vários estudos demonstram que em condições naturais, o estabelecimento de imunidade protetora que seja capaz de prevenir contra as manifestações clínicas da malária em humanos ocorre somente após um longo período de exposição às picadas de mosquitos infectados (Maegraith, 1974; Greenwood et al., 1987; Baird et al., 1991). O cenário observado em regiões endêmicas é uma verdadeira batalha pela vida nos primeiros anos de existência, pois neste período as crianças sofrem com altas parasitemias e são as maiores vítimas de malária severa. Porém, passada esta fase, as parasitemias tendem a diminuir, assim como os casos de malária fatal, e o que é possível observar são adultos que apesar de não mais sofrerem com os sintomas da doença, continuam apresentando parasitas na corrente sanguínea.

Greenwood e colaboradores (1987) afirmam que o desenvolvimento da imunidade à malária pode levar mais de 5 anos para se estabelecer em indivíduos de regiões endêmicas. Porém, o que se observa nesta “imunidade clínica” é que a persistência da infecção é comum, pois mesmo não observada ao microscópio ótico, a parasitemia pode ser mantida em baixos níveis, além da presença de infecções assintomáticas e crônicas, que são necessárias para o estabelecimento de uma imunidade protetora efetiva de maior duração, o que neste contexto, implica apenas na proteção contra a doença, e não contra a infecção (Tongren et al., 2004). Além disso, esta imunidade parece ser perdida (ou torna-se menos efetiva) quando indivíduos previamente imunes deslocam-se da área endêmica (Soares et al., 1999) e retornam à mesma região (Matteelli et al., 1999; Jelinek et al., 2002) ou tratam-se por longo período com quimioterápicos, sugerindo que esta memória imunológica contra a infecção é limitada. Em zonas de transmissão instável, como a Região Amazônica, onde a densidade de mosquitos infectados é relativamente baixa, os indivíduos que sobrevivem à infecção primária apresentam uma imunidade apenas parcial, sendo, portanto suscetíveis à reinfeção.

Em estudos com populações imigrantes na Indonésia e em um novo foco de epidemia na África, indivíduos de diferentes idades infectados com malária pela primeira vez foram acompanhados. Com os dados obtidos, os autores afirmam que parece haver a necessidade de apenas poucas infecções para a aquisição de imunidade contra malária severa (Baird et al., 2003; Kleinschmidt e Sharp, 2001). Uma possível interpretação para esses dados é a de que os mecanismos imunes efetores que protegem contra a malária severa são induzidos por antígenos relativamente conservados e/ou altamente imunogênicos, enquanto os mecanismos imunes efetores responsável pela eliminação dos parasitas provavelmente procuram antígenos que são mais variáveis e menos imunogênicos.

Apesar do possível estabelecimento de imunidade protetora de longa duração contra os efeitos clínicos da malária severa, a completa eliminação do parasita da corrente sanguínea é raramente observada. Ao contrário, a imunidade à malária severa parece estar ligada à necessidade da manutenção de infecções crônicas ou freqüentes (Struik e Riley, 2004), que gerem também mecanismos limitantes dos processos inflamatórios responsáveis pela patologia (Achtman et al., 2005).

1.4 Modelo de infecção pelo *P. chabaudi*

A resposta imune contra os estágios eritrocíticos dos parasitas causadores da malária é melhor caracterizada no modelo de infecção murina pelo *Plasmodium chabaudi chabaudi* utilizando camundongos C57BL/6, o qual, segundo Cox e colaboradores (1987), é um modelo representativo da infecção humana causada pelo *P. falciparum*.

Durante a infecção com o parasita murino, o controle inicial da fase aguda, ou o primeiro pico de parasitemia, ocorre antes da produção de altos níveis de anticorpos IgG específicos e é dependente de resposta celular do tipo 1, sendo os linfócitos T CD4⁺ e as citocinas IL-12, IFN- γ e TNF- α absolutamente cruciais para a ativação de células efectoras (Podoba e Stevenson, 1991; Süss et al., 1988; Su e Stevenson, 2000; Stevenson et al., 2001; Taverne et al., 1994), como macrófagos, que atuam mediando a eliminação e inativação dos parasitas, contribuindo diretamente para o controle dos altos níveis de parasitemia, que podem exceder a 40% dos eritrócitos infectados (Li et al., 2001). Ing e colaboradores (2005) demonstraram que a citocina IL-15 também desempenha papel essencial na proteção contra a fase eritrocítica da infecção pelo *P. chabaudi*, sendo importante para a produção das citocinas do tipo 1 *in vivo*, respostas de células NK (do inglês, *natural killers*), ótima produção de IL-12 e IFN- γ pelas DC (do inglês, *dendritic cells*) e também está envolvida na produção de anticorpos específicos, todos contribuindo para o controle inicial da infecção e posteriormente, auxiliando na resolução final.

Assim, o início da infecção pelo *P. chabaudi* caracteriza-se pela evidente esplenomegalia e intensa ativação policlonal de linfócitos T e B, com grande produção de anticorpos, principalmente do tipo IgG2a, sendo a maior parte deles sem especificidade ao parasita (Langhorne et al., 1984; Langhorne et al., 1985; Falanga et al., 1987; Langhorne et al., 1989; Lima et al., 1991; D'Império Lima et al., 1996; Sardinha et al., 2002). Este mecanismo de ativação policlonal de linfócitos parece ser importante no auxílio do controle inicial da infecção, principalmente através da produção precoce de IFN- γ . No entanto, conforme a infecção progride, grande parte desses linfócitos ativados policlionalmente são eliminados por apoptose (Langhorne et al., 1989; Sanchez-Torres et al., 2001) e uma resposta específica mediada por linfócitos T e B passa a ser estabelecida.

As células T CD4⁺ e os anticorpos também são necessários para promover a redução da parasitemia e mediar a eliminação dos parasitas durante a fase crônica da malária (Stevenson e Riley, 2004), o que foi demonstrado através de infecções de animais desprovidos de linfócitos T CD4⁺ e B que foram incapazes de eliminar o parasita (Stevenson e Riley, 2004), apresentando infecção crônica com parasitemias recrudescentes (Stevenson e Riley, 2004). Cavinato e colaboradores (2001) demonstraram ainda que os anticorpos do tipo IgG2a, produzidos após a ativação decorrente da infecção, apresentam maior atividade protetora, mediando, de forma eficiente, a eliminação dos parasitas tanto através de mecanismos dependentes quanto independentes de Fc.

Embora estudos iniciais indiquem que a resolução da parasitemia após o pico de infecção é absolutamente dependente de linfócitos T CD4⁺ do tipo Th2 (Helmby et al., 1998; Langhorne et al., 1989; Stevenson e Tam, 1993; Taylor-Robinson et al., 1993), em estudo mais recente, Su e Stevenson (2002) demonstraram que a resposta do tipo 1 é importante não apenas durante a fase aguda para promover uma resposta imune celular eficiente, mas também durante a fase crônica da infecção, auxiliando na resposta humoral.

No entanto, ao contrário da malária humana, que é caracterizada pelas repetidas infecções, levando algum tempo para estabelecer a imunidade clínica, e a imunidade estéril é raramente observada, o modelo de infecção de camundongos C57BL/6 pelo *P. chabaudi* AS apresenta uma infecção persistente, porém, de limitadas extensões (Jarra, 1982), e esses animais são capazes de estabelecer uma eficiente resposta imune contra o parasita após apenas uma ou duas infecções e esta imunidade dura pelo menos um ano (Jarra e Brown, 1985; Jarra et al., 1986), sendo que em um novo contato com o mesmo parasita e em maiores doses, esses animais são capazes de apresentar baixas parasitemias.

1.5 Mecanismos envolvidos na manutenção da memória imunológica

Uma marca evidente do sistema imune é sua habilidade de lembrar, em alguns casos, por muitas décadas ou até por toda a vida, um encontro prévio com um patógeno (Kaech et al., 2002), de forma que em um novo contato o hospedeiro seja capaz de responder rapidamente e com maiores títulos de anticorpos e freqüências de células T específicas efectoras (Zinkernagel, 2003). Porém,

observamos que esta característica não é uniforme para todas as infecções desencadeadas por patógenos e a manutenção da memória gerada em um primeiro encontro muitas vezes apresenta-se não tão eficiente, sendo a malária é um exemplo claro disso.

Uma constante observação em estudos realizados com humanos infectados por malária é a de que os níveis de anticorpos específicos apresentam-se diminuídos na ausência da re-exposição ao parasita (revisado por Achtman et al., 2005). Isto pode ser atribuído a uma queda na quantidade de anticorpos produzidos, resultando em baixos títulos dessas proteínas entre o fim da estação chuvosa e o fim da estação seca, em áreas de transmissão sazonal. No entanto, a resposta humoral contra a malária também parece apresentar um componente de longa duração (Riley et al., 1993; Druilhe et al., 1986). Algumas análises de longos intervalos posteriores à infecção mostram que após a inicial queda dos níveis de anticorpos específicos, os títulos podem ser mantidos mesmo na ausência de infecções, conforme apresentado em trabalho realizado por Druilhe e colaboradores (1986), no qual indivíduos que haviam deixado a área endêmica apresentaram anticorpos persistentes contra antígenos de esporozoítas mesmo após 6-10 anos. Em outro estudo, realizado com pessoas infectadas pelo *P. vivax* no Brasil, Braga e colaboradores (1998) mostraram que anticorpos específicos contra proteína de merozoíta foram encontrados em 47% desses indivíduos mesmo após 7 anos na ausência de re-exposição ao parasita.

A queda brusca nos níveis de IgG específico contra o *Plasmodium* após a fase aguda da infecção primária contrasta com o que ocorre após infecções virais ou imunizações com proteínas/haptenos (Takahashi et al., 1998; Sangster et al., 2000). Alguns dados obtidos a partir de respostas humorais decorrentes de vacinação afirmam que anticorpos contra difteria e tétano levam décadas para decair a níveis não protetores (Maple et al., 2000). Vacinas contendo vírus atenuados também induzem respostas humorais constantes, como no caso dos anticorpos contra *Varicella*, que se mantêm constantes por mais de três anos, podendo até mesmo apresentar um aumento nesses níveis (LaRussa et al., 1990; Zerboni et al., 1998). Essa manutenção também pode ser observada após vacinação com vírus de caxumba atenuado (Davidkin et al., 1995), enquanto anticorpos contra *Rubella* são mantidos por período superior a 12-23 anos na ausência de re-exposição (Asahi et al., 1997). Estudos com infecções virais naturais apresentam resultados semelhantes, pois anticorpos neutralizantes foram detectados 75 anos após infecção

por febre amarela e a manutenção de anticorpos contra pólio e vaccínia foi revelada após 40 e 15 anos, respectivamente, na ausência de antígeno (revisado por Ahmed e Gray, 1996; Slifka e Ahmed, 1996).

Devido à maior complexidade de bactérias e parasitas, os resultados apresentados pelo sistema imune quando em contato com esses microorganismos são diferentes dos observados anteriormente. Em infecções por *Campylobacter jejuni*, os anticorpos podem ser detectados em até um ano, porém, em níveis reduzidos (Cawthraw et al., 2002) e anticorpos contra *Bordetella pertussis* alcançam baixos níveis em aproximadamente cinco anos (Tomoda et al., 1992). Por outro lado, van Druten e colaboradores (1990) sugeriram que a média de duração de anticorpos humanos contra o *Toxoplasma* seria de 40 anos. A infecção por *Leishmania donovani*, de forma semelhante ao que ocorre na malária, apresenta queda drástica nos níveis de anticorpos (96%) em 75 dias após tratamento (Anam et al., 1999).

A persistência de anticorpos a baixos níveis, porém, estáveis mesmo na ausência de antígeno, como no caso de algumas infecções por bactérias e protozoários, como a malária, indica a existência tanto de plasmócitos de longa duração, quanto plasmócitos gerados após repetidas ativações de linfócitos B de memória (Slifka et al., 1998; Bernasconi et al., 2002; Manz e Radbruch, 2002).

Alguns estudos afirmam que esses plasmócitos de longa duração ocupam nichos limitados na medula óssea e baço (Manz e Radbruch, 2002; Sze et al., 2000), e que durante uma infecção, células com diferentes especificidades podem ter que competir por esses nichos de sobrevivência, limitando, portanto, o número de plasmócitos de uma determinada especificidade. Nesses locais, essas células continuam a secretar anticorpos e contribuem para a manutenção dos níveis séricos.

Com relação à sobrevivência dessas células de memória, atualmente, a idéia mais aceita é a de que os linfócitos B de memória persistem, em estado de repouso, mesmo na ausência do antígeno (Vieira e Rajewsky, 1990; Karrer et al., 2000; Maruyama et al., 2000; Kalia et al., 2006). No entanto, alguns autores afirmam que a persistência do antígeno, por meses e até anos, em forma de imunocomplexos na superfície das células dendríticas foliculares é um importante fator que contribui para essa constante ativação de células do sistema imune, como linfócitos B, levando à manutenção dos níveis de anticorpos específicos (revisado por Gray, 2002). Bernasconi e colaboradores (2002) afirmaram que as células B de memória também podem ser reestimuladas para produzirem novos plasmócitos via ativação não

específica, o que também contribuiria para a persistência dos níveis séricos de anticorpos.

A manutenção de células T de memória também tem sido alvo de intensa investigação e trabalhos iniciais, a partir de modelos murinos, sugeriram que esses linfócitos poderiam apresentar curta duração quando na ausência de antígeno (Gray e Matzinger, 1991). No entanto, evidências mais recentes indicam que linfócitos de memória T CD4⁺ e CD8⁺ podem ser mantidos na ausência tanto de moléculas MHC quanto de antígeno (Tanchot et al., 1997; Murali-Krishna et al., 1999; Swain, 2000). Porém, Kassiotis e colaboradores (2002) afirmam que apesar da possibilidade de sobrevivência, a manutenção da qualidade típica de uma célula T de memória apresenta-se comprometida, pois esta é crucialmente dependente dos sinais fornecidos pelas moléculas do MHC. E ainda, trabalhos realizados por Kalams e colaboradores (1999) e Pitcher e colaboradores (1999) confrontam a idéia da persistência das células CD4⁺ na ausência do antígeno, pois indivíduos HIV⁺ apresentaram redução dos números de seus linfócitos T de memória após terapia com antivirais, mostrando que possivelmente o antígeno é importante para a manutenção dos números de células T de memória.

Alguns trabalhos afirmam que clones de células T específicos para a malária podem ser reestimulados através da reatividade cruzada com antígenos de microrganismos comuns do ambiente, comensais e patogênicos, sendo este um mecanismo importante na tentativa de explicar a manutenção de respostas de memória de longa duração em indivíduos imunizados e não mais expostos ao *Plasmodium* (Currier et al., 1995; Goodier et al., 1997). Segundo Traggiai e colaboradores (2003), esse mecanismo ajuda na ciclagem celular desses linfócitos, resgatando-os da morte, e os mantendo no pool de células de memória em frequências suficientes para gerar respostas secundárias eficientes.

Diversos estudos comprovam que as citocinas também são importantes fatores envolvidos na manutenção da população de linfócitos T de memória, influenciando diferencialmente as taxas de proliferação de células naíve e de memória; esses experimentos envolvem principalmente células T CD8⁺ e IL-15 (Kanai et al., 1996; Kanegane e Tosato, 1996; Schluns et al., 2002; Becker et al., 2002; Goldrath et al., 2002). Dados também sugerem que a contínua divisão das células T CD8⁺ de memória requer IL-15 e é inibida por IL-2 (Ku et al., 2000). No entanto, apesar da IL-15 ser necessária para a geração de números normais de

células T CD8⁺ antígeno-específicas e para a manutenção do *turnover* dos linfócitos T CD8⁺ de memória, esta citocina parece não ser crucial para a função normal dessas células (Becker et al., 2002). A citocina IL-7, já conhecida como um fator essencial para a sobrevivência celular, também parece ser importante na manutenção dos números de linfócitos T CD8⁺ de memória, uma vez que essas células apresentam elevados níveis do seu receptor IL-7 α (Vella et al., 1997; Vella et al., 1998; Schluns et al., 2000; Goldrath et al., 2002).

Atualmente está bem estabelecido que os linfócitos T CD4⁺ também são cruciais para a manutenção da funcionalidade dos linfócitos T CD8⁺ de memória, pois nas situações em que estes últimos são gerados na ausência do auxílio de CD4, eles apresentam-se instáveis, além da produção de citocinas e proliferação diminuídas em segundo contato com o antígeno (Khanolkar et al., 2004; Northrop e Shen, 2004). Isso também pode ser claramente observado na infecção por HIV, na qual a atividade dos linfócitos T CD8⁺ é perdida quando os linfócitos T CD4⁺ alcançam níveis limitantes (Pitcher et al., 1999; Kalams et al., 1999; Rosenberg et al., 1997). Em recente trabalho publicado por Alencar e colaboradores (2007), células de memória T CD8⁺ geradas após imunização com proteína recombinante da superfície de amastigotas (*Trypanosoma cruzi*) quando em contato com o parasita foram capazes de funcionar de forma eficiente apenas na presença de linfócitos T CD4⁺, contribuindo, portanto, para a geração de uma resposta protetora e de longa duração contra o *T. cruzi* mediada por células T CD8⁺.

Apesar dos diversos dados disponíveis sobre esta colaboração entre os dois tipos celulares, a natureza deste auxílio desempenhado pelos linfócitos T CD4⁺ e o mecanismo pelo qual ele ocorre ainda são objeto de intensa pesquisa.

Segundo trabalho realizado por Gurunathan e colaboradores (1998) a IL-12 parece ser um candidato envolvido na manutenção das células T CD4⁺ de memória, pois esta citocina aumentou a potência e promoveu maior durabilidade de uma vacina com proteína de *Leishmania*, administrada em camundongos. No entanto, algumas citocinas que sinalizam através da cadeia γ , como IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15, entre outras, não parecem ser cruciais para as células T CD4⁺ de memória (Lantz et al., 2000). Porém, em camundongos deficientes em linfócitos B observamos que o estabelecimento do *pool* de células T CD4⁺ de memória é prejudicado, o que nos evidencia o papel fundamental dessas células na manutenção dos linfócitos T CD4⁺ de memória (van Essen et al., 2000).

De forma semelhante ao que ocorre para a manutenção da população de linfócitos B de memória, a apresentação antigênica feita pelas células dendríticas foliculares, que contêm imunocomplexos com antígenos em sua superfície, também parece ser crítica para a manutenção dos linfócitos T CD4⁺ de memória (van Essen et al., 2000).

1.6 A influência da carga parasitária no desenvolvimento da imunidade

A dose do antígeno inoculado durante vacinação parece ser um dos fatores que têm profunda influência na magnitude e duração das respostas imunes celulares desencadeadas (revisado por Esser et al., 2003), o que possivelmente também é aplicável para infecções. Assim, diversos trabalhos têm pesquisado de que forma variações nas cargas antigênicas administradas podem influenciar a geração e o estabelecimento das respostas imunes deflagradas durante infecções e imunizações.

Os dados apresentados por Shata e colaboradores (2003) revelam que a inoculação de baixas doses de RNA viral de HCV (do inglês, *hepatitis C vírus*) em chimpanzés foi capaz de induzir resposta imune celular específica ao vírus, associada à produção de IFN- γ e ausência de viremia persistente nesses animais. No entanto, o aumento na quantidade do RNA inoculado ultrapassa a imunidade induzida pelas baixas doses e esses animais passam a apresentar altos níveis de viremia.

Sabendo que a imunidade celular é um importante fator protetor contra a infecção por *Leishmania*, Bretscher e colaboradores (1992) administraram poucos parasitas a camundongos conhecidamente suscetíveis, caracterizados por produzirem anticorpos após a infecção, e os resultados obtidos foram de que esses animais passaram a ser hábeis para estabelecer resposta imune celular específica, adquirindo resistência ao desafio com maiores cargas antigênicas, que normalmente seriam patogênicas.

Também investigando a influência da carga antigênica na geração de imunidade, Pombo e colaboradores (2002) infectaram voluntários naíve com reduzidas doses de parasita (~30 eritrócitos parasitados pelo *P. falciparum* por dose), seguidas de tratamento, e observaram que esses voluntários apresentaram potente resposta imune celular envolvendo células T CD4⁺ e CD8⁺, com produção de

IFN- γ e na ausência de anticorpos específicos. Além disso, os indivíduos que novamente entraram em contato com o parasita estavam protegidos.

Elliott e colaboradores (2005) postularam que a exposição limitada aos estágios eritrocíticos do *Plasmodium* poderia permitir a expansão de linfócitos T CD4⁺ efetores e auxiliares, que normalmente seriam eliminados durante infecção não tratada. Desta forma, os autores observaram que animais infectados com o *P. chabaudi* e tratados desenvolveram imunidade efetiva contra altas doses de desafios com parasitas homólogos e heterólogos, apresentaram proeminente resposta celular proliferativa associada à proteção dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ da apoptose e foram capazes de produzir anticorpos contra antígenos de merozoítas. Em estudo similar, Favila-Castillo e colaboradores (1999) avaliaram o efeito das baixas parasitemias na resposta imune durante infecção com o mesmo parasita e demonstraram que camundongos submetidos às baixas cargas antigênicas desenvolveram proteção eficiente contra desafio homólogo, porém, não contra heterólogo, não apresentaram esplenomegalia e a produção de anticorpos do tipo IgG2a foi maior do que nos animais que desenvolveram altas parasitemias.

Portanto, avaliando os resultados apresentados observamos que existe um grande interesse em avaliar se baixas doses de antígeno podem induzir respostas imunes qualitativamente diferentes daquelas em presença de altas doses antigênicas, o que torna esta questão um tópico que também tem sido considerado como de grande relevância para o estabelecimento de protocolos de vacinas em testes pré-clínicos (Dunachie e Hill, 2003).

Tendo isto em mente, analisar de que forma o tratamento ou não de infecções causadas pelo *P. chabaudi* pode influenciar no desenvolvimento e manutenção de respostas imunes de memória pode ser de grande importância na elucidação das necessidades requeridas para se gerar uma imunidade protetora de longa duração.

Além disso, determinar se os dois modelos de infecção adotados neste trabalho podem induzir linfócitos T e B de memória qualitativamente diferentes, assim como estabelecer a função dessas populações na imunidade protetora de longa duração pode contribuir para os esforços na direção do desenvolvimento de uma vacina realmente eficaz contra a malária.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo central determinar se a exposição de camundongos a diferentes cargas antigênicas durante a fase aguda da infecção com *Plasmodium chabaudi* cepa AS pode influenciar na geração e manutenção da resposta imune de memória, e ainda, se ocorre indução de linfócitos T e B qualitativamente diferentes. Para isto, pretende-se:

- a) comparar, ao longo do tempo, a resposta imune de memória nos dois modelos de infecção estabelecidos, utilizando análises dos fenótipos apresentados pelos esplenócitos, ensaios de proliferação específica *in vitro*, presença de diferentes citocinas em resposta ao parasita e produção de anticorpos específicos;
- b) avaliar a imunidade durante um segundo contato com maiores doses do parasita;
- c) analisar a participação dos linfócitos T e B na manutenção da imunidade de longa duração observada nos modelos de animais infectados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais, infecções, tratamentos e parasitemias

Camundongos fêmeas C57BL/6 e CD28^{-/-} (C57BL/6 CD28 knock out) (Kundig et al., 1996), com 6 a 8 semanas de idade, foram fornecidos pelo Biotério de Animais Isogênicos do Departamento de Imunologia da USP e mantidos sob condições SPF (do inglês, *specific pathogen-free*). O parasita utilizado durante todo o trabalho, *Plasmodium chabaudi chabaudi* cepa AS, foi mantido congelado em nitrogênio líquido ou através de passagens semanais, como descrito por Podoba e Stevenson (1991).

Para o estabelecimento dos dois modelos de infecção (patente e subpatente) adotados neste trabalho, camundongos C57 foram inoculados i.p. (intraperitonealmente) com 10⁶ EP (eritrócitos parasitados). Os animais do grupo subpatente foram tratados i.p com duas doses subseqüentes e não curativas de cloroquina (Sigma-Aldrich) (10 mg/Kg de peso do animal/dia), dissolvida em 200 µl de PBS (do inglês, *phosphate buffered saline*) (Chimanuka et al., 2001), sempre que a parasitemia alcançava 1% dos eritrócitos. Os camundongos do grupo patente, por sua vez, não foram submetidos a tratamentos com cloroquina e apresentaram altas parasitemias durante a fase aguda da infecção.

Nos dias determinados de experimentação após a infecção primária (20, 60, 120 e 200 dias), metade dos animais de cada grupo foi sacrificada e diversos parâmetros analisados, e a outra parte dos camundongos, submetida ao desafio com 10⁸ EP inoculados i.p..

Para alguns experimentos descritos adiante utilizamos parasitas denominados recrudescentes. Para isto, camundongos C57 foram infectados com 10⁶ EP e submetidos ao tratamento com cloroquina descrito anteriormente, de forma que passados 25 dias da inoculação do parasita, o sangue desses animais foi transferido para camundongos C57 limpos e após o aumento da parasitemia, seus eritrócitos foram utilizados para experimentação.

Camundongos CD28^{-/-} foram usados em experimentos de transferência, nos quais esses animais receberam células provenientes de camundongos dos grupos patente e subpatente em fase tardia da infecção (200 dias p.i.), assim como de seus controles. No mesmo dia da transferência, esses animais foram infectados com 10⁶ EP e as parasitemias monitoradas por 5 semanas.

Durante todas as infecções e desafios as parasitemias foram monitoradas por esfregaços sanguíneos, corados com Giemsa e analisados em microscopia ótica.

3.2 Obtenção de células esplênicas

Os esplenócitos utilizados em todos os experimentos foram obtidos a partir da ruptura mecânica do baço dos camundongos. As células foram lavadas com meio RPMI 1640 suplementado contendo penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml), 2-mercaptoetanol (50 µM), L-glutamina (2 mM), piruvato de sódio (1 mM) e 3% de SFB (Soro Fetal Bovino, inativado pelo calor). Todos os reagentes foram adquiridos da Life Technologies. As células foram submetidas ao tampão de lise contendo TRIS e NH₄Cl (0,16 M) para a eliminação de eritrócitos. O número de células esplênicas, por amostra, foi determinado por contagem em câmara de Neubauer. Para ensaios de proliferação, as células foram mantidas em cultura por 72hs com meio completo contendo 10% de SFB.

3.3 Análise fenotípica das células por citometria de fluxo

Diluições dos anticorpos monoclonais específicos para CD4 (H129.19 ou GK1.5), CD8 (53-6.7), CD45R/B220 (RA3-6B2), CD45RB (16A), CD62L (MEL-14), CD69 (H1.2F3) e CD44 (km703 or Ly-24), marcados com FITC (do inglês, *fluorescein isothiocyanate*), PE (do inglês, *phycoerythrin*), Cy (do inglês, *cy-chrome*) e biotina ou purificados foram incubados com os esplenócitos (10⁶) por 30 minutos a 4° C. Para as marcações com anticorpos purificados, uma incubação adicional com anticorpos policlonais anti-Ig de rato, conjugados a PE, foi realizada. Para os ensaios de detecção de Imunoglobulina de superfície foram utilizados anticorpos biotinilados anti-IgG (Southern Biotechnologies Associates). Nos experimentos que continham marcações com biotina foram adicionados os conjugados fluorescentes SA-FITC (do inglês, *streptavidin-FITC*) ou SA-Cy (do inglês, *streptavidin-cy-chrome*). Para a quantificação de células T em apoptose, os esplenócitos (10⁶) foram incubados com tampão de marcação (10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 140 mM NaCl e 5 mM CaCl₂) contendo Anexina-V conjugada a FITC (BD Pharmingen) e anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 conjugados a PE ou Cy.

As células foram analisadas em citômetro de fluxo (FACScalibur-Becton Dickinson) de acordo com a intensidade de fluorescência dos anticorpos monoclonais (FL1, FL2 ou FL3) e todos os dados obtidos foram analisados utilizando o software CELLQUEST (Becton Dickinson).

3.4 Preparação do extrato de *P. chabaudi chabaudi* AS

Camundongos apresentando entre 40% e 50% de seus eritrócitos parasitados foram sangrados pela via intracardíaca na presença de anticoagulante. As células sanguíneas foram sedimentadas através de um gradiente de Percoll (Pharmacia) a fim de remover os leucócitos. Um volume de 1,0 ml de sangue foi colocado sobre 3 ml de Percoll 60%. Após a centrifugação (30 minutos, temperatura ambiente, 3000 rpm), os eritrócitos presentes no sedimento foram lavados por duas vezes com PBS e então, lisados com saponina (concentração final 0,05%), por 7 minutos a 37°C. Após duas lavagens consecutivas com PBS, os parasitas livres foram ressuspendidos em PBS e colocados sobre duas camadas de Percoll com diluições decrescentes (40% e 20%) e submetidos a 30 minutos de centrifugação (3000 rpm). Os parasitas coletados entre as duas camadas foram reunidos, sonificados e a concentração final de proteínas foi determinada pelo método de Lowry. Este extrato total foi utilizado para a sensibilização de todas as placas usadas na detecção de anticorpos específicos contra o parasita, pelo método de ELISA.

3.5 Detecção de anticorpos séricos específicos

Anticorpos séricos anti-*P. chabaudi* foram detectados por ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizando o protocolo sugerido por Avrameas et al. (1979), com algumas alterações. Placas de ELISA (Costar) foram sensibilizadas com 8 µg/ml de extrato total de *P. chabaudi* diluídos em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M pH 9,6 e incubadas *overnight* a 4 °C. Após lavagens sucessivas com PBS contendo 0,05% de tween 20 (Sigma-Aldrich), as placas foram saturadas com PBS contendo 1% de BSA (do inglês, *bovine serum albumin*; Sigma-Aldrich) e após lavagem, volumes de 100 µl de amostras de soros (diluídas 1/50) foram incubadas por 90 minutos. A presença de anticorpos específicos contra o parasita foi revelada através da incubação com anticorpos de cabra anti-IgG2a ou

IgG1 de camundongos conjugados à peroxidase (Southern Biotechnology Associates), diluídos 1/2000 em PBS-tween 1% de BSA. A cada amostra foi adicionado um volume de 100µl da solução de TMB (tetra-metil-benzidina) (Zymed) e após 15 minutos, ao abrigo da luz, os valores de absorbância foram quantificados em um espectrofotômetro Spectra Max 190 (Molecular Devices), utilizando o comprimento de onda 650nm.

3.6 Reconhecimento específico de eritrócitos parasitados

Para verificarmos a capacidade dos anticorpos provenientes de animais infectados reconhecerem antígenos expressos na superfície de EP, utilizamos o protocolo descrito por Barkan e colaboradores (2000), acrescido de algumas modificações. A partir da cauda de animais infectados (~30% de parasitemia) retiramos aproximadamente 2,5 µl de sangue próximo ao momento da esquizogonia e incubamos diretamente com soros dos animais infectados, diluídos 1/50, e posteriormente, adicionamos anticorpos de rato anti-IgG2a conjugados à biotina, seguidos da incubação com SA-Cy ou PE.

Para observarmos se esses anticorpos eram capazes de reconhecer antígenos intra-eritrocíticos, as células foram centrifugadas, fixadas com glutaraldeído 0,025% (Sigma-Aldrich), permeabilizadas com PBS 0,25% Triton X-100 (Boehringer Mannheim GmbH) e então incubadas com as amostras de soros dos animais infectados (diluídos de 1/100 a 1/1600). Posteriormente, adicionamos anticorpos de rato anti-IgG2a de camundongo conjugados à biotina, seguidos de incubação com SA-Cy ou PE. Finalmente, 4 nM de YOYO-1 (Molecular Probes) foram acrescentados às amostras e a análise da fluorescência foi feita em citômetro de fluxo, sendo a emissão do YOYO-1 detectada no canal FL1. Eritrócitos não infectados foram usados como controle.

3.7 Preparações celulares

Para realizarmos as purificações de células através do uso de *microbeads* (MACS; Miltenyi Biotec), seguimos as recomendações do fabricante (Miltenyi Biotec). De forma resumida, os esplenócitos obtidos conforme descrito anteriormente foram ressuspensos em PBS 0,5% BSA 2 mM EDTA (Invitrogen), aos quais foram

adicionados anticorpos monoclonais anti-CD45R/B220, anti-CD11b (M1/70) e anti-CD11c (HL3), todos conjugados a PE. Após 30 minutos de incubação a 4 °C, 50µL de *microbeads* anti-PE foram adicionados às amostras. Essas preparações celulares foram selecionadas positivamente em coluna LS (Midi MACS; Miltenyi Biotec), sendo que a fração positiva (denominada APC: células CD45R⁺, CD11b⁺ e CD11c⁺) e negativa (denominada T: células CD4⁺ e CD8⁺) apresentaram purezas >82% e >92%, respectivamente.

Para os experimentos de transferência de células provenientes de animais C57 para CD28^{-/-}, as células dos animais infectados e de seus respectivos controles foram purificadas de forma similar àquela descrita anteriormente. Inicialmente, utilizamos anticorpos anti-CD4 conjugados a PE, seguidos de incubação com *microbeads* anti-PE, com a finalidade de retirarmos as células CD4⁺ das suspensões celulares a serem transferidas (<3% de células CD4⁺). Posteriormente, passamos a realizar as purificações apenas com *microbeads* acopladas diretamente a anticorpos anti-CD19 (Miltenyi Biotec) e obtivemos pureza >98%.

3.8 Detecção da proliferação específica

A resposta proliferativa específica contra o parasita observada em culturas de baço total ou naquelas contendo linfócitos T purificados foi determinada como descrita previamente por Elias e colaboradores (2005). Resumidamente, 6x10⁶ esplenócitos/ml ressuspensos em PBS 0,1% BSA foram incubados com CFSE (do inglês, *5,6-carboxy-fluorescein-succinimidyl-ester*, Molecular Probes) em concentração final de 5 µM por 20 minutos a 37°C. As células (10⁶) foram então incubadas em placas de 96 poços (Costar) em presença de EP (3x10⁶) ou apenas meio de cultura, por 72hs a 37 °C, em atmosfera contendo 5% CO₂. Anticorpos anti-CD3 (clone 145-2C11; BD Pharmingen) aderidos à placa foram utilizados como controle positivo. Nas culturas contendo linfócitos T purificados, estes foram previamente marcados com CFSE e as APCs (do inglês, *antigen presenting cells*) adicionadas em proporção final 1:1.

Após incubação, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais para CD4 e CD8 conjugados a PE ou Cy e analisadas em citometria de fluxo.

3.9 Análise da produção de citocinas após contato com parasita

Para detectarmos a presença das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4 e IL-5 no sobrenadante de culturas de proliferação contendo EP, utilizamos o kit CBA Th1/Th2 (do inglês, *cytometric bead array*) e seguimos as recomendações do fabricante (BD Pharmingen). A cada 50 μ L de amostra adicionamos um *pool* de *beads* de captura específicas para todas as citocinas citadas. Também foi acrescentado o reagente de detecção conjugado a PE. Esses mesmos reagentes foram adicionados às diluições seriadas das citocinas padrão. Após 2hs de incubação à temperatura ambiente, e protegidos da luz, todos os tubos foram lavados e analisados em citômetro de fluxo, de acordo com a intensidade de fluorescência de cada *bead* de captura em FL3, para cada citocina. As concentrações dessas citocinas nas amostras foram determinadas através da média de fluorescência em FL-2 e baseadas na curva padrão obtida para cada citocina. O limite de detecção para todas as citocinas foi 20 pg/ml.

3.10 Produção de anticorpos monoclonais e tratamentos

Os anticorpos monoclonais anti-IL-2, anti-CD25 foram produzidos a partir dos hibridomas anti-IL-2 (clone JES6-1A12, rat IgG2a) e anti-CD25 (clone PC61, rat IgG1). A expansão dos hibridomas foi realizada *in vitro*, a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂. Para a purificação foi utilizada coluna de proteína G (Amersham Bioscience) acoplada a uma bomba a vácuo (Pharmacia Biotech), equilibrada com tampão NaH₂PO₄ 0,01 M pH 7. Após equilíbrio da coluna e passagem do sobrenadante, os anticorpos monoclonais adsorvidos foram eluídos com tampão glicina 0,1 M pH 2,7. Para a neutralização das amostras, foi utilizada solução Tris 1 M pH 9. A quantidade de IgG foi determinada por espectrofotometria a 680 nm, usando o método de Lowry.

Os anticorpos anti-IL2 e anti-CD25 (0,3 mg/ml) foram adicionados às culturas de esplenócitos em presença de EP.

3.11 Transferência adotiva de células

Camundongos CD28^{-/-} receberam i.p. 20×10^6 células B purificadas, ou quantidades equivalentes de linfócitos B em suspensões totais de células ou desprovidas de linfócitos T CD4⁺, obtidas a partir dos baços de camundongos infectados por 200 dias e submetidos às infecções patente ou subpatente. Células dos animais não infectados, e com mesma idade, foram utilizadas como controle. Esses animais foram infectados com 10^6 EP no mesmo dia da transferência e as parasitemias acompanhadas por 5 semanas, com coletas de soros semanais. Após este período, esses animais foram tratados por 8-10 dias consecutivos com cloroquina e então, desafiados com 10^8 EP e acompanhados por mais 15 dias, com coletas de soros a cada 5 dias.

3.12 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o teste ANOVA, seguido por análise de comparações múltiplas, segundo o método de Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Prisma 4 (Graph Pad Software) e as diferenças entre os três grupos foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$ (5%).

4 RESULTADOS

**PARTE I: ESTABELECIMENTO DE MODELOS DE
INFECÇÃO COM DIFERENTES GRAUS DE IMUNIDADE**

4.1 Estabelecimento de modelos experimentais com diferentes graus de imunidade ao *P. chabaudi* AS

Com o objetivo de estudarmos a imunidade frente ao *P. chabaudi* e na tentativa de gerarmos diferentes graus de imunidade após contato com o parasita, iniciamos este trabalho infectando camundongos fêmeas C57BL/6 i.p. com 10^6 eritrócitos parasitados, e submetemos esses animais a diferentes protocolos de tratamento com doses sub-curativas de cloroquina (10 mg / Kg de peso corporal, como proposto por Chimanuka et al., 2001), como detalhado abaixo e apresentado na figura 4.1:

- Grupo **A**: tratamento por dez dias consecutivos a partir do segundo dia de infecção;
- Grupo **B**: tratamento por dez dias consecutivos a partir do dia em que os camundongos apresentaram 1% de seus eritrócitos parasitados;
- Grupo **C**: tratamento por dez dias consecutivos a partir do dia em que os camundongos apresentaram 10% de seus eritrócitos parasitados;
- Grupo **D**: tratamento por apenas dois dias consecutivos sempre que os camundongos apresentavam 1% de eritrócitos parasitados. De forma geral, os animais foram tratados duas vezes e então conseguiram eliminar a parasitemia;
- Grupo **E** (controle positivo): animais não tratados com cloroquina, apenas infectados. A parasitemia nesses animais alcança seu máximo no 7º dia de infecção, com aproximadamente 40% dos eritrócitos do sangue periférico infectados. Após este período, esta porcentagem cai drasticamente, e entre os dias 15 e 18 p.i. esses animais apresentam novo pico, com médias em torno de 1-2%. Esses camundongos começam a eliminar o parasita da corrente sanguínea aproximadamente após 20-25 dias da inoculação do parasita, o que pode ser detectado por microscopia ótica;
- Grupo **F** (controle negativo): animais não infectados, apenas submetidos a uma única infecção com 10^8 EP.

Para avaliar o grau de proteção estabelecida em cada grupo, desafiamos esses animais com 10^8 EP 90 dias após a inoculação inicial do parasita e monitoramos a parasitemia por 15 dias consecutivos através de esfregaços de sangue corados com Giemsa.

Conforme apresentado na figura 4.1B, os camundongos do Grupo D apresentaram proteção semelhante àquela do Grupo E (controle positivo), o qual foi submetido a altas parasitemias durante o curso da infecção primária. Ou seja,

apesar desses animais terem sido submetidos apenas a baixas parasitemias (em torno de 1%), após o desafio esses grupos não apresentaram médias maiores que 4% de seus eritrócitos parasitados e a partir do 6º dia o parasita tornou-se indetectável na corrente sanguínea desses animais, através dos esfregaços corados com Giemsa e observados ao microscópio ótico. Portanto, o fato dos parasitas terem sido apresentados ao sistema imune diversas vezes e em menores cargas antigênicas parece ter favorecido o estabelecimento de uma resposta imune de memória eficiente contra o desafio.

Os grupos B e C apresentaram porcentagens de eritrócitos infectados semelhantes entre si após o desafio, chegando a máximos em torno de 20%, porém os camundongos deste último grupo conseguiram controlar a parasitemia mais rapidamente, de forma que a partir do 7º dia os parasitas não foram mais detectados na corrente sanguínea desses animais.

Como era esperado, os animais do grupo F (controle negativo), os quais não haviam sido imunizados anteriormente, alcançaram altos picos de parasitemias após a inoculação dos 10^8 EP, chegando a apresentar máximos em torno de 62% no 4º dia de infecção. O grupo A, apesar de ter entrado em contato com o parasita durante a infecção inicial, apresentou altas parasitemias após o desafio, resultado que nos leva supor que o período de apenas dois dias com o parasita no sangue não foi suficiente para estabelecer uma imunidade protetora eficiente, pois este grupo comportou-se de forma semelhante ao anterior, alcançando média de 44% durante o pico de parasitemia (também no 4º dia após desafio).

Além da parasitemia, outro parâmetro analisado, e que está diretamente ligado à aquisição de imunidade, é a capacidade de produzir anticorpos séricos específicos contra o parasita. Neste caso, detectamos a presença do anticorpo do tipo IgG2a em tempos regulares, ou seja, 30, 60 e 90 dias após a inoculação inicial do parasita e a cada 5 dias após o desafio com 10^8 EP.

Figura 4.1: Estabelecimento de diferentes graus de imunidade contra o *P. chabaudi* AS. Camundongos C57BL/6 infectados com 10^6 EP foram submetidos a diferentes tratamentos com cloroquina: **A** - tratamento por 10 dias a partir do segundo dia de infecção; **B** - tratamento por 10 dias a partir do momento que o animal apresenta 1% de seus eritrócitos parasitados; **C** - tratamento por 10 dias a partir do momento que o animal alcança 10% de parasitemia; **D** - tratamento, por dois dias consecutivos, sempre que o animal apresenta 1% de parasitemia; **E** - animais infectados e não tratados; **F** - animais não infectados com 10^6 EP, apenas desafiados com 10^8 EP (**A**). Após 90 dias da inoculação do parasita todos os animais foram desafiados com 10^8 EP e suas parasitemias acompanhadas por 10 dias (**B**). As curvas de parasitemias são representativas de dois experimentos realizados independentemente. Os dados representam as médias de cada grupo $\pm$ desvios padrão. (n= 3-6)

Na figura 4.2 são apresentados os gráficos correspondentes às médias de densidades óticas (D.O.s) de cada grupo descrito anteriormente, acompanhadas de seus respectivos desvios padrão, sempre referentes à primeira diluição do soro (1/50). Como é possível observar nesta figura, nos três dias de coleta anteriores ao desafio, existiu uma tendência de maior produção de IgGa nos animais do grupo D quando comparado aos demais. Além disso, após o desafio, as maiores D.O.s foram detectadas tanto nos soros dos animais do grupo D quanto naqueles do grupo E, sendo que o primeiro sempre apresentou as maiores médias. Esses resultados certamente se relacionam de forma direta com aqueles citados para as parasitemias, uma vez que este anticorpo é conhecidamente importante na proteção de camundongos infectados com o *P. chabaudi*. Portanto, os animais que possuíam os maiores níveis séricos do anticorpo protetor apresentaram menores parasitemias, enquanto os animais dos grupos A e F, com as menores D.O.s, não conseguiram estabelecer resposta imune protetora eficiente capaz de impedir a invasão das suas hemáceas pelo parasita e desta forma, apresentaram altas parasitemias, como descrito anteriormente.

Mediante esses interessantes resultados apresentados, ou seja, camundongos submetidos a baixas e recorrentes parasitemias apresentando proteção semelhante àqueles submetidos a altas cargas parasitárias, decidimos selecionar apenas estes dois modelos de infecção e estudá-los mais profundamente, no que diz respeito à ativação celular ao longo da infecção e após desafio com maiores cargas parasitárias, resposta celular frente ao antígeno, manutenção ou não de resposta imune de memória eficiente ao longo do tempo, entre outros parâmetros.

Para melhor compreensão, passamos então a denominar o grupo D (submetidos a baixas e recorrentes parasitemias) de Subpatente (infecção subpatente) e o grupo E (altas parasitemias na ausência de tratamento) de Patente (infecção patente), nomenclatura que foi adotada durante toda a descrição deste trabalho.

Figura 4.2: Avaliação da resposta humoral específica contra o *P. chabaudi* nos diferentes grupos. A resposta humoral nos grupos de animais infectados e controles foi determinada através de ensaios imunoenzimáticos que detectaram a presença de anticorpos séricos IgG2a específicos nesses animais ao longo da infecção. Desta forma, nos dias 30, 60 e 90 após a infecção inicial, amostras dos soros desses animais foram coletadas, assim como nos dias 5, 10 e 15 após o desafio com 10^8 EP ao qual todos os camundongos foram submetidos. A descrição dos grupos está detalhada na figura 4.1. Os gráficos representam as médias de cada grupo, acompanhadas de seus respectivos desvios padrão. (n=3-6)

**PARTE II: ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA CARGA
PARASITÁRIA NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA O
P. chabaudi**

4.2 Análise da indução de ativação precoce e morte celular durante a fase aguda da infecção nos dois modelos adotados

Baseados em estudos de imunidade à malária, Elliott e colaboradores (2005) propuseram que exposições limitadas ao parasita facilitariam a expansão de linfócitos T que normalmente seriam eliminados, por apoptose, durante infecção com altas cargas antigênicas. Desta forma, avaliamos o impacto das infecções patente e subpatente na ativação e morte de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ esplênicos durante a fase aguda da infecção.

Para a realização destes experimentos, 3 a 5 camundongos por grupo foram infectados com 10⁶ EP, submetidos às infecções patente ou subpatente e no 7º dia (pico da parasitemia para os animais não tratados) esses camundongos foram sacrificados e seus esplenócitos marcados com anticorpos monoclonais para avaliarmos a expressão do marcador de ativação precoce, CD69. Como pode ser visualizado na figura 4.3, os esplenócitos provenientes dos animais submetidos à infecção patente apresentaram altas porcentagens de células ativadas, tanto CD4⁺ quanto CD8⁺, enquanto as células dos animais expostos a limitadas cargas antigênicas tiveram menor expressão do mesmo marcador comparado aos controles e àqueles submetidos à infecção patente (CD4: patente e subpatente $p < 0,001$; CD8: patente e subpatente $p < 0,001$). Apesar das baixas parasitemias às quais foram submetidos, os animais do grupo subpatente apresentaram porcentagens de células ativadas significativamente maiores do que as do controle, mostrando que mesmo em presença de menor quantidade de antígeno, esta foi suficiente para ativar os esplenócitos de forma eficaz.

A presença de fosfatidilserina no lado externo da membrana celular, característica de células em apoptose, também foi avaliada nestes experimentos. Uma vez que essa mesma molécula tem a capacidade de ligar-se à Anexina-V, este composto foi utilizado para detectarmos a morte celular. Desta forma, como consequência da intensa ativação desencadeada pela infecção, os esplenócitos dos animais do grupo patente também apresentaram maiores porcentagens de linfócitos Anexina-V positivos quando comparados àqueles do grupo subpatente (CD4: patente e subpatente $p < 0,001$; CD8: patente e subpatente $p < 0,001$). Portanto, esses dados corroboram vários estudos anteriores demonstrando que em presença de altas parasitemias ou cargas antigênicas há expressivo aumento na quantidade de

células em apoptose (Sanchez-Torres et al., 2001; Elliott et al., 2005; Touré-Baldé et al., 1996; Helmby et al., 2000; Matsumoto et al., 2000).

Figura 4.3: Análise do grau de ativação e morte celular desencadeadas pelas infecções patente e subpatente pelo *P. chabaudi*. Histograma da expressão de CD69 e sítios de ligação para Anexina-V em linfócitos esplênicos T CD4⁺ e CD8⁺ provenientes de animais dos grupos patente e subpatente infectados por 7 dias com 10⁶ EP. Animais não infectados foram utilizados como controle. Os números nos histogramas correspondem às médias das porcentagens de células positivas dentro da população de CD4⁺ ou CD8⁺, acompanhadas de seus desvios-padrão. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. *p<0,05, ** p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao controle. (n=3-5)

4.3 Avaliação de alterações no peso e tamanho dos baços, frequências e números absolutos das populações de linfócitos esplênicos T CD4⁺, T CD8⁺ e B⁺ em diferentes tempos das infecções

Sabendo que as diferentes cargas antigênicas às quais os camundongos foram submetidos geraram diferentes graus de ativação e morte, por apoptose, durante a fase inicial da infecção, nosso objetivo foi avaliar de que forma este impacto inicial poderia interferir no comportamento das populações de linfócitos esplênicos T CD4⁺, T CD8⁺ e B220⁺ em tempos mais tardios da infecção.

Para isto, infectamos camundongos C57 com 10⁶ EP e os submetemos às infecções patente ou subpatente, e após determinados tempos da inoculação inicial do parasita, 20, 60, 120 e 200 dias (Figura 4.4), estes animais foram sacrificados e vários parâmetros, observados.

Figura 4.4: Esquema do protocolo experimental adotado neste trabalho. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 10⁶ EP e submetidos às infecções patente ou subpatente. Em cada um dos dias de análise (20, 60, 120 e 200 p.i.), metade dos animais dos grupos patente e subpatente, assim como seus controles, foi sacrificada para análises de diversos parâmetros e a outra metade restante, desafiada com 10⁸ EP, suas parasitemias acompanhadas e após 15 dias todos foram sacrificados para análises dos mesmos parâmetros verificados antes do desafio. Os símbolos S representam animais sacrificados para experimentação.

Com o intuito de também avaliar a manutenção da memória imunológica estabelecida contra a malária nos dois modelos de infecção ao longo do tempo, parte desses animais foi desafiada com doses de 10⁸ EP, suas parasitemias acompanhadas por 15 dias e então, estes animais foram sacrificados e avaliados com relação aos mesmos parâmetros verificados antes do desafio. Os resultados referentes ao pós-desafio serão discutidos na parte III deste trabalho.

Dentre os parâmetros verificados, a análise da esplenomegalia, é um dado importante, uma vez que este órgão é conhecido como sendo essencial na resposta imunológica durante a malária. Como pode ser visto na figura 4.5A, após 20 dias de infecção, os animais submetidos a altas parasitemias e com as maiores porcentagens de células ativadas, como descrito anteriormente, apresentaram rápido e significativo aumento no peso dos baços, com médias aproximadamente 4 e 1,5 vezes maiores que as dos controles e as dos animais subpatente, respectivamente. Apesar das baixas parasitemias, os animais do grupo subpatente também apresentaram aumento significativo no peso dos baços, em comparação aos controles, dados que confirmam a ativação observada nos esplenócitos deste grupo.

Esta esplenomegalia foi acompanhada por simultâneo escurecimento do órgão, em comparação aos animais não infectados, devido à oxidação do grupo Heme e deposição de hemozoína dentro dos eritrócitos infectados (Figura 4.5B). As fotos apresentadas nos evidenciam que independentemente do modelo de infecção adotado, os baços dos animais infectados apresentam-se mais escurecidos do que aqueles dos camundongos controles.

Figura 4.5: Avaliação da esplenomegalia e coloração do baço ao longo da infecção com o *P. chabaudi*. Baços de camundongos infectados com 10^6 EP e submetidos às infecções patente ou subpatente foram analisados quanto ao peso apresentado nos dias determinados (20, 60, 120 e 200 p.i.). Cada ponto representa um indivíduo e os dados apresentados são representativos de três experimentos independentes (**A**). Fotos representativas dos baços dos animais infectados por 20 e 200 dias, acompanhados de seus respectivos controles não infectados (**B**). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (n=4-7)

No dia 60 p.i., observamos diminuição do peso dos baços dos animais infectados a valores semelhantes aos dos animais controles, de forma que não é possível, a partir deste dia, observar diferença significativa entre os grupos até o dia 200. Porém, apesar dos baços desses animais conseguirem retornar aos valores

normais de peso até dois meses após a inoculação do parasita, o mesmo não ocorre com a coloração do órgão, ou seja, mesmo após 200 dias da inoculação do parasita, os baços de ambos os grupos retêm a coloração escurecida.

O número total de células esplênicas também foi verificado nestes animais e podemos observar que 20 dias após a infecção inicial, os animais infectados apresentaram ampliação significativa desses valores, quando comparados aos controles (Figura 4.6). Ou seja, os camundongos não tratados apresentaram aumento de cerca de duas vezes, enquanto os subpatente, em torno de três vezes os valores observados para os controles. No dia 60, apesar dos baços dos animais infectados já apresentarem pesos normais, como descrito anteriormente, os valores referentes aos números totais de células esplênicas ainda permaneceram significativamente elevados em relação aos dos controles, porém, a partir do dia 120 p.i. já não observamos qualquer diferença entre os grupos (infectados e controles) com relação a este parâmetro.

Figura 4.6: Análise do número total de células por baço durante a infecção pelo *P. chabaudi*. Baços de camundongos infectados com 10^6 EP e submetidos às infecções patente ou subpatente foram submetidos à ruptura mecânica nos dias 20, 60, 120 e 200 p.i. e a contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer. Cada barra é referente à média do grupo $\pm$ desvio padrão. Os dados são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (n=3-5)

As porcentagens de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e B220⁺ esplênicos no decorrer da infecção foram analisadas, por citometria de fluxo, através de marcações com anticorpos monoclonais específicos para as moléculas CD4, CD8 e B220, e como podem ser verificadas na figura 4.7, as alterações mais evidentes e significativas ocorrem na fase inicial da infecção, ou seja, 20 dias após a inoculação do parasita e são observadas apenas no grupo patente, no qual as freqüências de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ apresentaram-se em torno de duas vezes menores que aquelas dos animais controle e subpatente. Apesar desses dados, no dia 60 de infecção é possível verificar que houve um aumento substancial dessas porcentagens no baço dos animais patente, de forma que estes alcançam freqüências semelhantes às dos controles, as quais foram mantidas nos dias seguintes de análises. Ao contrário do ocorrido para os linfócitos T, não foram notadas mudanças significativas nas freqüências de linfócitos B220⁺ esplênicos nos dois grupos de animais infectados, em relação aos animais controle, durante todo o período de análise.

Figura 4.7: Avaliação de alterações nas freqüências das populações de linfócitos esplênicos T CD4⁺, T CD8⁺ e B220⁺ no decorrer da infecção com o *P. chabaudi*. Esplenócitos de camundongos infectados com 10⁶ EP e submetidos às infecções patente ou subpatente foram marcados com anticorpos monoclonais específicos para as moléculas CD4, CD8 e B220 nos dias 20, 60, 120 e 200 p.i. Cada barra é referente à média do grupo $\pm$ desvio padrão. Os dados são representativos de três experimentos independentes. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001. (n=3-5)

No entanto, apesar da ausência de alterações significativas nas frequências de linfócitos B220⁺ esplênicos nos dias analisados, os números totais dessa população encontraram-se elevados, em relação aos controles, até pelo menos dois meses após a infecção inicial dos animais, não havendo diferença estatística entre os grupos infectados em nenhum dos dias analisados (Figura 4.8). No 20º dia de infecção observamos que essas populações apresentam-se aproximadamente duas vezes aumentadas nos animais patente e cerca de duas vezes e meia nos subpatente, quando comparados aos animais não infectados. Porém, no dia 60 p.i., esses valores absolutos decrescem e apesar disso, permaneceram cerca de duas vezes maiores que aqueles dos animais controle. Nos dias seguintes de análise não observamos diferenças significativas no número de linfócitos B220⁺ entre os grupos infectados e controle.

Nos animais do grupo subpatente podemos perceber que apesar de não terem sido verificadas mudanças significativas nas porcentagens dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ quando comparadas aos controles, como visto anteriormente, os valores absolutos encontraram-se expressivamente aumentados no dia 20 de infecção, sendo que cada uma das populações apresentava-se cerca de três vezes maiores que aquelas dos animais não infectados. Por outro lado, no grupo patente verificamos que esses valores estavam extremamente reduzidos, não havendo diferença com os controles. Este fato é compatível com a idéia de que células T de camundongos submetidos à malária aguda são fortemente ativadas e entram em apoptose, enquanto a exposição limitada protege da morte celular, pois observamos que os números de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) por baço de animal no dia 20 p.i. foram mais de duas vezes maiores nos animais subpatente quando comparados com os patente. No entanto, no dia 60 p.i., os números dessas populações nos animais patente mostraram um aumento substancial e as diferenças entre os dois grupos infectados desapareceram.

Figura 4.8: Determinação dos números absolutos das populações de linfócitos esplênicos T CD4⁺, T CD8⁺ e B220⁺ no decorrer da infecção com o *P. chabaudi*. Os esplenócitos de camundongos infectados com 10^6 EP e submetidos às infecções patente ou subpatente foram marcados com anticorpos monoclonais específicos para as moléculas CD4, CD8 e B220 e os valores referentes a cada população, nos dias de análise, foram obtidos levando-se em consideração as porcentagens de células positivas para cada marcação e os números totais de esplenócitos contados na câmara de Neubauer. Cada barra é referente à média do grupo $\pm$ desvio padrão. Os dados são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (n=3-5)

4.4 Avaliação das mudanças nas frequências de células experimentadas/memória nas populações de linfócitos T CD4⁺ e B220⁺ esplênicos durante a infecção pelo *P. chabaudi*

Para investigarmos o grau de ativação e experimentação das populações de linfócitos esplênicos T CD4⁺ ao longo da infecção, utilizamos anticorpos monoclonais específicos para as moléculas CD45RB e CD62L (L-selectina) e verificamos a presença de dupla marcação por citometria de fluxo. Essas moléculas são conhecidamente importantes na determinação do estado de ativação celular, uma vez que o CD45RB é uma das isoformas da CD45, fosfatase de membrana que desempenha importância crucial na regulação da sinalização celular desencadeada pela ligação do antígeno ao receptor, e o CD62L, molécula da família das selectinas que possibilita a adesão do leucócito ao endotélio, permitindo a entrada de células T naive ou memória central nos linfonodos periféricos. Desta forma, células T CD4⁺ com fenótipo CD62L^{lo}CD45RB^{hi} foram consideradas células experimentadas e ativadas, enquanto aquelas com características CD62L^{lo}CD45RB^{lo}, analisadas como memória efetora. A figura 4.9A contém *dot plots* representativos das marcações realizadas com linfócitos T CD4⁺ esplênicos no dia 20 p.i. e no gráfico abaixo, podemos determinar como essas sub-populações celulares se comportaram ao longo do tempo.

Assim, analisando a figura 4.9B, podemos afirmar que as maiores alterações foram detectadas no primeiro dia de análise, 20 dias p.i., no qual o grupo de animais patente apresentou significativo aumento na porcentagem de células experimentadas (CD62L^{lo}) quando comparados ao controle e subpatente, e neste momento, esse aumento parece ser devido a uma ampliação da população de células de memória efetora, uma vez que as porcentagens de células ativadas neste dia estavam reduzidas em ambos os grupos infectados. O fato de observarmos baixos valores referentes às frequências de células CD62L^{lo}CD45RB^{hi}, possivelmente está relacionado com o dia de análise, ou seja, 20 dias após a inoculação dos parasitas e passado o pico da infecção, onde foi possível verificar intensa ativação através do marcador de ativação precoce, CD69, o sistema tende a retornar a valores basais de ativação, com o intuito de restabelecer a homeostasia do organismo.

Figura 4.9: Avaliação das porcentagens de células ativadas/experimentadas no compartimento de linfócitos T CD4⁺ durante a infecção com o *P. chabaudi* através dos marcadores CD45RB e CD62L. Os esplenócitos de camundongos infectados com 10⁶ EP e submetidos às infecções patente ou subpatente foram marcados com anticorpos monoclonais específicos para as moléculas de superfície CD4, CD45RB e CD62L e analisados em citometria de fluxo. Dot plots representativos das marcações dos esplenócitos T CD4⁺ no dia 20 p.i. podem ser observados (A). Os dados apresentados referem a valores encontrados apenas na população de linfócitos T CD4⁺ ao longo da infecção. Cada ponto refere-se a um indivíduo e os dados apresentados são representativos de três experimentos independentes (B). *p<0,05, ** p<0,01 e ***p<0,001. (n=3-5)

Neste mesmo dia 20 p.i., o grupo subpatente, apesar das baixas parasitemias às quais foi submetido, também apresentou maiores porcentagens de células experimentadas e memória efetora que os controles, porém, como esperado, esses valores são menores que aqueles verificados no grupo patente, o que está diretamente ligado à menor ativação ocorrida neste grupo. No entanto, podemos observar que passada a fase inicial da infecção, no dia 60 p.i. verificamos diminuição das porcentagens referentes a essas populações celulares nos dois grupos de animais infectados, porém, com o passar do tempo, essas frequências novamente se elevam, mas sem qualquer diferença estatística com os controles, uma vez que esses animais também apresentam, naturalmente, maiores quantidades de células experimentadas devido à idade.

De forma semelhante, também verificamos a ativação dos linfócitos T CD4⁺ esplênicos através da dupla marcação utilizando simultaneamente anticorpos específicos para as moléculas CD62L e CD44 (Figura 4.10A), esta última, envolvida com a adesão de leucócitos ao endotélio, permitindo a agregação celular, de forma que o aumento da expressão deste marcador na superfície revela o fenótipo de células ativadas ou experimentadas. Portanto, analisamos a presença e cinética da população de células CD62L^{lo}CD44^{hi} ao longo do tempo e, semelhante aos dados anteriores, também observamos as maiores alterações na fase inicial da infecção, ou seja, dia 20 p.i. (Figura 4.10B). No entanto, esses valores elevados são mantidos até 60 dias p.i. e nos dias seguintes de análise verificamos que os animais controle também passaram a apresentar altas frequências de células experimentadas, provavelmente devido ao envelhecimento, o que resultou na falta de diferença significativa entre os animais infectados e controles.

Figura 4.10: Avaliação das porcentagens de células ativadas/experimentadas no compartimento de linfócitos T CD4⁺ durante a infecção com o *P. chabaudi* através dos marcadores CD44 e CD62L. Os esplenócitos de camundongos infectados com 10⁶ EP e submetidos às infecções patente ou subpatente foram marcados com anticorpos monoclonais específicos para as moléculas de superfície CD4, CD44 e CD62L e analisados em citometria de fluxo. *Dot plots* representativos das marcações dos esplenócitos T CD4⁺ no dia 20 p.i. podem ser observados (**A**). Os dados apresentados referem a valores encontrados apenas na população de linfócitos T CD4⁺ ao longo da infecção. Cada ponto refere-se a um indivíduo e os dados apresentados são representativos de três experimentos independentes (**B**). *p<0,05, ** p<0,01 e ***p<0,001. (n=3-5)

As porcentagens de linfócitos B de memória também foram determinadas por dupla marcação realizada em citometria de fluxo, utilizando simultaneamente, anticorpos monoclonais para as moléculas B220/CD45R e IgG de superfície. Como podemos notar na figura 4.11, as freqüências de células B220⁺IgG⁺ apresentam proeminente aumento no primeiro dia de análise em ambos os grupos infectados, não havendo diferença significativa entre eles em nenhum dos dias analisados, e a partir do dia 120 p.i. não detectamos qualquer diferença significativa em relação às freqüências dos animais controle.

De forma geral, os resultados apresentados neste item e no anterior indicam que as maiores diferenças entre os camundongos submetidos a altas e baixas cargas parasitárias durante infecção pelo *P. chabaudi*, com relação a frequências, números totais de células e fenótipo de células ativadas, são observadas durante a resposta inicial de células T contra o parasita, e que em tempos mais tardios esses parâmetros tornam-se semelhantes entre os grupos infectados e o controle.

Figura 4.11: Avaliação das porcentagens de células ativadas/memória no compartimento de linfócitos B220⁺ durante a infecção com o *P. chabaudi* através da marcação de IgG de superfície. Os esplenócitos de camundongos infectados com 10⁶ EP e submetidos às infecções patente ou subpatente foram marcados com anticorpos monoclonais específicos para as moléculas de superfície B220 e IgG e analisados em citometria de fluxo. *Dot plots* representativos das marcações dos esplenócitos B220⁺ no dia 20 p.i. podem ser observados **(A)**. Os dados apresentados referem a valores encontrados apenas na população de linfócitos B220⁺ ao longo da infecção. Cada ponto refere-se a um indivíduo e os dados apresentados são representativos de três experimentos independentes **(B)**. *p<0,05, ** p<0,01 e ***p<0,001. (n=3-5)

4.5 Análise da cinética de anticorpos após a infecção primária

As respostas humorais são extremamente importantes para o estabelecimento de imunidade protetora durante a infecção pelo *P. chabaudi* (Li e Langhorne, 2000; Achtman et al., 2005; Langhorne et al., 1998), porém, não se sabe de que forma a infecção subpatente poderia interferir na produção de anticorpos parasita-específicos. Para verificarmos isto, utilizamos extratos totais do parasita e analisamos, por ensaios imunoenzimáticos, a presença de anticorpos específicos do tipo IgG2a no soro dos animais em todos os dias de experimentação descritos anteriormente. Este isótipo é tipicamente encontrado no soro de camundongos infectados pelo *P. chabaudi* e como descrito por Cavinato e colaboradores (2001), apresenta a maior capacidade de auxiliar na eliminação do parasita. Portanto, observando a figura 4.12, podemos perceber que de forma geral, a resposta humoral apresentou melhora, com o tempo, na produção desse anticorpo. Ou seja, os níveis séricos deste anticorpo aumentaram até o dia 120 p.i. em ambos os grupos infectados, mas eles foram significativamente maiores nos dias 20, 60 e 200 p.i. nos animais subpatente. Além disso, enquanto os animais subpatente conseguiram manter as altas D.O.s no dia 200 p.i. ($p > 0,05$, comparado ao dia 120 p.i.), é possível observar um substancial decréscimo no grupo patente ($p < 0,01$, comparado ao dia 120 p.i.).

Figura 4.12: Avaliação da resposta humoral produzida ao longo da infecção patente ou subpatente pelo *P. chabaudi*. Amostras de soro foram coletadas de camundongos infectados com 10^6 EP e submetidos às infecções patente ou subpatente e a presença de anticorpos do tipo IgG2a determinada através de ensaios imunoenzimáticos. Cada ponto refere-se a um indivíduo e os dados apresentados são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (n=3-7)

4.6 Avaliação da capacidade dos anticorpos produzidos reconhecerem eritrócitos infectados pelo *P. chabaudi*

A idéia de que os animais patente apresentam uma deficiência na manutenção da resposta humoral pôde ser corroborada através de análises do dia 200 p.i. com anticorpos IgG2a diluídos e capazes de reconhecerem antígenos parasitários intra-eritrocíticos.

Para isso, hemáceas provenientes de animais infectados (parasitemia ~34%) foram retiradas em horário próximo ao momento da esquizogonia e então, fixadas, permeabilizadas, incubadas com os anticorpos séricos diluídos, seguido pela incubação com o monoclonal anti-IgG2a de camundongo e, finalmente o YOYO-1, molécula capaz de ligar-se com alta afinidade a ácidos nucleicos, foi adicionada. Desta forma, apenas eritrócitos contendo o parasita poderiam estar marcados com YOYO-1 (YOYO-1^{hi}) e também serem reconhecidos pelos anticorpos, o que foi detectado em citômetro de fluxo. Na figura 4.13B é possível observar que grande porcentagem das hemáceas YOYO-1^{hi} é reconhecida pelos anticorpos dos animais infectados, numa diluição de 1/100, não havendo diferença significativa entre os grupos (patente: 76,25±15,4%; subpatente: 78,57±3,42%), enquanto apenas 5% dessas hemáceas infectadas estavam ligadas aos anticorpos provenientes dos animais controle. Em contrapartida, pode-se perceber nestes *dot plots* que menos de 1% das hemáceas não parasitadas (YOYO-1^{lo}) estão ligadas aos anticorpos dos animais infectados e controles, o que reforça a idéia de que essas imunoglobulinas séricas são capazes de reconhecer especificamente as proteínas do parasita dentro das hemáceas. Eritrócitos não infectados foram utilizados no mesmo ensaio para demonstrar o baixo reconhecimento destes pelos anticorpos.

As diluições seriadas realizadas com esses anticorpos, no entanto, nos mostram uma evidente queda na intensidade média de fluorescência (IMF) à medida que os soros dos animais patente são diluídos (Figura 4.13C), de forma que a IMF da IgG2a ligada aos eritrócitos YOYO-1^{hi} é comparável entre os grupos infectados somente quando as amostras de soros dos animais patente e subpatente estão diluídas 1/100 e 1/1600, respectivamente, o que confirma os dados obtidos no ELISA, mostrando maiores quantidades de IgG2a nos animais subpatente (Figura 4.13D).

Com o intuito de verificarmos a capacidade desses anticorpos de reconhecerem antígenos parasitários variáveis expressos na superfície dos eritrócitos, hemáceas limpas e infectadas (parasitemia ~30%) foram diretamente incubadas com diluições de 1/100 dos soros dos animais infectados e controles e o reconhecimento foi verificado por citometria de fluxo, utilizando-se apenas anticorpos secundários anti-IgG2a de camundongo. Como apresentado na figura 4.13A, os anticorpos de ambos os grupos previamente infectados conseguem reconhecer a superfície das hemáceas parasitadas de forma específica, porém, aproximadamente duas vezes mais hemáceas foram reconhecidas pelos soros dos animais subpatente. Assim, pode-se dizer que há uma possibilidade de que os anticorpos IgG2a séricos dos animais subpatente reconheçam maior repertório de antígenos parasitários variáveis expressos na superfície dos eritrócitos infectados.

Figura 4.13: Anticorpos de animais de 200 dias p.i. reconhecem especificamente eritrócitos infectados. Anticorpos de animais submetidos às infecções patente ou subpatente foram obtidos 200 dias após infecção. Diluições de 1/100 foram incubadas diretamente com eritrócitos infectados, e controles, sem qualquer tratamento prévio dessas células. As médias das porcentagens de células reconhecidas são apresentadas (**A**). Para observarmos a capacidade desses anticorpos reconhecerem proteínas do parasita dentro dos eritrócitos, hemáceas infectadas foram fixadas, permeabilizadas, incubadas com as diluições dos soros, posteriormente adicionados anticorpos secundários anti-IgG2a de camundongo e finalmente, marcados com YOYO-1 (**B**). Diluições seriadas desses anticorpos foram realizadas (preto: 1/100; vermelho: 1/400; azul: 1/1600) (**C**) e o gráfico das IMFs é apresentado (**D**). As diferenças significativas em relação aos controles (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$) e entre os grupos infectados (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$) são representadas no gráfico. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. (n=3-5)

4.7 Avaliação da proliferação antígeno-específica dos linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$) esplênicos ao longo da infecção

Para avaliar se a menor resposta humoral nos animais patente poderia estar associada a um defeito no auxílio às células B, realizado pelos linfócitos T de memória, o que poderia ser uma consequência dos altos níveis de apoptose observada durante a fase aguda da infecção, comparamos a resposta proliferativa específica dos linfócitos T de ambos os grupos infectados frente aos EP por 72 horas. Para visualizarmos a proliferação, esses esplenócitos foram previamente marcados com CFSE, molécula capaz de ligar-se a proteínas do citoplasma celular e ser distribuída às células filhas de forma similar, o que nos possibilita detectar a proliferação devido à queda da fluorescência nessas células.

Inesperadamente, para ambos os grupos infectados, a resposta proliferativa dos linfócitos T $CD4^+$ foi maior no dia 20 p.i., porém, sem diferença significativa entre eles, e esta proliferação decresceu progressivamente com o tempo (comparação entre dia 20 e 200 p.i., $p < 0,01$ para patente e $p < 0,001$ para subpatente) de forma que no dia 200 p.i. não houve diferença em relação aos animais controle (Figura 4.14). Apenas no dia 60 p.i. foi possível observar porcentagens significativamente maiores de células proliferando ($CFSE^{lo}$) nos animais subpatente quando comparados aos patente. Comportamento semelhante de resposta proliferativa específica foi observado para as células T $CD8^+$ ao longo da infecção, o que pode ser observado pelas porcentagens de células $CFSE^{lo}$ nos dias 20 e 200 p.i, com $6,61 \pm 1,21$ e $10,26 \pm 0,6$ nos animais controle, $22,84 \pm 2,3$ e $12,89 \pm 1,34$ nos animais patente ($p < 0,001$), e $26,84 \pm 1,29$ e $13,64 \pm 0,63$ nos animais subpatente ($p < 0,001$). No entanto, ao contrário dos linfócitos T $CD4^+$, não verificamos diferenças significativas entre os grupos infectados, com relação à frequência de células T $CD8^+$ proliferando, em nenhum dos dias de análise (Figura 4.15).

Porém, deve ser considerado que no dia 20 p.i. o número de linfócitos T, por baço, tanto $CD4^+$ quanto $CD8^+$, foi mais de duas vezes maior nos animais subpatente, o que resulta em maior número absoluto de células T esplênicas respondedoras aos EP, quando comparado aos animais patente.

Figura 4.14: Análise da memória celular contra o *Plasmodium* ao longo da infecção. Esplenócitos dos animais infectados e controles foram marcados com CFSE e colocados em cultura por 72 horas em contato com eritrócitos infectados. Após este período, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD4 conjugados a fluorocromos e a proliferação determinada, em citômetro de fluxo, através da queda na fluorescência do CFSE. Cada ponto representa um indivíduo. Os dados são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (n=3-5)

Figura 4.15: Análise da memória celular contra o *Plasmodium* ao longo da infecção. Esplenócitos dos animais infectados e controles foram marcados com CFSE e colocados em cultura por 72 horas em contato com eritrócitos infectados. Após este período, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD8 conjugados a fluorocromos e a proliferação determinada, em citômetro de fluxo, através da queda na fluorescência do CFSE. Cada ponto representa um indivíduo. Os dados são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (n=3-5)

Para verificarmos que citocinas poderiam estar sendo produzidas durante a proliferação após o contato com o parasita, os sobrenadantes dessas culturas foram testados quanto à presença das citocinas IL-2, IFN γ , TNF α , IL-4 e IL-5 (Figura 4.16). O que podemos observar é que apesar da baixa resposta proliferativa das células T

CD4⁺ no dia 200 p.i, verificamos uma relevante presença de IL-2 no sobrenadante desta cultura, citocina esta, que havia sido detectada apenas no dia 20 p.i., o que nos leva a acreditar que mesmo na ausência de proliferação, ainda observamos manutenção da memória contra o parasita, pois as células foram capazes de responder, de alguma forma, à presença do antígeno. No sobrenadante dessas culturas, encontramos ainda, TNF- α com as maiores concentrações no início da infecção e IFN- γ em todos os dias de análise, porém, de forma mais evidente, nos dias 20 e 120 p.i. Citocinas do tipo 2, como IL-4 e IL-5 também foram dosadas no mesmo sobrenadante e as maiores concentrações foram encontradas no início da infecção (dia 20 p.i.). Nos dias posteriores, os valores verificados estavam abaixo do limite de detecção confiável.

Figura 4.16: Análise da produção de citocinas após contato com o *Plasmodium* in vitro. Os sobrenadantes das culturas de esplenócitos incubadas com EP foram testados quanto à presença das citocinas IL-2, TNF α , IFN γ , IL-5 e IL-4 através do kit CBA Th1/Th2. A linha tracejada nos gráficos representa o limite de detecção confiável do método. (ND: não detectado). Cada barra corresponde à média do grupo, seguida por seu respectivo desvio padrão. Os dados são referentes a dois experimentos independentes. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001. (n=3-5)

A fim de avaliarmos se a IL-2 produzida no dia 200 p.i. estaria regulando negativamente a proliferação dos linfócitos T CD4⁺, seja através da interação com células reguladoras, ou promovendo a morte celular (Refaeli et al., 1998; Lenardo,

1991), adicionamos nas culturas, além dos EP, anticorpos monoclonais anti-IL-2 e observamos que houve diminuição dos valores de células T CD4⁺ proliferando, em torno de 50% para ambos os grupos infectados, quando comparamos àqueles obtidos apenas na presença de EP (Figura 4.17). Por outro lado, com o intuito de verificarmos se havia alguma ação das células reguladoras no sentido de inibir a resposta proliferativa, adicionamos anticorpos anti-CD25 às culturas com EP e como verificado, também houve decréscimo nas porcentagens de células proliferando. Fenômeno semelhante foi observado na proliferação dos linfócitos T CD8⁺ em contato com os EP na presença destes anticorpos monoclonais (Figura 4.18).

Figura 4.17: Tratamento com anti-IL-2 ou anti-CD25 diminuiu a porcentagem de células T CD4⁺ proliferando. Esplenócitos de animais patente ou subpatente do dia 200 p.i. foram incubados por 72hs apenas meio ou com EP pelo *P. chabaudi* em presença, ou não, de anticorpos monoclonais anti-IL2 e anti-CD25. Histogramas representativos de cada grupo são apresentados e mostram a proliferação de linfócitos T CD4⁺. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação à cultura apenas na presença de meio. ##p<0,05, ###p<0,01 e ####p<0,001 comparação com cultura na presença de EP. (n=3-5)

Figura 4.18: Tratamento com anti-IL-2 ou anti-CD25 diminuiu a porcentagem de células T CD8⁺ proliferando. Esplenócitos de animais patente ou subpatente do dia 200 p.i. foram incubados por 72hs apenas meio ou com EP pelo *P. chabaudi* em presença, ou não, de anticorpos monoclonais anti-IL2 e anti-CD25. Histogramas representativos de cada grupo são apresentados e mostram a proliferação de linfócitos T CD8⁺. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação à cultura apenas na presença de meio. #p<0,05, ##p<0,01 e ###p<0,001 comparação com cultura na presença de EP. (n=3-5)

Sabendo que a falta de proliferação específica não estava ligada à presença de IL-2 na cultura, uma possível explicação para a redução da proliferação dos linfócitos T ao longo da infecção seria a progressiva perda da capacidade das APCs estimularem essas células. Assim, com o intuito de verificarmos se a proliferação dos linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) do dia 200 p.i. poderia ser restaurada, ou melhorada, esplenócitos de animais de 20 e 200 dias p.i., de ambos os grupos de animais infectados foram purificados, através do uso de *microbeads*, conforme a expressão de CD11b, CD11c e B220. Após seleção positiva em coluna LS, as frações positivas (denominadas APC) e as negativas (denominadas T) foram trocadas e incubadas na proporção de 1:1 durante 72 hs, em presença de EP. Como pode ser observado na figura 4.19, as APCs de 200 dias de infecção conseguiram, de forma notadamente eficiente, estimular as células T CD4⁺ do dia 20 p.i., o que pode ser facilmente

observado pela intensa queda da fluorescência do CFSE nestas células. Este fato demonstra que as APCs, apesar do tempo de infecção, conseguiram manter a capacidade de estimular outras células. Por outro lado, as APCs do dia 20 p.i. conseguiram estimular os linfócitos do dia 20, mas não os do dia 200, mostrando que de algum forma, a baixa resposta proliferativa neste dia está ligada à incapacidade desses linfócitos T CD4⁺ responderem a estímulos específicos, apesar de suas APCs terem mantido a capacidade de apresentar peptídeos antigênicos e estimularem outras células. O mesmo resultado foi observado para as células T CD8⁺ (Figura 4.20).

A viabilidade dos linfócitos dos dias 20 e 200 foi conferida utilizando estímulo inespecífico, através de anticorpos monoclonais específicos para CD3, e nos dois dias citados, a porcentagem de células T (CD4⁺ e CD8⁺) proliferando foi superior a 60%, em ambos os grupos. Este protocolo foi aplicado tanto para suspensões de células provenientes de baço total (sem purificação), quanto para os linfócitos T purificados, e em ambos os casos obtivemos resultados similares.

Figura 4.19: Linfócitos T CD4⁺ de 200 dias p.i. são incapazes de proliferar em presença de eficientes APCs de 20 dias p.i. Esplenócitos de animais de 20 e 200 dias p.i. foram purificados, através de *microbeads*, segundo a expressão de CD11b, CD11c e B220. Após seleção positiva em coluna LS as frações positiva (APC) e negativa (T) de cada dia foram trocadas e incubadas na proporção 1:1 em presença de EP, por 72hs. A proliferação foi detectada através da queda de fluorescência do CFSE nas células T marcadas. *Dot plots* representativos dos diferentes tratamentos são apresentados (**A**). O gráfico apresenta as médias de proliferação e respectivos desvios padrão de cada grupo (**B**). Os dados apresentados são representativos de dois experimentos. (n=3)

Figura 4.20: Linfócitos T CD8⁺ de 200 dias p.i. são incapazes de proliferar em presença de eficientes APCs de 20 dias p.i. Esplenócitos de animais de 20 e 200 dias p.i. foram purificados, através de *microbeads*, segundo a expressão de CD11b, CD11c e B220. Após seleção positiva em coluna LS as frações positiva (APC) e negativa (T) de cada dia foram trocadas e incubadas na proporção 1:1 em presença de EP, por 72hs. A proliferação foi detectada através da queda de fluorescência do CFSE nas células T marcadas. *Dot plots* representativos dos diferentes tratamentos são apresentados (**A**). O gráfico apresenta as médias de proliferação e respectivos desvios padrão de cada grupo (**B**). Os dados apresentados são representativos de dois experimentos. (n=3)

PARTE III: ANÁLISE DA IMUNIDADE ESTABELECIDADA CONTRA O *P. chabaudi*

4.8 Avaliação da geração de imunidade protetora de longa duração nos animais infectados

Falanga e colaboradores (1987) demonstraram que camundongos infectados com o *P. chabaudi* e submetidos a altas cargas parasitárias conseguiam desenvolver resposta imune protetora contra uma segunda infecção com o mesmo parasita, 90 dias após a infecção inicial. Vários trabalhos confirmam essa idéia, porém, em tempos mais tardios, como 200 dias p.i., há poucos dados disponíveis na literatura atual. Desta forma, a capacidade protetora da resposta imune de memória estabelecida nos animais infectados e submetidos a altas parasitemias ou tratados pôde ser avaliada através da parasitemia apresentada pelos mesmos quando desafiados com 10^8 EP pelo *P. chabaudi*, em diferentes tempos após a infecção inicial. Conforme apresentado na figura 4.21, até o dia 120 p.i. os animais submetidos tanto às infecções patente quanto subpatente apresentaram níveis similares de proteção contra o desafio de 10^8 EP, resultado que pode ser comprovado pelas baixas parasitemias apresentadas por esses camundongos (médias inferiores a 0,3%). Porém, no dia 200 p.i. há um significativo aumento nos níveis de parasitemias de ambos os grupos, chegando a apresentarem médias dez vezes maiores do que aquelas observadas no dia anterior (120 p.i.). Este resultado pode ser reflexo de uma crescente perda da memória protetora. Apesar disso, nos dois grupos, e em todos os tempos p.i. observados, a parasitemia é resolvida em até 10 dias após o desafio.

Figura 4.21: Análise do estabelecimento de imunidade protetora de longa duração nos animais infectados com diferentes cargas antigênicas do *P. chabaudi*. Os camundongos submetidos às infecções patente e subpatente por 20, 60, 120 e 200 dias foram desafiados com 10^8 EP e as parasitemias acompanhadas diariamente por 15 dias. Cada curva de parasitemia apresenta as médias dos grupos e seus desvios padrão referentes a dois experimentos independentes. $^{*}p<0,05$, $^{***}p<0,01$ e $^{****}p<0,001$ comparação entre os grupos infectados. (n=3-4)

Camundongos submetidos ao modelo de infecção subpatente provavelmente têm contato com maior repertório de proteínas antigênicas do parasita apresentadas na superfície do eritrócito do que aqueles infectados com o *P. chabaudi* proveniente apenas do pico primário de parasitemia, pois o tratamento das baixas parasitemias possivelmente induz o parasita a modificar suas proteínas expressas na superfície do EP para sobreviver no hospedeiro. Portanto, imaginamos que durante a infecção, animais do grupo subpatente estariam protegidos contra outras variantes antigênicas

além daquelas apresentadas pelo parasita utilizado no desafio, ou seja, aquele proveniente do pico de parasitemia. Assim, ao invés de desafiarmos os animais com parasitas procedente do pico primário de parasitemia, parasitas recrudescentes foram produzidos através de infecções com 10^6 EP, seguidas de tratamento, por dois dias consecutivos, sempre que a parasitemia alcançasse 1% dos eritrócitos. Assim, vinte e cinco dias depois da inoculação, este mesmo parasita foi utilizado para desafiar todos os camundongos infectados há 200 dias, assim como seus controles. De forma geral, observamos que as parasitemias apresentadas pelos animais foram ligeiramente maiores do que aquelas apresentadas na figura anterior, para o mesmo dia de análise e contrariamente à hipótese formulada, os animais do grupo subpatente não estavam mais protegidos do que os patente, apresentando médias de parasitemias maiores, que foram significativamente diferentes apenas no dia 3 após o desafio (Figura 4.22).

Figura 4.22: Imunidade protetora estabelecida nos animais infectados com diferentes cargas antigênicas do *P. chabaudi* é capaz de proteger também contra parasita recrudescente. Camundongos submetidos às infecções patente e subpatente por 200 dias foram desafiados com 10^8 EP, provenientes de picos recrudescentes e as parasitemias acompanhadas diariamente por 15 dias. Cada curva de parasitemia apresenta as médias dos grupos e seus desvios padrão referentes a dois experimentos independentes. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ comparação entre os grupos infectados. ($n=3$)

4.9 Determinação de alterações do sistema imune decorrentes do desafio homólogo com 10⁸EP pelo *P. chabaudi*

Sabendo que os animais dos grupos imunizados foram capazes de manter uma imunidade protetora eficiente contra o *P. chabaudi*, o que resultou em baixos níveis de parasitemia, diversos parâmetros também foram analisados 15 dias após a inoculação do desafio.

Um importante fator a ser verificado neste momento é se ocorre alteração no peso dos baços dos animais previamente imunizados, pois, sendo este órgão de fundamental importância durante a resposta imune contra a malária, qualquer alteração no seu tamanho pode ser indicador de ativação celular devido à inoculação de grande quantidade de antígeno. Assim, podemos observar que o desafio dos animais de 20 dias de infecção desencadeou acentuado aumento no peso dos baços dos animais subpatente, o que não ocorreu com o grupo patente (Figura 4.23). Esta aparente falta de resposta pode ser reflexo da intensa ativação à qual haviam sido, recentemente, submetidos esses animais. Nos camundongos desafiados 60 dias p.i., tanto patente quanto subpatente, apesar de não haver expressivo aumento no peso, apresentam baços maiores do que aqueles antes do desafio (patente: $p < 0,05$; subpatente: $p < 0,01$). Nos dias posteriores de análise, os baços dos animais previamente infectados não apresentaram alterações em seus valores quando comparados aos observados no próprio grupo antes do desafio.

Figura 4.23: Avaliação da esplenomegalia após o desafio com 10^8 EP pelo *P. chabaudi*. Os baços dos camundongos infectados com 10^6 EP e submetidos às infecções patente ou subpatente foram avaliados quanto ao peso 15 dias após o desafio de 10^8 EP em cada um dos dias analisados. As diferenças significativas entre o mesmo grupo antes e após o desafio são apresentadas nos gráficos (α $p < 0,05$, β $p < 0,01$ e δ $p < 0,001$). Cada ponto refere-se a um camundongo e os dados são representativos de três experimentos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (n=4-7)

Para verificarmos a ativação dos esplenócitos T $CD4^+$ após o desafio, utilizamos os mesmos marcadores descritos anteriormente (CD62L, CD45RB e CD44) e observamos que 15 dias após a inoculação dos 10^8 EP os grupos desafiados com 20 dias de infecção subpatente sofreram maiores alterações do que os animais do grupo patente (Figura 4.24), apresentando aumento significativo nas porcentagens de linfócitos T $CD4^+$ experimentados e ativados (fenótipo $CD62L^{lo}$, $CD62L^{lo}CD45RB^{hi}$ e $CD62L^{lo}CD44^{hi}$), quando comparados aos valores observados antes do desafio. A intensa estimulação recentemente sofrida no grupo patente do dia 20 p.i. parece impedir uma nova ativação de seus esplenócitos quando em segundo contato com o parasita. Porém, o desafio dos animais patente do dia 60 p.i. mostrou aumento nas porcentagens de células ativadas com fenótipo $CD62L^{lo}CD45RB^{hi}$. Nos dias seguintes de análise o desafio com altas cargas antigênicas não desencadeou alterações significativas nos fenótipos apresentados pelos esplenócitos dos animais previamente imunizados.

Figura 4.24: Efeito do desafio nas porcentagens de células ativadas/experimentadas no compartimento de linfócitos T $CD4^+$ durante a infecção com o *P. chabaudi* através dos marcadores $CD45RB$, $CD62L$ e $CD44$. Esplenócitos dos camundongos infectados com 10^6 EP, submetidos às infecções patente ou subpatente e desafiados com 10^8 EP foram obtidos 15 dias após a inoculação do desafio e marcados com anticorpos monoclonais específicos para as moléculas $CD4$, $CD45RB$, $CD62L$ e $CD44$ e analisados em citometria de fluxo. Os dados apresentados são referentes apenas à população de linfócitos T $CD4^+$. As diferenças significativas entre o mesmo grupo antes e após o desafio são apresentadas nos gráficos (α $p<0,05$, β $p<0,01$ e δ $p<0,001$). Cada ponto refere-se a um camundongo e os dados são representativos de três experimentos. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$. (n=3-5)

Com relação ao comportamento dos linfócitos B após o desafio, as maiores alterações também foram observadas nos animais subpatente com 20 dias de infecção (Figura 4.25), momento no qual os baços desses animais passaram a ter $23,2 \pm 3,3\%$ das células B220⁺ expressando IgG⁺ na superfície (antes do desafio: $9,23 \pm 1,5\%$; $p < 0,001$). Ao contrário das células B dos animais patente, observamos, após o desafio, em todos os dias de análise, aumento das porcentagens de células B220⁺IgG⁺ nos animais do grupo subpatente, quando comparados aos valores anteriores à inoculação dos 10^8 EP.

Figura 4.25: Efeito do desafio nas porcentagens de células ativadas/experimentadas no compartimento de linfócitos B220⁺ durante a infecção com o *P. chabaudi*. Os esplenócitos dos camundongos infectados com 10^6 EP, submetidos às infecções patente ou subpatente e desafiados com 10^8 EP foram marcados com anticorpos monoclonais específicos para B220 e IgG de superfície 15 dias após a inoculação do desafio e analisados em citometria de fluxo. As diferenças significativas entre o mesmo grupo antes e após o desafio são apresentadas nos gráficos (α $p < 0,05$, β $p < 0,01$ e δ $p < 0,001$). Cada ponto refere-se a um camundongo e os dados são representativos de três experimentos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (n=3-5)

O desenvolvimento da resposta humoral nesses animais também foi acompanhado através da coleta de soros nos dias 0 (antes), 5, 10 e 15 após o desafio em cada um dos tempo analisados e a detecção de anticorpos séricos do tipo IgG2a determinadas por ensaios imunoenzimáticos com extratos totais do parasita. Como é possível observar na figura 4.26A, ao contrário das células T, que ao longo da infecção não são mais ativadas pelo contato com o parasita, os linfócitos B passam a produzir maiores quantidades deste anticorpo com o tempo e principalmente após o desafio. Os maiores níveis são observados nos dias 120 e 200 p.i. e em diversos dias de análise os animais do grupo subpatente apresentaram

maiores D.O.s. comparadas às do grupo patente. Os soros dos animais desafiados com parasitas recrudescentes no dia 200 p.i. também foram avaliados quanto à presença de IgG2a e observamos resultados semelhantes àqueles descritos para os camundongos desafiados com parasita de pico primário de infecção (Figura 4.26B).

Figura 4.26: Avaliação do desenvolvimento da resposta humoral por IgG2a após desafio com 10^8 EP. Amostras de sangue periférico foram coletadas antes da inoculação das altas cargas antigênicas (10^8 EP) e 5, 10 e 15 dias após. A presença de anticorpos do tipo IgG2a no soro desses animais foi determinada por ensaios imunoenzimáticos utilizando extratos totais do parasita. Curvas de parasitemias representativas dos animais desafiados com parasitas de pico primário $\pm$ desvios padrão (**A**). Curvas de parasitemias referentes aos animais desafiados com parasitas recrudescentes no dia 200 p.i. $\pm$ desvios padrão (**B**). $\#p<0,05$, $\#\#\#p<0,01$ e $\#\#\#\#p<0,001$ comparação entre os grupos infectados. $*p<0,05$, $**p<0,01$ e $***p<0,001$ comparação com o grupo controle. Os dados são representativos de três experimentos independentes. (n=3-5)

A presença de anticorpos do isótipo IgG1 também foi monitorada utilizando o mesmo protocolo e procedimentos anteriormente, e podemos perceber que a quantidade desse isótipo no soro dos animais foi extremamente reduzida, principalmente no início da infecção. A partir do dia 120 p.i. e após o desafio, passamos a verificar D.O.s maiores do que as anteriores, e estas são mantidas no dia 200, mas apenas no grupo subpatente (Figura 4.27A). No entanto, o desafio dos animais de 200 dias p.i. utilizando parasitas recrudescentes mostrou resultados diferentes dos anteriores, ou seja, maiores níveis de IgG1 foram encontradas no soro dos animais patente (Figura 4.27B).

Figura 4.27: Avaliação do desenvolvimento da resposta humoral por IgG1 após desafio com 10^8 EP. Amostras de sangue periférico foram coletadas antes da inoculação das altas cargas antigênicas (10^8 EP) e 5, 10 e 15 dias após. A presença de anticorpos do tipo IgG1 no soro desses animais foi determinada por ensaios imunoenzimáticos utilizando extratos totais do parasita. Curvas de parasitemias representativas dos animais desafiados com parasitas de pico primário $\pm$ desvios padrão (A). Curvas de parasitemias referentes aos animais desafiados com parasitas recrudescentes no dia 200 p.i. $\pm$ desvios padrão (B). $\#p<0,05$, $\#\#p<0,01$ e $\#\#\#p<0,001$ comparação entre os grupos infectados. $*p<0,05$, $**p<0,01$ e $***p<0,001$ comparação com o grupo controle. Os dados são representativos de três experimentos independentes. (n=3-5)

Em conjunto, estes dados referentes à resposta de linfócitos T e B frente ao desafio sugerem que a proteção em tempos mais precoces da infecção (20 dias p.i.) seria assegurada pela resposta de linfócitos T, enquanto mais tardiamente o controle se daria através de uma eficiente resposta humoral, mediada principalmente por anticorpos do tipo IgG2a.

**PARTE IV: ANÁLISE DO REQUERIMENTO DE LINFÓCITOS
T CD4⁺ PARA TRANSFERÊNCIA DE PROTEÇÃO CONTRA
O *P. chabaudi***

4.10 Animais *CD28*^{-/-} mesmo submetidos ao modelo de infecção subpatente não conseguem reverter a incapacidade de produzir anticorpos específicos

Em trabalho publicado por nosso grupo de pesquisa (Elias et al., 2005) demonstramos que a ausência do co-receptor CD28 em camundongos é extremamente prejudicial para o desenvolvimento de uma efetiva resposta de células T e B durante a fase inicial da infecção pelo *P. chabaudi* AS, e os animais deficientes dessa molécula caracteristicamente são incapazes de eliminar o parasita do sangue devido ao fato de não conseguirem produzir anticorpos de alta afinidade, como IgG2a.

Taylor-Robinson e Smith (1999) mostraram que camundongos infectados com o *P. chabaudi* e tratados com anticorpos anti-CD80/86 apresentaram aumento na produção de IFN- γ . Portanto, o bloqueio das interações com o B7, que também impede os sinais negativos providos pelo CTLA-4, resultou em aumento na produção de IFN- γ , enquanto na ausência de CD28, B7 ligou-se mais facilmente ao CTLA-4, e a produção de IFN- γ diminuiu.

Tendo esses fatos em mente, nosso objetivo foi determinar se o modelo de infecção subpatente, caracteristicamente com menor ativação celular, porém, efetivo no estabelecimento de células T e B de memória em animais C57, poderia reverter a incapacidade dos animais *CD28*^{-/-} montarem uma resposta eficiente contra o *P. chabaudi*, uma vez que poderia induzir menor sinalização para CD28 via CTLA-4.

Para isto, animais *CD28*^{-/-} foram infectados com 10⁶ EP pelo *P. chabaudi* e submetidos aos modelos de infecções patente ou subpatente (animais C57 infectados foram utilizados como controle do experimento), como demonstrado na figura 4.28A. As parasitemias foram monitoradas por 60 dias e então, amostras dos soros desses animais foram coletadas e analisadas quanto à produção de anticorpos específicos do tipo IgG2a e IgG1 contra o parasita.

A despeito da exposição a limitadas cargas antigênicas e, portanto, baixa ativação celular desencadeada pela infecção, os animais deficientes em CD28 e submetidos ao modelo de infecção subpatente não conseguiram ultrapassar a ausência desta molécula e não produziram anticorpos específicos contra o *P. chabaudi* (Figura 4.28B), apesar de terem apresentado alguns períodos

(aproximadamente 20 dias cada) nos quais o parasita não foi detectado no sangue, através de esfregaços (Figura 4.28A).

Figura 4.28: Animais CD28^{-/-} submetidos à infecção subpatente permaneceram incapazes de produzirem anticorpos específicos contra o parasita. Animais C57e CD28^{-/-} foram infectados com 10⁶ EP pelo *P. chabaudi* e submetidos à infecção patente ou subpatente. As parasitemias foram monitoradas por 60 dias (A) e após este período, amostras dos soros desses animais foram coletadas e analisadas quanto à presença de anticorpos dos tipos IgG2a e IgG1 específicos contra o parasita (B). As curvas de parasitemias representam as médias dos grupos ± desvios padrão. Cada seta ↑ representa o tratamento com cloroquina, por dois dias consecutivos, sempre que os animais WT alcançassem 1% de parasitemia e as setas ↑ são correspondentes ao tratamento dos camundongos CD28^{-/-}. Nos gráficos referentes às D.O.s cada ponto corresponde a um indivíduo. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.(n=3)

Estes dados confirmam a extrema necessidade da presença do co-receptor CD28 no estabelecimento de respostas específicas contra o *P. chabaudi* AS e evidenciam que ainda que os animais sejam submetidos a controladas infecções, o sinal provido pelo CD28 não pode ser substituído por outras vias costimulatórias, como por exemplo, por ICOS.

4.11 Células de animais C57 infectados por 200 dias são capazes de transferir imunidade aos animais CD28^{-/-} de forma T CD4⁺-dependente

Sabendo, portanto, que os animais CD28^{-/-} são absolutamente incapazes, por si mesmos, de gerar imunidade efetiva e específica contra o parasita, independente da carga antigênica de *P. chabaudi* inoculada, esses camundongos tornaram-se adequados para verificarmos se a transferência de células de animais infectados por 200 dias poderia conferir proteção e ainda, confirmar se as células T CD4⁺ são essenciais também neste processo.

Assim, inicialmente retiramos linfócitos T CD4⁺ das suspensões de esplenócitos provenientes de animais C57 do grupo patente 200 dias p.i. utilizando anticorpos anti-CD4 conjugados a PE, seguidos por incubação com *microbeads* anti-PE e seleção em coluna LS. As células foram lavadas com PBS e inoculamos i.p. nos animais CD28^{-/-} células totais (sem purificação) ou a fração negativa da purificação (<5% de linfócitos T CD4⁺), de forma que em ambos os casos, transferimos aproximadamente 20x10⁶ células B para cada animal CD28^{-/-}. Esses camundongos foram então infectados com 10⁶ EP e as parasitemias acompanhadas por 5 semanas.

As parasitemias desses animais na fase inicial da infecção nos mostraram que a transferência de células provenientes de animais C57 por si só já conferiu certo grau de proteção contra a infecção pelo *P. chabaudi*, uma vez que o pico de parasitemia foi atrasado em todos os grupos, em um ou dois dias, quando comparados aos animais CD28^{-/-} apenas infectados (Figura 4.29A). Além disso, o grupo de camundongos CD28^{-/-} que receberam células totais de animais patente foi o que apresentou a melhor proteção, com as menores parasitemias durante a fase inicial de infecção. Apesar disto, esses camundongos ainda não foram capazes de eliminar totalmente o parasita e, portanto, apresentaram baixas e recorrentes parasitemias ao longo da infecção, de forma semelhante aos outros grupos transferidos. No entanto, tendo uma visão mais detalhada dessas parasitemias após a inoculação do desafio (10⁸ EP, no dia 46 de infecção) (Figura 4.29B) notamos claramente o papel protetor das células T CD4⁺ neste segundo contato com o parasita, uma vez que apenas os grupos transferidos com células totais de patente ou controle apresentaram parasitemias extremamente reduzidas, que não ultrapassaram 1,5%. Dentre os grupos de animais transferidos, aquele que recebeu

células de camundongos controle na ausência de CD4⁺ foram os que apresentaram as maiores médias de parasitemias após o desafio (12,5%), no dia 51 da infecção (Figura 4.29B). Os resultados deste experimento nos evidenciam que as células de animais no dia 200 p.i. são capazes de conferir proteção a animais imunodeficientes e essa habilidade parece ser extremamente dependente de linfócitos T CD4⁺.

Figura 4.29: Animais CD28^{-/-} transferidos com células de animais C57 do grupo patente de 200 dias p.i. apresentam proteção contra a infecção e desafio de forma T CD4⁺ dependente. Animais CD28^{-/-} foram transferidos com células totais de controle (▲) ou patente (■), ou suspensões celulares purificadas, desprovidas de linfócitos T CD4⁺, provenientes dos animais controle (△) ou patente (□) de 200 dias p.i. Em todas as transferências, aproximadamente 20x10⁶ células B foram inoculadas em cada animal. Esses camundongos foram então infectados com 10⁶ EP e as parasitemias acompanhadas por 5 semanas, momento em que os animais foram submetidos ao tratamento com cloroquina por 8 dias, seguido do desafio com 10⁸ EP. As parasitemias foram acompanhadas por mais 15 dias (A). Visão detalhada das parasitemias antes e após desafio (B). Animais CD28^{-/-} apenas infectados (●) foram utilizados como controle da infecção. As setas (↑) apontam o dia do desafio com 10⁸ EP. As curvas de parasitemias apresentam as médias dos grupos ± desvios padrão. Os dados são referentes a apenas um experimento. (n=3)

A presença de anticorpos específicos do tipo IgG2a no soro desses animais após a transferência e ao longo da infecção também foi verificada semanalmente antes do desafio e a cada 5 dias depois deste segundo contato. Podemos perceber na figura 4.30 que a transferência de células provenientes dos animais C57 patente de 200 dias p.i. possibilitou a produção de IgG2a. Observamos ainda, que antes do desafio os animais transferidos apenas com células B também são capazes de produzir o anticorpo a níveis basais. No entanto, após o desafio com 10^8 EP fica evidente a necessidade de linfócitos T $CD4^+$ para a re-estimulação das células B de memória.

Figura 4.30: Animais $CD28^{-/-}$ transferidos com células de animais C57 do grupo patente de 200 dias p.i. passam a produzir anticorpos do tipo IgG2a. Animais $CD28^{-/-}$ foram transferidos com células totais de controle ($\blacktriangle$) ou patente ($\blacksquare$), ou suspensões celulares purificadas, desprovidas de linfócitos T $CD4^+$, provenientes dos animais controle ($\triangle$) ou patente ($\square$) de 200 dias p.i. Em todas as transferências, aproximadamente 20×10^6 células B foram inoculadas em cada animal. Esses camundongos foram então infectados com 10^6 EP e os soros coletados semanalmente até o desafio e a cada 5 dias posteriormente. A presença de anticorpos séricos do tipo IgG2a foi determinada por ensaios imunoenzimáticos utilizando extratos totais do parasita. Cada ponto refere-se a um camundongo e os dados são representados apenas um experimento. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (n=3)

A presença de anticorpos IgG1 específicos no soro dos animais também foi determinada, e encontramos resultados muito semelhantes àqueles descritos anteriormente, ou seja, confirmam a importante participação dos linfócitos T $CD4^+$ na produção de anticorpos nesses animais, conforme pode ser observado na figura 4.31. Vale ressaltar que observamos maiores D.O.s referentes à presença de IgG1, o que pode ser um indicativo de padrão Th2 na resposta das células transferidas.

Figura 4.31: Animais $CD28^{-/-}$ transferidos com células de animais C57 do grupo patente de 200 dias p.i. passam a produzir anticorpos do tipo IgG1. Animais $CD28^{-/-}$ foram transferidos com células totais de controle ($\blacktriangle$) ou patente ($\blacksquare$), ou suspensões celulares purificadas, desprovidas de linfócitos T $CD4^{+}$, provenientes dos animais controle ($\triangle$) ou patente ($\square$) de 200 dias p.i. Em todas as transferências, aproximadamente 20×10^6 células B foram inoculadas em cada animal. Esses camundongos foram então infectados com 10^6 EP e os soros coletados semanalmente até o desafio e a cada 5 dias posteriormente. A presença de anticorpos séricos do tipo IgG1 foi determinada por ensaios imunoenzimáticos utilizando extratos totais do parasita. Cada ponto refere-se a um camundongo e os dados são representados apenas um experimento. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (n=3)

Para verificarmos se os dois modelos distintos de infecção haviam produzido células B qualitativamente diferentes após 200 dias, passamos a purificar as suspensões celulares provenientes dos baços dos animais C57 do grupo patente e subpatente, ou de seus respectivos controles, com anticorpos anti-CD19 diretamente conjugados a *microbeads* (pureza >98%). Da mesma forma como descrito anteriormente, as células foram lavadas após passagem em coluna e então inoculamos células totais ou apenas linfócitos B, e em todos os casos transferimos um total de 20×10^6 células B para cada animal $CD28^{-/-}$. Esses camundongos também foram infectados com 10^6 EP, suas parasitemias acompanhadas por 5 semanas, seguidas de tratamento com cloroquina por 8-10 dias para a eliminação do parasita e então, todos os animais foram desafiados com 10^8 EP e as parasitemias no grupo patente (Figura 4.32) e subpatente (Figura 4.33), acompanhadas por mais 15 dias.

Observando essas figuras, é possível verificar que as curvas de parasitemias dos animais transferidos apenas com células B são muito semelhantes àsquelas apresentadas pelos animais que receberam células na ausência de linfócitos T $CD4^{+}$, e os animais $CD28^{-/-}$ transferidos com células totais de animais patente apresentaram as menores parasitemias na fase aguda da infecção, além de um atraso de 1-2 dias no pico da curva. Após o desafio com 10^8 EP, esses animais

também não apresentaram médias de parasitemias maiores que 1,5%. Curiosamente, animais transferidos com células totais de animais controle, apesar de apresentarem altas parasitemias no início da infecção, após o desafio suas médias não ultrapassaram 2%, confirmando que a presença de linfócitos T também é um fator importante para a proteção contra o parasita, e não apenas os anticorpos.

Figura 4.32: Animais $CD28^{-/-}$ transferidos com células de animais C57 do grupo patente de 200 dias p.i. apresentam proteção contra a infecção e desafio de forma T dependente. Animais $CD28^{-/-}$ foram transferidos com células totais de controle ($\blacktriangle$) ou patente ($\blacksquare$), ou suspensões celulares purificadas, contendo apenas linfócitos B⁺, provenientes dos animais controle ($\triangle$) ou patente ($\square$) de 200 dias p.i. Em todas as transferências, aproximadamente 20×10^6 células B foram inoculadas em cada animal. Esses camundongos foram então infectados com 10^6 EP e as parasitemias acompanhadas por 5 semanas, momento em que os animais foram submetidos ao tratamento com cloroquina por 8-10 dias, seguido do desafio com 10^8 EP. As parasitemias foram acompanhadas por mais 15 dias (A). Visão detalhada das parasitemias antes e após desafio (B). Animais $CD28^{-/-}$ apenas infectados ($\blacklozenge$) foram utilizados como controle da infecção. As setas ($\uparrow$) apontam o dia do desafio com 10^8 EP. As curvas de parasitemias apresentam as médias dos grupos $\pm$ desvios padrão. Os dados são referentes a apenas um experimento. (n=3)

Resultados muito semelhantes foram observados nos camundongos transferidos com células de animais subpatente (Figura 4.33).

Figura 4.33: Animais $CD28^{-/-}$ transferidos com células de animais C57 do grupo subpatente de 200 dias p.i. apresentam proteção contra a infecção e desafio de forma T dependente. Animais $CD28^{-/-}$ foram transferidos com células totais de controle (▲) ou subpatente (■), ou suspensões celulares purificadas, contendo apenas linfócitos B^+ , provenientes dos animais controle (△) ou subpatente (□) de 200 dias p.i. Em todas as transferências, aproximadamente 20×10^6 células B foram inoculadas em cada animal. Esses camundongos foram então infectados com 10^6 EP e as parasitemias acompanhadas por 5 semanas, momento em que os animais foram submetidos ao tratamento com cloroquina por 8-10 dias, seguido do desafio com 10^8 EP. As parasitemias foram acompanhadas por mais 15 dias (A). Visão mais detalhada das parasitemias antes e após desafio (B). Animais $CD28^{-/-}$ apenas infectados (◆) foram utilizados como controle da infecção. As setas (↑) apontam o dia do desafio com 10^8 EP. As curvas de parasitemias apresentam as médias dos grupos $\pm$ desvios padrão. Os dados são referentes a apenas um experimento. (n=3)

Os soros desses animais também foram analisados quanto à presença de IgG2a (Figura 4.34) e IgG1 (Figura 4.35) específicos. Para isto, amostras foram coletadas semanalmente após a infecção e a cada 5 dias posteriormente ao desafio

com 10^8 EP. Semelhante ao experimento de transferência anterior, em que retiramos os linfócitos T $CD4^+$ das suspensões celulares injetadas, também observamos evidente deficiência na produção de ambos os isótipos quando transferimos apenas células B para os animais $CD28^{-/-}$, o que possivelmente está relacionado com a ausência dos linfócitos T $CD4^+$. Este fenômeno foi verificado tanto para animais transferidos com células de animais patente quanto de subpatente, porém, nota-se claramente que as células provenientes dos animais subpatente promoveram maior produção desses anticorpos, o que pode ser visto através das maiores D.O.s para este grupo, reproduzindo o que também foi descrito para os animais C57 do grupo subpatente ao longo da infecção e após o desafio.

Figura 4.34: Animais $CD28^{-/-}$ transferidos com células de animais C57 do grupo patente e subpatente de 200 dias p.i. passam a produzir anticorpos do tipo IgG2a. Animais $CD28^{-/-}$ foram transferidos com células totais de controle ($\blacktriangle$), patente ($\blacksquare$), ou suspensões celulares purificadas, contendo apenas células B^+ , provenientes dos animais controle ($\triangle$) ou patente ($\square$) de 200 dias p.i. (A). Animais $CD28^{-/-}$ foram transferidos com células totais de controle ($\blacktriangle$), subpatente ($\blacksquare$), ou suspensões celulares purificadas, contendo apenas células B^+ , provenientes dos animais controle ($\triangle$) ou subpatente ($\square$) de 200 dias p.i. (B). Em todas as transferências, aproximadamente 20×10^6 células B foram inoculadas em cada animal. Esses camundongos foram então infectados com 10^6 EP e os soros coletados semanalmente até o desafio e a cada 5 dias posteriormente. A presença de anticorpos séricos do tipo IgG2a foi determinada por ensaios imunoenzimáticos utilizando extratos totais do parasita. Cada ponto refere-se a um camundongo e os dados representam apenas um experimento. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (n=3)

Na figura 4.35, assim como na figura 4.31, é possível constatar nos soros dos animais transferidos maiores níveis de IgG1 do que de IgG2a. Além disso, podemos perceber claramente, que as células B provenientes dos animais subpatente são capazes de produzir maiores quantidades de IgG1 do que aquelas dos animais patente, o que novamente nos indica um padrão de resposta predominantemente do tipo Th2 por essas células transferidas.

Figura 4.35: Animais $CD28^{-/-}$ transferidos com células de animais C57 do grupo patente e subpatente de 200 dias p.i. passam a produzir anticorpos do tipo IgG1. Animais $CD28^{-/-}$ foram transferidos com células totais de controle (▲), patente (■), ou suspensões celulares purificadas, contendo apenas células B⁺, provenientes dos animais controle (△) ou patente (□) de 200 dias p.i. (A). Animais $CD28^{-/-}$ foram transferidos com células totais de controle (▲), subpatente (■), ou suspensões celulares purificadas, contendo apenas células B⁺, provenientes dos animais controle (△) ou subpatente (□) de 200 dias p.i. (B). Em todas as transferências, aproximadamente 20×10^6 células B foram inoculadas em cada animal. Esses camundongos foram então infectados com 10^6 EP e os soros coletados semanalmente até o desafio e a cada 5 dias posteriormente. A presença de anticorpos séricos do tipo IgG1 foi determinada por ensaios imunoenzimáticos utilizando extratos totais do parasita. Cada ponto refere-se a um camundongo e os dados representam apenas um experimento. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001. (n=2-3)

5 DISCUSSÃO

A resposta imune ao *P. chabaudi* é caracterizada por intensa ativação policlonal dos linfócitos T e B esplênicos, e complexa rede de interações celulares e moleculares, que levam a uma imprecisa, porém rápida, identificação do parasita na fase precoce da infecção. Porém, conforme a infecção progride, um reconhecimento mais detalhado do parasita é estabelecido e este é acompanhado por uma série de mecanismos efetores capazes de aumentar a destruição do parasita e contribuir para manter a integridade do hospedeiro. No entanto, apesar disso, a malária também é conhecida como uma doença infecciosa caracterizada pela dificuldade na geração e manutenção de memória específica, que seja protetora contra um novo encontro com o parasita, um fenômeno característico de respostas em humanos, sendo a razão pela qual isso ocorre ainda muito discutida. Com essa perspectiva, neste estudo analisamos, detalhadamente, de que forma a exposição dos camundongos a diferentes cargas parasitárias durante a fase inicial da infecção com o *P. chabaudi* AS poderia influenciar a geração e manutenção de linfócitos esplênicos T e B de memória durante um extenso período de tempo. Além disso, avaliamos como esses camundongos conseguiam controlar uma infecção secundária, através da análise de diversos parâmetros imunológicos subsequentes ao desafio, em diferentes dias após a infecção primária.

Os dois modelos de infecção adotados neste trabalho são caracterizados pelas diferentes parasitemias apresentadas por seus animais no início da infecção. De forma geral, no grupo patente os camundongos apresentaram altas parasitemias, sendo que alguns deles ultrapassaram 50% dos eritrócitos infectados, e apesar disso, a cura da infecção ocorreu sem o auxílio de tratamento. Por outro lado, no grupo subpatente os animais foram tratados com cloroquina por dois dias consecutivos sempre que apresentavam 1% de parasitemia e após 2 ou 3 tratamentos, esses animais também foram capazes de eliminar os parasitas do sangue. Passadas 3 semanas da inoculação do parasita, os animais de ambos os grupos já haviam conseguido controlar as parasitemias iniciais, não apresentando parasitas facilmente detectáveis na corrente sanguínea. Wargo e colaboradores (2006) acompanharam as parasitemias de camundongos infectados pelo *P. chabaudi* por até 87 dias e afirmam que na maioria desses animais, os parasitas não são observados, por microscopia óptica, após 50 dias da infecção e nenhum DNA ou RNA de parasita é detectado na corrente sanguínea após 60 dias, com os métodos moleculares PCR e RT-PCR, respectivamente. Em estudo publicado recentemente,

os dados confirmam que animais infectados com este parasita e não tratados com cloroquina são capazes de eliminá-lo completamente em até 3 meses, o que foi demonstrado através de transferência do sangue total para animais RAG^{-/-} (do inglês, *Recombination-activating gene*) e estes não apresentaram parasitemias (Achtman et al., 2007).

A importância de se adotar um modelo de infecção subpatente é no sentido de tentar reproduzir o que acontece em seres humanos, nos quais as infecções geralmente ocorrem a níveis subpatentes e os parasitas não são facilmente detectados através de microscopia. Isto é muito comum em algumas áreas, como no leste do Sudão, onde a transmissão do *P. falciparum* é altamente sazonal e infecções crônicas subpatentes são prevalentes durante a estação seca (Abdel-Wahab et al., 2002; Babiker e Walliker, 1997; Hamad et al., 2002).

A análise da resposta imune durante a fase inicial da infecção nos mostrou que as maiores alterações ocorreram neste período em ambos os grupos de animais estudados. A intensa ativação celular sofrida durante o pico da parasitemia, verificada pela marcação com anticorpos anti-CD69, também pôde ser confirmada pela expressiva esplenomegalia, observada principalmente nos animais não tratados com cloroquina. O aumento no peso dos baços devido à infecção é um fenômeno característico, e bem descrito, tanto em infecções humanas quanto experimentais murinas pelo *Plasmodium* (Alves et al., 1996; Achtman et al., 2003; Looareesuwan et al., 1987). Esta esplenomegalia é reportada em diversos trabalhos, alguns apontando aumento de 5 a 10 vezes (Alves et al., 1996), 7 vezes (Krücken et al., 2005), enquanto outros mostram crescimento maior que 10 vezes o peso original (Sanchez-Torres et al., 2001). Porém, neste trabalho observamos que os animais patente apresentaram médias dos pesos de baço em torno de 4 vezes os valores dos animais não infectados, ao passo que nos camundongos do grupo subpatente essa média foi de apenas 1,5 vezes, resultado semelhante àquele observado por Favila-Castillo e colaboradores (1999), no qual um dos efeitos das baixas parasitemias foi o menor crescimento dos baços. Certamente estes resultados estão diretamente ligados ao grau de ativação sofrida em cada um dos grupos estudados neste trabalho, porém, isto não explica o fato dos animais patente apresentarem menores quantidades de células totais por baço, assim como valores percentuais e totais de T CD4⁺ e CD8⁺ diminuídos quando comparados aos animais subpatente.

Desta forma, é importante adicionarmos nesta análise a morte celular (apoptose) decorrente da infecção. Assim, a intensa ativação policlonal de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ observada durante o pico de parasitemia, e determinada pela marcação com anticorpos específicos para CD69, seguramente foi um dos fatores cruciais para o desencadeamento da forte resposta apoptótica, confirmada pelas altas porcentagens de células marcadas com Anexina V. Resultados semelhantes foram descritos em humanos (Touré-Baldé, 1996; Balde et al., 2000) e em diversos trabalhos com *P. chabaudi*, confirmando os dados apresentados neste estudo (Helmby et al., 2000; Sanchez-Torres et al., 2001; Elias et al., 2005; Elliott et al., 2005). De forma semelhante ao observado por Sanchez-Torres e colaboradores (2001), e contrariamente ao estudo de Helmby e colaboradores (2000), observamos nos animais patente maiores quantidades de células em apoptose nas populações de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺), e não entre as células B220⁺, uma vez que nesta população não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de animais infectados. Outros ativadores policlonais, como LPS (do inglês, *lipopolysaccharide*) ou a enterotoxina B de *Staphylococcus*, também desencadearam forte resposta apoptótica quando injetados em animais, e desta forma, a apoptose pode ser entendida como um mecanismo natural protetor do hospedeiro, no sentido de limitar o excesso de resposta inflamatória e proteger o hospedeiro contra possíveis danos teciduais (Castro et al., 1998; Kawabe e Ochi, 1990). Também em diversas infecções parasitárias a apoptose foi verificada *ex vivo* ou em culturas de esplenócitos provenientes de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* (Estaquier et al., 1997; Fallon et al., 1998), *Trypanosoma cruzi* (Lopes et al., 1995) e *Toxoplasma gondii* (Khan et al., 1996), sendo considerada um mecanismo usado pelos parasitas para escapar ou, pelo menos, retardar a resposta imune. A presença de células apoptóticas no início da infecção também pode ser devida, pelo menos em parte, a produtos do parasita, como descrito para a malária causada pelo *P. falciparum* (Touré-Baldé et al., 1996). Alguns autores também vêem a apoptose como um meio de reduzir o número de linfócitos gerados, alcançando assim, a homeostasia e também, diminuindo o tamanho do baço (Sanchez-Torres et al., 2001). Estes estudos e outros diversos que verificam a apoptose celular em infecções, demonstram a difícil tarefa de definir exatamente onde começa a imunorregulação feita pelo hospedeiro e onde termina a imunomodulação feita pelo parasita (Cockburn e Zavala, 2007).

Neste trabalho observamos claramente uma correlação direta entre os níveis de parasitemia apresentados pelos animais infectados e a porcentagem de células em apoptose, ou seja, a exposição limitada ao parasita permitiu a expansão de células T, que em uma infecção normal com altas parasitemias seriam eliminadas, fato que também foi verificado por Elliott e colaboradores (2005). No entanto, ao contrário dos nossos resultados, Riccio e colaboradores (2003) afirmaram que a apoptose de células T de indivíduos infectados por *P. falciparum* e *P. vivax* não pôde ser diretamente correlacionada com a densidade de parasitas.

A esplenomegalia é uma característica constante na malária, verificada em infecções humanas e murinas (Helmby et al., 2000; Sanchez-Torres et al., 2001; Bereczky et al., 2006), e segundo Roberts e Weidanz (1978), um dos fatores que contribui para isto é a intensa resposta de células T, porém, Favilla-Castillo e colaboradores (1999) acreditam que a alta carga parasitária também é importante para que este fenômeno seja observado. Entre outros diversos fatores que podem explicar o significativo aumento do baço durante a infecção aguda pelo *P. chabaudi*, está o grande desarranjo da estrutura esplênica murina, marcado por mudanças temporárias na distribuição dos leucócitos do baço (Achtman et al., 2003), aliado a um intenso influxo de células ausentes de características de linfócitos B ou T (Helmby et al., 1998), causando um efeito de “diluição” das porcentagens desses linfócitos. Adicionado a isso, existem evidências de que durante a malária, a eritropoiese na medula óssea é ineficiente, com alterações no progenitor eritropoiético, assim como nos sítios de eritropoiese, sendo este órgão incapaz de compensar a perda de eritrócitos (Lamikanra et al., 2007), e desta forma, o baço passa a ter papel central tanto no clareamento do parasita da corrente sanguínea, quanto provendo uma forte resposta hematopoiética (Alves et al., 1996; Grun et al., 1985; Yap e Stevenson, 1992). Por outro lado, a exposição limitada ao parasita, devido às baixas parasitemias dos animais subpatente, foi capaz de ativar os esplenócitos, o que foi confirmado através da *downregulation* dos marcadores CD62L e CD45RB, e *upregulation* do CD44, sem, no entanto, promover intensa esplenomegalia e morte celular dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, como aquela observada nos animais patente, resultado este que pode ser facilmente observado nos gráficos de números totais de células esplênicas.

Apesar das evidentes alterações na fase inicial da infecção, no dia 60 p.i. já é possível observar o retorno de alguns parâmetros a valores semelhantes aos controles, como por exemplo, o peso dos baços, fenômeno que provavelmente está ligado ao fato de que neste momento a arquitetura esplênica inicial também é restaurada após infecção com altas parasitemias (Achtman et al., 2003).

A análise da resposta proliferativa específica de linfócitos T durante a fase inicial da infecção demonstrou, de forma surpreendente, que apesar da proeminente ativação, seguida de morte celular nos animais patente durante a fase aguda da infecção, estes camundongos ainda foram capazes de apresentar altas porcentagens de linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$) proliferando, e esta proliferação é decrescente com o tempo, porém, significativamente maior que os controles até pelo menos 120 dias após a infecção. Em nossos experimentos, a possibilidade da presença de um mitógeno proveniente do parasita e que estivesse promovendo proliferação inespecífica foi descartada, uma vez que as células de animais controle não apresentaram aumento significativo da proliferação quando incubados com EP. Desta forma, estes resultados, inicialmente, divergem de alguns trabalhos afirmando que a intensa apoptose na fase aguda da infecção impede, ou pelo menos dificulta, o estabelecimento da imunidade específica contra o parasita após altas parasitemias (Xu et al., 2002; Hirunpetcharat e Good, 1998; Elliott et al., 2005; Wipasa et al., 2001), uma vez que essa morte celular parece ser seletiva para as células específicas (Xu et al., 2002).

No entanto, linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$) de indivíduos submetidos a seguidas doses muito baixas de EP pelo *P. falciparum* apresentaram forte resposta proliferativa específica quando em novo contato com EP (Pombo et al., 2002), o que confirma nossos resultados obtidos após estimulação dos esplenócitos dos animais subpatente. Ou seja, a exposição limitada ao parasita promoveu intensa expansão dessas populações, sem induzir acentuada morte celular [também verificada por Elliott e colaboradores (2005)], e isto certamente deve ser levado em consideração durante a análise da proliferação nos dois grupos estudados. Assim, no dia 20 p.i., momento em que observamos as maiores porcentagens de células proliferando, os animais subpatente apresentaram números totais de células $CD4^+$ e $CD8^+$ quase três vezes maiores do que aqueles do grupo patente; adicionada a isto, a média de proliferação deste último grupo foi menor, porém não estatisticamente significativa,

no mesmo dia. Portanto, tendo estes dois fatos em mente, podemos verificar que a intensa ativação policlonal inicial desencadeou sim uma deficiência na resposta proliferativa dos animais patente, pois os números absolutos de linfócitos T proliferando ($CD4^+$ e $CD8^+$) foram aproximadamente três vezes menores que aqueles dos animais subpatente. Trabalhos anteriores com antígenos sintéticos (Parish, 1972) e *Leishmania major* (Bretscher et al., 1992) em camundongos também reportaram aumentada e persistente imunidade mediada por célula após administração de baixas doses de antígeno, confirmando os dados discutidos anteriormente.

Outros trabalhos descrevem a resposta proliferativa de esplenócitos observada em curtos períodos após exposição a altas cargas parasitárias. Lucas e colaboradores (1993) demonstraram que esplenócitos murinos obtidos 35 ou 50 dias após a infecção primária com *P. yoelli* apresentaram proliferação significativa contra o *P. falciparum*, e esta foi marcadamente aumentada quando os animais eram submetidos a uma segunda infecção. Hisaeda e colaboradores (2004) também observaram forte resposta proliferativa dos esplenócitos de camundongos infectados por 7 dias com cepa não letal do *P. yoelli* quando essas células foram incubadas com doses crescentes de EP.

Como citado anteriormente, também observamos evidente proliferação de linfócitos T $CD8^+$ nas culturas de esplenócitos em novo contato com o parasita e isso nos pareceu interessante, pois estas células são reconhecidamente importantes para a imunidade na fase pré-eritrocítica, porém, geralmente são consideradas como responsáveis por desempenhar pouca ou nenhuma função na imunidade aos estágios eritrocíticos do *Plasmodium*. No entanto, Sinigaglia e Pink (1985) demonstraram que clones de células T $CD8^+$ isoladas de indivíduos infectados com o *P. falciparum* foram capazes de responder *in vitro* a antígenos específicos. Além disso, Podoba e Stevenson (1991) observaram que animais desprovidos de células T $CD8^+$, apesar de não apresentarem grandes alterações no início da infecção, têm maior dificuldade para eliminar os parasitas na fase tardia, enquanto Mogil e colaboradores (1987) demonstraram que a transferência passiva de células T $CD8^+$ imunes ao *P. yoelli* acelerou a recuperação de recipientes naïve. Alternativamente, essas células podem exercer efeito anti-plasmodial indireto através da produção de IFN- γ . Esta citocina é necessária para ativar macrófagos, aumentando a capacidade fagocítica dessas células e também contribui para a destruição dos parasitas

intraeritrocíticos pela produção de H_2O_2 (Ockenhouse et al., 1984; Ockenhouse e Shear, 1984). Apesar dessas evidências, a verdadeira participação das células T $CD8^+$ na imunidade durante a fase eritrocítica, e de que forma isto ocorre, ainda são pouco conhecidas.

Apesar da existência da proliferação específica de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ em contato com EP, observamos nitidamente um fenômeno de diminuição da resposta diretamente relacionado com o tempo de infecção. Migot e colaboradores (1993) também observaram esta queda na capacidade de resposta das células T $CD4^+$, uma vez que após 5 anos da infecção, e na ausência de re-infecção, essas células ainda apresentavam resposta contra peptídeos de Pf155/RESA (do inglês, *Plasmodium falciparum ring-infected erythrocyte surface antigen*), porém, tanto a frequência quanto a magnitude dessas respostas eram menores do que aquelas detectadas nos mesmos indivíduos 3 anos antes. E em um estudo relacionado com o anterior, a frequência dos precursores das células T proliferando contra o Pf155/RESA foi determinada como sendo de 3-40 por 10^6 PBMCs (do inglês, *peripheral blood mononuclear cells*) (Chougnet et al., 1994), enquanto em regiões de alta transmissão sazonal, a frequência de células T produzindo IFN- γ em resposta ao mesmo antígeno foi notadamente maior, cerca de 10-20 por 10^5 células T (Kabilan et al., 1990).

Esta perda de células T de memória com o tempo também pode ser compreendida como um processo de seleção homeostática, induzindo morte celular em parte dos clones produzidos durante a infecção, com o objetivo de manter o tamanho da população de células de memória, uma vez que esta é finita (Gray, 2002). Gray (2002) também discute que a presença do antígeno estocado nos tecidos linfóides por muitos meses na forma de imunocomplexos na superfície das células dendríticas foliculares pode garantir periódica re-estimulação das células de memória, contribuindo para a manutenção, pelo menos de parte, dessa população. Além disso, sinais do microambiente também podem evitar que essas células entrem em apoptose (Raff, 1992). Antígenos que promovem reação cruzada também podem levar a ocasionais ciclagens dessas células de memória, resgatando-as da morte, pela falta de sinalização e as mantendo no pool de células de memória, em concentrações suficientes para gerar uma resposta eficiente num segundo contato com o parasita (Traggiai et al., 2003). No entanto, vale lembrar o fato de que novas

células de memória são continuamente produzidas durante toda a vida, e sendo o *pool* dessas células, finito, algumas evidências nos levam a acreditar que as células de memória pré-existentes são eliminadas (Selin et al. 1999), contribuindo para a progressiva falta de resposta a um determinado antígeno.

A observação de altas porcentagens de células T proliferando no início da infecção, ao passo que em tempos mais tardios esses valores são reduzidos, nos levou a imaginar que este fato poderia também ser devido a uma deficiência na apresentação de antígenos por parte das APCs dos animais infectados há 200 dias. Ou seja, essas células poderiam estar provendo sinais costimulatórios negativos, como por exemplo, através da expressão de PDL-1 em sua superfície (revisado por Sharpe e Freeman, 2002), inibindo assim, a proliferação dos linfócitos T em resposta à presença do antígeno.

Tendo isto em mente, incubamos células do dia 200 p.i. (pouca proliferação) com células do dia 20 p.i. (intensa proliferação) na tentativa de reverter a baixa resposta proliferativa daquelas células. Porém, como pode ser visto nos resultados, as APCs do dia 20 p.i. não conseguiram estimular os linfócitos T de 200 dias p.i. a ponto destes passarem a proliferar mais. Por outro lado, as células T do dia 20 foram marcadamente estimuladas pelas APCs de 200 dias. Estes resultados nos mostram que, ao contrário do que supomos anteriormente, as APCs do dia 200 p.i. são excelentes estimuladoras e não poderiam ser as responsáveis pela baixa proliferação dos linfócitos T de 200 dias. Portanto, isto nos leva a acreditar que o problema está nos linfócitos T do dia 200, que mesmo em presença de estímulo, não foram capazes de proliferar. Uma das suposições levantadas para explicar a intensa proliferação das células T do dia 20 em contato com as APCs do dia 200 é que nesta última, parte dos linfócitos B presentes na fração APC seria composta de células altamente específicas, com maior afinidade pelo parasita, e extremamente eficientes na apresentação de antígenos, sendo as principais responsáveis pela ativação das células T.

Apesar da falta de resposta proliferativa dos linfócitos T do dia 200, de certa forma estas células ainda conseguem perceber a presença do parasita na cultura, ou seja, mantêm uma memória de reconhecimento, pois é neste dia (200) que observamos a maior quantidade de IL-2 sendo secretada em resposta à presença do parasita na cultura. Isto nos indica que apesar de reconhecerem o antígeno na

cultura, estas células devem ser reguladas a fim de não proliferarem. Uma das possibilidades seria a regulação desempenhada por células T reguladoras (Treg), ou também é possível que tenha ocorrido alguma mudança na função celular, ou seja, as células T CD4⁺ podem estar mais comprometidas com a função de *helper*, para auxiliar a produção de anticorpos pelos linfócitos B, do que com a proliferação.

Para testarmos a hipótese da ação das Treg, adicionamos anticorpos monoclonais anti-CD25 e anti-IL2 nas culturas com EP e observamos a diminuição da proliferação. A princípio, pode-se supor, por estes resultados, que as Treg não estão inibindo a proliferação, porém, este experimento não é totalmente esclarecedor, se considerarmos que células ativadas também expressam CD25 e precisam da IL-2 para proliferarem. Assim, para a determinação do verdadeiro papel das Treg nesta baixa proliferação dos linfócitos T de 200 dias p.i., seria interessante a elaboração de experimentos que selecionassem apenas as Treg, retirando-as da cultura, e então verificar o comportamento dos linfócitos T na presença do antígeno.

Com relação à presença de citocinas no sobrenadante dos esplenócitos de animais patente e subpatente em contato com EP, observamos no início da infecção uma resposta caracteristicamente pró-inflamatória, com significativa produção de IL-2 (porém, em menor concentração do que em tempos mais tardios da infecção), IFN- γ e altas concentrações de TNF- α . De forma semelhante, Perry e colaboradores (2004) observaram que DCs isoladas de camundongos infectados com *P. yoelii* também foram capazes de estimular a produção de IL-2, IFN- γ e TNF- α . A pré-incubação de DCs, provenientes da medula óssea, com esquizontes de *P. chabaudi* também induziu evidente produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ DO.11.10 com TCR transgênico (Langhorne et al., 2004).

A produção inicial de citocina durante a malária murina não letal é claramente do tipo Th1, com resposta pró-inflamatória, porém, segundo Langhorne e colaboradores (2002), esta é transiente, sendo seguida por uma mudança no padrão de resposta para Th2 (Stevenson e Tam, 1993; Langhorne et al., 2002), com produção de IL-5 e IL-4 após a eliminação dos parasitas, o que também pode ser verificado em nossos resultados, nos quais a produção dessas citocinas foi exclusivamente observada no dia 20 p.i., porém, sem qualquer diferença entre os grupos infectados. Embora diversos estudos iniciais indiquem que a resolução da

parasitemia após o pico de infecção é absolutamente dependente de linfócitos T CD4⁺ do tipo Th2 (Helmby et al., 1998; Langhorne et al., 1989; Stevenson e Tam, 1993; Taylor-Robinson et al., 1993), em estudo mais recente, Su e Stevenson (2002) demonstraram que a resposta do tipo 1 é importante não apenas durante a fase aguda para promover uma resposta imune celular eficiente, mas também durante a fase crônica da infecção, auxiliando na resposta humoral. Os dados apresentados nesta tese corroboram esta hipótese, uma vez que posteriormente à fase inicial da infecção observamos a prevalência de resposta do tipo Th1, com a manutenção da produção de citocinas pró-inflamatórias (em resposta ao EP).

A produção de anticorpos parasita-específicos é um componente essencial da imunidade à malária, uma vez que a proteção pode ser observada através da transferência de imunoglobulina sérica de indivíduos imunes para recipientes naïve (Falanga et al., 1984; Cohen et al., 1961; Eling, 1980; Sabchareon et al., 1991). Além disso, em humanos, o isótipo de imunoglobulina também se correlaciona com o grau de proteção ao *Plasmodium*. Assim, adultos africanos clinicamente imunes ao parasita, apresentam uma predominância de isótipos IgG1 e IgG3, em contraste com as primeiras infecções de imigrantes e crianças não imunes, nas quais IgG2 é a sub-classe de imunoglobulina dominante (Bouharoun-Tayoun e Druilhe, 1992; Thelu et al., 1991; Wahlgren et al., 1983).

Neste estudo acompanhamos a produção de anticorpos IgG2a específicos ao parasita ao longo de infecções com diferentes cargas antigênicas na fase aguda. Sendo este isótipo conhecido por apresentar maior atividade protetora contra o *P. chabaudi*, camundongos apresentando altos níveis dessa proteína sérica são considerados imunes contra o parasita.

Em nossos resultados podemos observar, claramente, que ao passo que a resposta proliferativa de linfócitos T decai, a resposta humoral, representada pela produção de IgG2a sérico, apresenta melhora na capacidade de produção deste anticorpo, principalmente após o desafio. Resultados semelhantes foram obtidos em estudo no qual durante 5 anos a transmissão de malária foi reduzida devido a tratamentos com antimaláricos, o que resultou em significativa queda nos títulos e repertório de anticorpos contra a malária (Cornille-Brogger et al., 1978; Molineaux et al., 1978). No entanto, os altos níveis dessas proteínas foram rapidamente recuperados em uma associação direta com a prevalência de parasitemia, uma vez

que o tratamento havia sido suspenso (Cornille-Brogger et al., 1978). Outros estudos também reportam o rápido aumento dos títulos de anticorpos durante um período de transmissão de malária, em áreas de baixa intensidade ou esporádica transmissão, como o Sudão (Vande Waa et al., 1984) e Madagascar (Chougnnet et al., 1990; Migot et al., 1993).

Isto pode estar relacionado com o fato de que células B secretoras de anticorpo, assim como seus precursores (células B de memória) serem de longa duração, mesmo na ausência de antígeno. Migot e colaboradores (1993) detectaram células B produzindo anticorpos em resposta à re-estimulação *in vitro*, após 8 anos da última exposição à malária. Além disso, em indivíduos que haviam sido infectados anteriormente com malária, a frequência de células B de sangue periférico que foram capazes de produzir anticorpos após re-estimulação foi de 0,1 a 1% (Wen et al., 1987).

Apesar do evidente aumento na produção de anticorpos específicos após o desafio, observamos, ao longo de toda a análise, que os animais do grupo patente, de forma geral, sempre apresentaram menores quantidades que anticorpos específicos do tipo IgG2a do que os animais do grupo subpatente, e este resultado pôde ser confirmado em vários protocolos experimentais, entre eles, os ensaios de ELISA, que revelaram as menores D.O.s para o grupo patente; os ensaios de marcação com YOYO-1, através dos quais podemos perceber que menores quantidades de anticorpos dos animais patente estavam ligadas aos EP, e pelas transferências de células B, através das quais também observamos menores D.O.s nos soros dos animais CD28^{-/-} que receberam células dos animais patente. Sabendo que a única diferença entre os dois grupos infectados é a carga parasitária à qual foram submetidos durante a fase inicial da infecção, isto nos leva a acreditar que este é um fator crucial a ser considerado nas nossas análises.

Desta forma, acreditamos que durante a fase aguda da infecção patente, a enorme quantidade de parasitas levando a uma intensa ativação policlonal, seguida de grande produção de anticorpos, somada ainda à expressiva morte de linfócitos T CD4⁺, provavelmente ocasionou uma *downregulation* na função dos linfócitos B, o que é confirmado pelos níveis de anticorpos IgG2a produzidos ao longo de nossa análise. Portanto, apesar de grandes alterações não terem sido observadas no compartimento de células B, com relação aos valores absolutos, certamente o modelo de infecção patente gerou linfócitos B qualitativamente diferentes daqueles

observados nos animais subpatente, e isto pôde ser comprovado pelos experimentos de transferência, nos quais os camundongos deficientes que receberam linfócitos B provenientes de animais patente apresentaram D.O.s expressivamente menores de IgG2a que aqueles transferidos com células de animais subpatente, embora o número de linfócitos B totais transferidos tenha sido o mesmo.

Apesar dessa menor produção de anticorpos específicos, os animais do grupo patente possuem capacidade comparável àqueles do grupo subpatente, para desenvolver a imunidade contra o desafio, conforme visto nas parasitemias. Resultados semelhantes foram observados por Elliott e colaboradores (2005). Uma possível explicação para este fato é a de que a quantidade de anticorpos produzidos pelos animais patente seja estritamente aquela necessária para resolver a parasitemia, enquanto os animais subpatente são capazes de produzir além do necessário. Com esta hipótese em mente, surgiu o seguinte questionamento: qual seria a razão dessa maior produção de anticorpos específicos pelos animais subpatente?

Na tentativa de responder esta questão, imaginamos que a exposição dos animais subpatente aos parasitas recrudescentes poderia ter induzido a produção de anticorpos contra variantes adicionais que não foram apresentadas pelos parasitas do pico primário, uma vez que estudos anteriores demonstraram que durante a infecção pelo *P. chabaudi*, os parasitas de picos recrudescentes são capazes de expressar antígenos variantes de superfície que são diferentes daqueles expressos pelos parasitas que predominam o pico primário (McLean et al., 1986; McLean et al., 1982; Phillips et al., 1997).

Portanto, para determinarmos se esta hipótese estava correta, desafiamos os animais com parasitas de picos recrudescentes, e para a nossa surpresa, ambos os grupos novamente apresentaram-se igualmente protegidos, sendo que em um dos dias, a parasitemia dos animais subpatente foi maior. Desta forma, esta questão continua em aberto, demonstrando que o desenvolvimento da resposta imune contra este parasita não é tão simples.

Também é importante destacarmos o fato de que os animais CD28^{-/-} transferidos com as células de camundongos de 200 dias p.i. apresentam significativa produção de anticorpos específicos do tipo IgG1, com D.O.s maiores do

que aquelas obtidas para IgG2a. Como discutido para o isótipo IgG2a, os camundongos do grupo patente também produziram menores quantidades de IgG1 em comparação com os animais subpatente. Essa produção de IgG1 pelas células de 200 dias p.i. nos indica que com o passar do tempo ocorre uma predominância de resposta do tipo 2. Essa idéia é corroborada pela observação de que anticorpos IgG1 específicos também foram detectados no soro dos animais desafiados 120 e 200 dias após a infecção primária, mas não antes. No entanto, contrariamente ao esperado, a produção de citocinas Th2 (IL-4 e IL-5) só foi observada no dia 20 da infecção, mas não no período subsequente. Uma possibilidade para explicar esse fenômeno é a de que as células Th2 presentes no dia 20 p.i. são capazes de induzir a mudança de classe para IgG1, mas a produção destes anticorpos em grandes quantidades só ocorre em tempos mais tardios após a infecção primária, quando a imunidade está em queda e a resposta humoral passa a ser mais intensa.

Como mencionado e discutido anteriormente, a resposta humoral apresenta melhora com o tempo, principalmente após o desafio. Porém, por outro lado, observamos nitidamente queda na imunidade após o desafio no dia 200 p.i., o que à primeira vista nos parece totalmente em desacordo com a frase anterior. Porém, se analisarmos cuidadosamente este dia, veremos que ao mesmo tempo em que a imunidade diminui, ou seja, ocorrem maiores parasitemias após o desafio, a resposta dos linfócitos T CD4⁺ ao EP também é reduzida, como discutida anteriormente. Isto nos leva a acreditar que essa resposta dos linfócitos T também seja de fundamental importância para a manutenção da imunidade, possivelmente agindo de forma direta.

Xu e colaboradores (2000) demonstraram que células T CD4⁺, agindo independentemente de anticorpos, contribuíram para a imunidade protetora contra a infecção pelo *P. chabaudi* após imunização com AMA-1 (do inglês, *apical membrane antigen 1*). Trabalhos utilizando camundongos deficientes em linfócitos B ou linhagens celulares de células T em animais normais demonstraram que linfócitos T CD4⁺ de memória sozinhos são capazes de proteger contra algumas espécies de malária murina (Grun e Weidanz, 1981, Tsuji et al., 1990, Taylor-Robinson et al., 1993).

A importância deste efeito de proteção desempenhada pelo linfócito T CD4⁺ pode ser facilmente visualizada nos animais transferidos com as células de

camundongos de 200 dias p.i. na ausência de células CD4⁺ e posteriormente desafiados. Nos primeiros dias após o desafio esses animais apresentam níveis de parasitemia muito semelhantes àqueles dos animais C57 desafiados. Por outro lado, animais CD28^{-/-} transferidos com células do grupo controle, apesar de não produzirem quantidades significativas de anticorpos específicos, estavam totalmente protegidos contra o desafio com 10⁸ EP, confirmando mais uma vez o papel essencial de linfócitos T CD4⁺ na proteção contra o *P. chabaudi* e mostrando que os anticorpos não são o único mecanismo de proteção contra este parasita. Diversos estudos anteriores também utilizando transferência adotiva de populações de purificadas e enriquecidas células T demonstraram a importância dos linfócitos T CD4⁺ na imunidade protetora contra o *P. yoelii* (Brinkmann et al., 1985; Jayawardena et al., 1982; Mogil et al., 1987; Vinetz et al., 1990) e *P. chabaudi* (Cavacini et al., 1986; Suss et al., 1988).

Neste trabalho, de forma geral, observamos que a carga parasitária de *P. chabaudi* tem influência direta principalmente na fase aguda da infecção, promovendo proeminente ativação e morte celular, principalmente de células T, em presença de altas doses de antígeno. Apesar disso, após este período, os parâmetros apresentam valores semelhantes entre os dois grupos, e podemos observar claramente que, embora submetidos a baixas parasitemias, o modelo de infecção subpatente promoveu, de forma eficiente, o desenvolvimento de imunidade protetora contra um segundo contato com o parasita e, além disso, também gerou células B com maior capacidade de produzir anticorpos específicos em resposta ao parasita. Porém, ao contrário do esperado, essa característica não significou maior proteção, de forma que ambos os grupos estiverem igualmente protegidos contra o desafio durante toda a análise. No entanto, na fase mais tardia observamos concomitantemente, diminuição da resposta proliferativa de linfócitos T e a queda da imunidade, fatos que ao nosso ver, estão intimamente ligados, ou seja, a permanência da proteção depende de células T efetoras, não apenas de anticorpos.

Apesar deste detalhado trabalho, diversas questões continuam em aberto, o que torna este assunto ainda mais fascinante, no sentido de compreender que mecanismos estão envolvidos na geração e manutenção de células de memória que sejam de longa duração, o que pode ser crucial para a elaboração de estratégias que promovam maior proteção de longo prazo contra o *Plasmodium*.

6 CONCLUSÕES

1. A infecção patente foi caracterizada pela intensa ativação dos linfócitos T e B esplênicos, seguida de maciça morte celular e esplenomegalia, ao passo que a exposição limitada ao parasita, que ocorreu na infecção subpatente, foi capaz de promover menor ativação destas células, e conseqüentemente, menor morte celular e aumento do baço;
2. O compartimento de linfócitos esplênicos mais afetado nos camundongos do grupo patente, em decorrência da intensa ativação, foi o de linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$) em tempos precoces após a infecção. Apesar disso, essas células foram capazes de proliferar em resposta ao parasita, porém, em menor quantidade que aquela observada nos animais subpatente, considerando-se os números totais de células respondedoras por baço;
3. Apesar da proeminente ativação celular na fase aguda da infecção, os animais do grupo patente apresentam, no dia 60 p.i., grande parte dos parâmetros relativos aos linfócitos T e B de memória semelhantes aos dos animais subpatente;
4. Nos dois grupos de camundongos infectados, a proliferação *in vitro* de linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$) em resposta a eritrócitos parasitados diminui progressivamente com o passar do tempo após a infecção, assim como a esplenomegalia e as porcentagens de linfócitos T $CD4^+$ que adquirem um fenótipo característico de células de memória ativadas após o desafio *in vivo* com eritrócitos parasitados;
5. A produção de citocinas por esplenócitos estimulados com eritrócitos parasitados é semelhante para os camundongos dos grupos patente e subpatente, com valores máximos sendo observados nos dias 20 e 120 após a infecção. Apesar da predominante produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α), no dia 20 também observa-se a produção de IL-4 e IL-5;
6. A diminuição da resposta proliferativa dos linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$, com o passar do tempo após a infecção, não é o resultado de alterações nas populações de células apresentadoras de antígenos;

7. Os camundongos do grupo patente apresentam uma deficiência na manutenção dos níveis séricos de anticorpos IgG2a específicos, tanto para antígenos das formas intra-eritrocíticas, como para antígenos expressos na superfície dos eritrócitos infectados.

8. Nos dois grupos de camundongos infectados, a capacidade de produzir anticorpos IgG2a e IgG1 específicos em resposta ao desafio com eritrócitos parasitados aumenta com o decorrer do tempo após o primeiro contato com o parasita;

9. A capacidade de controlar o desafio com eritrócitos parasitados, mesmo para aqueles obtidos em períodos tardios da infecção (parasitas recrudescentes), é similar entre os camundongos dos grupos patente e subpatente. Em ambos os casos, a imunidade diminui com o passar do tempo após a infecção primária;

10. Os linfócitos T CD4⁺ obtidos no dia 200 após a infecção, apesar de não proliferarem em resposta a eritrócitos parasitados, quando transferidos para camundongos CD28^{-/-}, auxiliam na produção de anticorpos IgG2a e IgG1 específicos. Essas células também são capazes de transferir imunidade contra o *P. chabaudi*;

11. Os camundongos submetidos à infecção subpatente possuem, 200 dias após o contato com o parasita, uma população de células B com maior capacidade de produzir anticorpos IgG2a e IgG1 específicos, quando comparada com a de animais do grupo patente;

12. A perda da imunidade observada com o decorrer do tempo após a infecção primária não se correlaciona com os níveis séricos de anticorpos IgG2a e IgG1 específicos, que são significativamente maiores nos camundongos do grupo subpatente, mas parece estar associada com a queda progressiva da resposta dos linfócitos T que acontece nos dois grupos de animais infectados.

Os principais resultados apresentados nesta tese estão incluídos em um manuscrito em fase final de preparação, e que pretendemos submeter ao The Journal of Immunology em breve, sob o título:

Analysis of T- and B-cell memory after untreated and drug-treated blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria

Ana Paula Freitas do Rosário, Sandra M. Muxel, Sergio M. Rodriguez, Luiz R. Sardinha, Cláudia A. Zago, Sheyla Castillo-Méndez, José M. Alvarez and Maria Regina D'Império Lima.

Durante o período do desenvolvimento desta tese, também participei dos seguintes trabalhos publicados por nosso grupo de pesquisa:

Elias, R.M.; Sardinha, L.R.; Bastos, K.R.; Zago, C.A.; **Silva, A.P.**; Alvarez, J.M.; Lima, M.R. *“Role of CD28 in Polyclonal and Specific T and B Cell Responses Required for Protection Against Blood Stage Malaria”*. Journal of Immunology. 174(2):790-9. Jan/2005.

Castillo-Méndez, S.I.; Zago, C.A.; Sardinha, L.R.; **Freitas do Rosário, A.P.**; Alvarez, J.M.; D'Império Lima, M.R. *“Characterization of the spleen B-cell compartment at the early and late blood-stage Plasmodium chabaudi malaria”*. Scand J Immunol. 66(2-3):309-19. Aug-Sep/2007.

BIBLIOGRAFIA

Abdel-Wahab A, Abdel-Muhsin AM, Ali E, Suleiman S, Ahmed S, Walliker D, Babiker HA. Dynamics of gametocytes among *Plasmodium falciparum* clones in natural infections in an area of highly seasonal transmission. J Infect Dis. 2002; 185(12):1838-42.

Achtman AH, Bull PC, Stephens R, Langhorne J. Longevity of the immune responses and memory to blood-stage malaria infection. Curr Top Microbiol Immunol. 2005; 297:71-102.

Achtman AH, Khan M, MacLennan ICM, Langhorne J. *Plasmodium chabaudi chabaudi* Infection in Mice Induces Strong B Cell Responses and Striking But Temporary Changes in Splenic Cell Distribution. The Journal of Immunology. 2003; 171:317-24.

Achtman AH, Stephens R, Cadman ET, Harrison V, Langhorne J. Malaria-specific antibody responses and parasite persistence after infection of mice with *Plasmodium chabaudi chabaudi*. Parasite Immunol. 2007; 29:435-44.

Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. Science. 1996; 272:54-60.

Alencar BCG, Araújo AFS, Penido MLO, Gazzinelli RT, Rodrigues MM. Cross-priming of long lived protective CD8⁺ T cells against *Trypanosoma cruzi* infection: Importance of a TLR9 agonist and CD4⁺ T cells. Vaccine. 2007; 25:6018-27.

Alves HJ, Weidanz W, Weiss L. The spleen in murine *Plasmodium chabaudi adami* malaria: stromal cells, T lymphocytes, and hematopoiesis. Am J Trop Med Hyg. 1996; 55:370-8.

Al-Yaman F, Genton B, Anders RF, Falk M, Triglia T, Lewis D et al. Relationship between humoral response to *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 and malaria morbidity in a highly endemic area of Papua New Guinea. Am J Trop Med Hyg. 1994; 51:593-602.

Al-Yaman F, Genton B, Kramer KJ, Chang SP, Hui GS, Baisor M et al. Assessment of the role of naturally acquired antibody levels to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in protecting Papua New Guinean children from malaria morbidity. Am J Trop Med Hyg. 1996; 54:443-8.

Anam K, Afrin F, Banerjee D, Pramanik N, Guha SK, Goswami RP et al. Differential decline in *Leishmania* membrane antigen-specific immunoglobulin G(IgG), IgM, IgE, and IgG subclasses antibodies in Indian kala-azar patients after chemotherapy. Infect Immun. 1999; 67:6663-9.

De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2004 May 06].

Asahi T, Ueda K, Hidaka Y, Miyazaki C, Tanaka Y, Nishima S. Twenty-three-year follow-up study of rubella antibodies after immunization in a closed population, and serological response to revaccination. *Vaccine*. 1997; 15:1791-5.

Avrameas S, Ternynck T, Guesdon JL. Coupling of enzymes to antibodies and antigens. *Scand J Immunol*. 1979; 8:7-23.

Babiker HA, Walliker D. Current views on the population structure of *Plasmodium falciparum*: Implications for control. *Parasitol Today*. 1997; 13:262-7.

Baird JK, Jones TR, Danudirgo EW, Annis BA, Bangs MJ, Baski H et al. Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 1991; 45:65-76.

Baird JK, Krisin, Barcus MJ, Elyazar IR, Bangs MJ, Maguire JD, Fryauff DJ, Richie TL, Sekartuti, Kalalo W. Onset of clinical immunity to *Plasmodium falciparum* among Javanese migrants to Indonesian Papua. *Ann Trop Med Parasitol*. 2003; 97:557-64.

Baird JK. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(11):4075-83.

Balde AT, Aribot G, Tall A, Spiegel A, Roussilhon C. Apoptosis modulation in mononuclear cells recovered from individuals exposed to *Plasmodium falciparum* infection. *Parasite Immunol* 2000; 22:307-18.

Barkan D, Ginsburg H, Golenser J. Optimization of flow cytometric measurement of parasitaemia in *plasmodium*-infected mice. *Int J Parasitol*. 2000; 30(5):649-53.

Becker TC, Wherry EJ, Boone D, Murali-Krishna K, Antia R, Ma A et al. Interleukin-15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J Exp Med*. 2002; 195:1541-8.

Bereczky S, Dolo A, Maiga B, Hayano M, Granath F, Montgomery SM, Daou M, Arama C, Troye-Blomberg M, Doumbo OK, Farnet A. Spleen enlargement and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* infection in two ethnic groups with different malaria susceptibility in Mali, West Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2006; 100:248-57.

Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science*. 2002; 298:2199-202.

Bouchaud O, Cot M, Kony S, Durand R, Schiemann R, Ralaimazava P et al. Do African immigrants living in France have long-term malarial immunity? *Am J Trop Med Hyg*. 2005; 72(1):21-5.

Bouharoun-Tayoun H, Druilhe P. *Plasmodium falciparum* malaria: evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity. *Infect Immun*. 1992; 60:1473-81.

Braga EM, Fontes CJF, Krettli AU. Persistence of humoral responses against sporozoite and blood-stage malaria antigens 7 years after a brief exposure to *Plasmodium vivax*. J Infect Dis. 1998; 177:1132-5.

Bretscher PA, Wei G, Menon JN, Bielefeldt-Ohmann H. Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania major*. Science. 1992; 257:539-42.

Brinkmann V, S. Kaufmann HE, Simon MM. T cell-mediated immune response in murine malaria: differential effects of antigen-specific Lyt T cell subset in recovery from infection in normal and T cell-deficient mice. Infect Immun. 1985; 473:737-43.

Castro A, Bemmer V, Nobrega A, Coutinho A, Truffa-Bachi P. Administration to mouse of endotoxin from gram-negative bacteria leads to activation and apoptosis of T lymphocytes. Eur J Immunol. 1998; 28:488-95.

Cavacini LA, Long CA., Weidanz WP. T-cell immunity in murine malaria: adoptive transfer of resistance to *Plasmodium chabaudi adami* in nude mice with splenic T cells. Infect Immun. 1986; 52:637-43.

Cavinato RA, Bastos KRB, Sardinha LR, Elias RM, Alvarez JM, D'Império Lima MR. Susceptibility of the different blood forms of *Plasmodium chabaudi chabaudi* to hyperimmune serum, IgG1, IgG2a and F(ab')₂ fragments. Parasite Immunol. 2001; 23:587-97.

Cawthraw SA, Feldman RA, Sayers AR, Newell DG. Long-term antibody responses following human infection with *Campylobacter jejuni*. Clin Exp Immunol. 2002; 130:101-6.

Chimanuka B, Francois G, Timperman G, Heyden YV, Holenz J, Plaizier-Vercammen J, Bringmann G. A comparison of the stage-specific efficacy of chloroquine, artemether and dioncophylline B against the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi chabaudi* in vivo. Parasitol Res. 2001; 87: 795-803.

Chougnet C, Deloron P, Lepers JP, Tallet S, Rason MD, Astagneau P, Savel J, Coulanges P. Humoral and cell mediated immune responses to the *Plasmodium falciparum* antigens PF155/RESA and CS protein: seasonal variations in a population recently reexposed to endemic malaria. Am J Trop Med Hyg. 1990; 43:234-42.

Chougnet C, Henzel D, Diakhate L, Imbert P, Bouchaud O, Deloron P. Quantification of T cells reactive to Pf155/RESA peptides in *Plasmodium falciparum*-exposed individuals. Res Immunol. 1994; 145:257-266.

Cockburn IA, Zavala F. T cell memory in malaria. Curr Opin Immunol. 2007; 19:424-9.

Cohen S, Macgregor IA, Carrington S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. Nature. 1961; 192:733-7.

Cornille-Brogger R, Mathews HM, Storey J, Ashkar TS, Brogger S, Molineaux L. Changing patterns in the humoral immune response to malaria before, during, and after the application of control measures: a longitudinal study in the West African savanna. *Bull World Health Organ.* 1978; 56:579-600.

Cox J, Semoff S, Hommel M. *Plasmodium chabaudi*: a rodent malaria model for *in vivo* and *in vitro* cytoadherence of malaria parasites in the absence of knobs. *Parasite Immunol.* 1987; 9(5):543-61.

Currier J, Beck HP, Currie B, Good MF. Antigens released at schizont burst stimulate *Plasmodium falciparum* specific CD4⁺ T cells from non-exposed donors: potential for crossreactive memory T cells to cause disease. *Int Immunol.* 1995; 7:821-33.

D'Império Lima MR, Alvarez JM, Furtado GC, Kipnis TL, Coutinho A, Minóprio P. Ig-isotype patterns of polyclonal and parasite-specific B cell response to *Plasmodium chabaudi chabaudi* correlate with IFN- γ and IL-4 interleukin production and with CD45RB expression by CD4⁺ spleen cells. *Scan J Immunol.* 1996; 43:263-70.

Daniel Ribeiro CT, Alfred C, Monjour L, Gentilini M. Normal frequency of anti-thyroglobulin antibodies in hyperendemic areas of malaria: relevance to the understanding of auto-antibody formation in Malaria. *Trop Geogr Med.* 1984a; 36: 323-8.

Daniel Ribeiro CT, Zanini G. Autoimmunity and malaria: what are they doing together? *Acta Tropica.* 2000; 76:205-21.

Daniel Ribeiro CT. Polyclonal B-cell activation: what have we learned from the study of malaria? *Mem I Oswaldo Cruz.* 1988; 83:633-48.

Davidkin I, Valle M, Julkunen I. Persistence of anti-mumps virus antibodies after a two-dose MMR vaccination. A nine-year follow-up. *Vaccine.* 1995; 13:1617-22.

Doolan DL, Hoffman SL. Pre-erythrocytic stage immune effector mechanisms in *Plasmodium* spp. infections. *Phi Fans Roy Sot Lond.* 1997; 352:1361-7.

Druilhe P, Predier O, Marc JP, Miltgen F, Mazier D, Parent G. Levels of antibodies to *Plasmodium falciparum* sporozoite surface antigens reflect malaria transmission rates and are persistent in the absence of reinfection. *Infect Immun.* 1986; 53: 393-7.

Dunachie SJ, Hill AV. Prime-boost strategies for malaria vaccine development. *J Exp Biol.* 2003; 206: 3771-9.

Egan AF, Morris J, Barnish G, Allen S, Greenwood BM, Kaslow DC et al. Clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria is associated with serum antibodies to the 19-kDa Cterminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP-1. *J Infect Dis.* 1996; 173:765-9.

Elias RM, Sardinha LR, Bastos KRB, Zago CA, da Silva AP, Alvarez JM, Lima MR. Role of CD28 in polyclonal and specific T and B cell responses required for protection against blood stage malaria. *J Immunol.* 2005; 174:790-9.

Eling WM. *Plasmodium berghei* premunition, sterile immunity, and loss of immunity in mice. *Exp Parasitol.* 1980; 49:89-96.

Elliott SR, Kuns RD, Good MF. Heterologous Immunity in the Absence of Variant-Specific Antibodies after Exposure to Subpatent Infection with Blood-Stage Malaria. *Infect Immun.* 2005; 73(4):2478-85.

Esser MT, Marchese RD, Kierstead LS, Tussey LG, Wang F, Chirmule N, Washabaugh MW. Memory T cells and vaccines. *Vaccine.* 2003; 21:419-30.

Estaquier J, Marguerite M, Sahuc F, Bessis N, Auriault C, Ameisen JC. Interleukin-10-mediated T cell apoptosis during the T helper type 2 cytokine response in murine *Schistosoma mansoni* parasite infection. *Eur Cytokine Netw.* 1997; 8:153-160.

Falanga PB, D'Império Lima MR, Coutinho A, Pereira Da Silva L. Isotypic pattern of the polyclonal B cell response during primary infection by *Plasmodium chabaudi* in normal and immune-protected mice. *Eur J Immunol.* 1987; 17:599-603.

Falanga PB, Franco Da Silveira JF, Pereira Da Silva L. Protective immune response to *Plasmodium chabaudi*, developed by mice after drug controlled infection or vaccination with parasite extracts: analysis of stage specific antigens from the asexual blood cycle. *Parasite Immunol.* 1984; 6:529-43.

Fallon GP, Smith P, Dunne DW. Type 1 and type 2 cytokine producing mouse CD4+ and CD8+ T cells in acute *Schistosoma mansoni* infection. *Eur J Immunol.* 1998; 28:1408-16.

Favila Castillo L, Monroy Ostria A, Garcia Tapia D. *Plasmodium chabaudi chabaudi*: Effect of low parasitemias on immunity in CB6F1 mice. *Exp Parasitol.* 1999; 92:73-80.

Freeman RR, Parish CRF. *Plasmodium yoelii*: antibody and the maintenance of immunity in BALB/c mice. *Exp Parasitol.* 1981; 52:18-24.

Goldrath AW, Sivakumar PV, Glaccum M, Kennedy MK, Bevan MJ, Benoist C, Mathis D, Butz EA. Cytokine requirements for acute and basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells. *J Exp Med.* 2002; 195:1515-22.

Good MF, Berzofsky JA, Miller LH. The T cell response to the malaria circumsporozoite protein: an immunological approach to vaccine development. *Annu Rev Immunol.* 1988; 6:663-88.

Good MF, Doolan DL. Immune effector mechanisms in malaria. *Curr Opin Immunol.* 1999; 11:412-9.

Good MF, Xu H, Wykes M, Engwerda CR. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. *Annu Rev Immunol.* 2005; 23:69-99.

Goodier M, Targett GAT. Evidence for CD4⁺ T cell responses common to *Plasmodium falciparum* and recall antigens. *Int Immunol.* 1997; 9:1857-65.

Gray D, Matzinger P. T cell memory is short-lived in the absence of antigen. *J Exp Med.* 1991; 174(5):969-74.

Gray D. A role for antigen in the maintenance of immunological memory. *Nat Rev.* 2002; 2:60-65.

Greenwood MB, Bradley AK, Greenwood AM, Byass P, Jammeh K, Marsh K, Tulloch S, Oldfield FS, Hayes R. Mortality and morbidity from malaria among children in rural area of The Gambia, West Africa. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg.* 1987; 81:478-86.

Grun JL, Long CA, Weidanz WP. Effects of splenectomy on antibody-independent immunity to *Plasmodium chabaudi adami* malaria. *Infect Immun.* 1985; 48:853-8.

Grun JL, Weidanz WP. Immunity to *Plasmodium chabaudi adami* in the B-cell-deficient mouse. *Nature.* 1981; 290(5802):143-5.

Gurunathan S, Prussin C, Sacks DL, Seder RA. Vaccine requirements for sustained cellular immunity to an intracellular parasitic infection. *Nat Med.* 1998; 4(12):1409-15.

Hafalla JCR, Cockburn IA, Zavala F. Protective and pathogenic roles of CD8⁺ T cells during malaria infection. *Parasite Immunol.* 2006; 28:15-24.

Hamad AA, Nugud Ael H, Arnot DE, Giha HA, Abdel-Muhsin AM, Satti GM, Theander TG, Creasey AM, Babiker HA, Elnaiem DE. A marked seasonality of malaria transmission in two rural sites in eastern Sudan. *Acta Trop.* 2002; 83:71-82.

Helmby H, Jonsson G, Troye-Blomberg M. Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. *Infect Immun.* 2000; 68:1485-90.

Helmby H, Kullberg M, Troye-Blomberg M. Expansion of IL-3-responsive IL-4-producing non-B non-T cells correlates with anemia and IL-3 production in mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria. *Eur J Immunol.* 1998; 28:2559-70.

Hirunpetcharat C, Good MF. Deletion of *Plasmodium berghei* specific CD4⁺ T cells adoptively transferred into recipient mice after challenge with homologous parasite. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:1715-20.

Hisaeda H, Maekawa Y, Iwakawa D, Okada H, Himeno K, Kishihara K et al. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Med.* 2004; 10(1):29-30.

Hoffman SL, Franke ED, Hollingdale MR, Druilhe P. Attacking the infected hepatocyte. In *Malaria Vaccine Development: A Multi-immune Response Approach*. Edited by Hoffman SL. Washington, DC: Am Soc Microbiol Press. 1996; 35-76.

Hoffman SL, Crutcher JM, Puri SK, Ansari AA, Villinger F, Franke ED, Singh PP, Finkelman F, Gately MK, Dutta GP, Sedegah M. Sterile protection of monkeys against malaria after administration of interleukin-12. *Nat Med*. 1997; 3:80-3.

Ing R, Gros P, Stevenson MM. Interleukin-15 enhances innate adaptive immune responses to blood-stage malaria infection in mice. *Infect Immun*. 2005; 73:3172-7.

Jarra W, Brown KN. Protective immunity to malaria: studies with cloned lines of *Plasmodium chabaudi* and *P. berghei* in CBA/Ca mice. I. The effectiveness and inter- and intra-species specificity of immunity induced by infection. *Parasite Immunol*. 1985; 7:595-606.

Jarra W, Hills LA, March JC, Brown KN. Protective immunity to malaria. Studies with cloned lines of *Plasmodium chabaudi chabaudi* and *P. berghei* in CBA/Ca mice. II. The effectiveness and inter- or intra-species specificity of the passive transfer of immunity with serum. *Parasite Immunol*. 1986; 8:239-54.

Jarra W. Studies on the induction and expression of protective immunity in rodent malaria: *Plasmodium berghei* and *P. c. chabaudi* infections of inbred mice. Ph.D. thesis. Brunel University, London, United Kingdom. 1982.

Jayawardena AN, Murphy DB, Janeway CA, Gershon RK. T cell-mediated immunity in malaria. The Ly phenotype of T cells mediating resistance to *Plasmodium yoelii*. *J Immunol*. 1982; 129:377-81.

Jelinek T, Schulte C, Behrens R, Grobusch MP, Coulaud JP, Bisoffi Z. Imported *Falciparum* malaria in Europe: sentinel surveillance data from the European network on surveillance of imported infectious diseases. *Clin Infect Dis*. 2002; 34:572-6.

Kabilan L, Troye-Blomberg M, Andersson G, Riley EM, Ekre HP, Whittle HC et al. Number of cells from *Plasmodium falciparum*-immune donors that produce gamma interferon in vitro in response to Pf155/RESA, a malaria vaccine candidate antigen. *Infect Immun*. 1990; 58:2989-94.

Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2:251-62.

Kalams SA, Goulder PJ, Shea AK, Jones NG, Trocha AK, Ogg GS, Walker BD. Levels of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T-lymphocyte effector and memory responses decline after suppression of viremia with highly active antiretroviral therapy. *J Virol*. 1999; 73(8):6721-8.

Kalia V, Sarkar S, Gourley TS, Rouse BT, Ahmed R. Differentiation of memory B and T cells. *Curr Opin Immunol*. 2006; 18:255-64.

Kanai T, Thomas EK, Yasutomi Y, Letvin NL. IL-15 stimulates the expansion of AIDS virus-specific CTL. *J Immunol.* 1996; 157:3681-7.

Kanegane H, Tosato G. Activation of naive and memory T cells by interleukin-15. *Blood.* 1996; 88:230-5.

Karrer U, Lopez Macias C, Oxenius A, Odermatt B, Bachmann MF, Kalinke U et al. Antiviral B cell memory in the absence of mature follicular dendritic cell networks and classical germinal centers in TNFR1 mice. *J Immunol.* 2000; 164:768-78.

Kassiotis G, Garcia S, Simpson E, Stockinger B. Impairment of immunological memory in the absence of MHC despite survival of memory T cells. *Nat Immunol.* 2002; 3:244-50.

Kawabe Y, Ochi A. Selective anergy of Vb8+, CD4+ T cells in *staphylococcus* enterotoxin B-primed mice. *J Exp Med.* 1990; 172:1065-70.

Khan IA, Matsuura T, Kasper LH. Activation-mediated CD4+ T cell unresponsiveness during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Int Immunol.* 1996; 8:887-96.

Khanolkar A, Fuller MJ, Zajac AJ. CD4 T cell-dependent CD8 T cell maturation. *J Immunol.* 2004; 172:2834-44.

Kleinschmidt I, Sharp B. Patterns in age specific malaria incidence in a population exposed to low levels of malaria transmission intensity. *Trop Med Int Health.* 2001; 6:986-91.

Klotz FW, Scheller LF, Seguin MC, Kumar N, Marletta MA, Green SJ, Azad AF. Co-localization of inducible nitric oxide synthase and *Plasmodium berghei* in hepatocytes from rats immunized with irradiated sporozoites. *J Immunol.* 1995; 154:3391-5.

Krücken J, Mehnert LI, Dkhil MA, El-Khadragy M, Benten WPM, Mossmann H, Wunderlich F. Massive Destruction of Malaria-Parasitized Red Blood Cells despite Spleen Closure. *Infection and Immunity.* 2005; 73(10): 6390-8.

Ku CC, Murakami M, Sakamoto A, Kappler J, Marrack P. Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines. *Science.* 2000; 288(5466):675-8.

Kundig TM, Shahinian A, Kawai K, Mittrucker HW, Sebzda E, Bachmann MF, Mak TW, Ohashi PS. Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells. *Immunity.* 1996; 5:41-52.

Lamikanra AA, Brown D, Potocnik A, Casals-Pascual C, Langhorne J, Roberts DJ. Malarial anemia: of mice and men. *Blood.* 2007; 110:18-28.

Langhorne J, Quin S, Sanni L. Mouse models of blood stage malaria infections: immune responses and cytokines involved in protection and pathology. *Chem Immunol.* 2002; 80:204-28.

- Langhorne J, Evans CB, Asofsky R, Taylor DW. Immunoglobulin isotype distribution of malaria-specific antibodies produced during infection with *Plasmodium chabaudi adami* and *Plasmodium yoelii*. *Cell Immunol.* 1984; 87(2):452-61.
- Langhorne J, Kim KJ, Asofsky R. Distribution of immunoglobulin isotypes in the nonspecific B-cell response induced by infection with *Plasmodium chabaudi adami* and *Plasmodium yoelii*. *Cell Immunol.* 1985; 90(1):251-7.
- Langhorne J, Gillard S, Simon B, Slade S, Eichmann K. Frequencies of CD4⁺ T cells reactive with *Plasmodium chabaudi chabaudi*: distinct response kinetics for cells with Th1 and Th2 characteristics during infection. *Int Immunol.* 1989; 1:416-24.
- Langhorne J, Cross C, Seixas E, Li C, von der Weid T. A role for B cells in the development of T cell helper function in a malaria infection in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:1730-34.
- Langhorne J, Albano FR, Hensmann M, Sanni L, Cadman E, Voisine C, Sponaas AM. Dendritic cells, pro-inflammatory responses, and antigen presentation in a rodent malaria infection. *Immun Rev.* 2004; 201:35-47.
- Lantz O, Grandjean I, Matzinger P, Di Santo JP. Gamma chain required for naive CD4⁺ T cell survival but not for antigen proliferation. *Nat Immunol.* 2000; 1(1):54-8.
- LaRussa PS, Gershon AA, Steinberg SP, Chartrand SA. Antibodies to varicellazoster virus glycoproteins, I, II, and III in leukemic and healthy children. *J Infect Dis.* 1990; 162:627-33.
- Lenardo MJ. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature.* 1991; 353(6347):858-61.
- Li C, Langhorne J. Tumor necrosis factor alpha p55 receptor is important for development of memory responses to blood stage malaria infection. *Infect Immun.* 2000; 68: 5724-30.
- Li C, Seixas E, Langhorne J. Rodent malarias: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite. *Med Microbiol Immunol.* 2001; 189:115-26.
- Lima MR, Bandeira A, Falanga P, Freitas AA, Kipnis TL, da Silva LP, Coutinho A. Clonal analysis of B lymphocyte response to *Plasmodium chabaudi* infection of normal and immunoprotected mice. *Int Immunol.* 1991; 3:1207-16.
- Looareesuwan S, Ho M, Wattanagoon Y, White NJ, Warrell DA, et al. Dynamic alteration in splenic function during acute falciparum malaria. *N Engl J Med.* 1987; 317:675-79.

Lopes MF, da Veiga VF, Santos AR, Fonseca MEF, DosReis GA. Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas disease. *J Immunol.* 1995; 154:744-52.

Lucas B, Engels A, Camus D, Haquel A. T-Cell Recognition of a Cross-Reactive Antigen(s) in Erythrocytic Stages of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii*: Inhibition of Parasitemia by This Antigen(s). *Infection and Immunity.* 1993; 61(11): 4863-9.

Maegraith BG. In: *Medicine in tropics.* (ed) A. W. Woodruff, Edinburgh, Churchill Livingstone. 1974; p. 23-73.

Maggio-Price L, Brookoff D, Weiss L. Changes in hematopoietic stem cells in bone marrow of mice with *Plasmodium berghei* malaria. *Blood.* 1985; 66:1080-5.

Manz RA, Radbruch A. Plasma cells for a lifetime? *Eur J Immunol.* 2002; 32:923-7.

Maple PA, Jones CS, Wall EC, Vyseb A, Edmunds WJ, Andrews NJ, Miller E. Immunity to diphtheria and tetanus in England and Wales. *Vaccine.* 2000; 19(2-3):167-73.

Marsh K, Otoo L, Hayes RH, Carson DC, Greenwood BM. Antibodies to blood stage antigens of *Plasmodium falciparum* in rural Gambians and their relation to protection against infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1989; 83:293-303.

Maruyama M, Lam KP, Rajewsky K. Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. *Nature.* 2000; 407:636-42.

Matsumoto J, Kawai S, Terao K, Kirinoki M, Yasutomi Y, Aikawa M, Matsuda H. Malaria infection induces rapid elevation of the soluble Fas ligand level in serum and subsequent T lymphocytopenia: possible factors responsible for the differences in susceptibility of two species of Macaca monkeys to *Plasmodium coatneyi* infection. *Infect Immun.* 2000; 68:1183-8.

Matteelli A, Colombini P, Gulletta M, Castelli F, Carosi G. Epidemiological features and case management practices of imported malaria in northern Italy 1991-95. *Trop Med Int Health.* 1999; 4:653-7.

McLean SA, Pearson CD, Phillips RS. Antigenic variation in *Plasmodium chabaudi*: analysis of parent and variant populations by cloning. *Parasite Immunol.* 1986; 8:415-24.

McLean SA, Pearson CD, Phillips RS. *Plasmodium chabaudi*: antigenic variation during recrudescence parasitaemias in mice. *Exp. Parasitol.* 1982; 54:296-302.

Migot F, Chougnet C, Raharimalala L, Astagneau P, Lepers JP, Deloron P. Human immune responses to the *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocyte surface antigen (Pf155/RESA) after a decrease in malaria transmission in Madagascar. *Am J Trop Med Hyg.* 1993; 48:432-9.

Mogil RJ, Patton CL, Green DR. Cellular subsets involved in cell-mediated immunity to murine *Plasmodium yoelii* 17X malaria. J Immunol. 1987; 138:1933-9.

Molineaux L, Cornille-Brogger R, Mathews HM, Storey J. Longitudinal serological study of malaria in infants in the West African savanna. Comparisons in infants exposed to, or protected from, transmission from birth. Bull World Health Organ 1978; 56:573-8.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2006. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/svs> [2007out 28].

Mung'Ala Odera V, Snow RW, Newton CR. The burden of the neurocognitive impairment associated with *Plasmodium falciparum* malaria in sub-saharan Africa. Am J Trop Med Hyg. 2004; 71:64-70.

Murali Krishna K, Lau LL, Sambhara S, Lemonnier F, Altman J, Ahmed R. Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. Science. 1999; 286(5443):1377-81.

Northrop JK, Shen H. CD8+ T-cell memory: only the good ones last. Curr Opin Immunol. 2004; 16:451-5.

Ockenhouse CF, Shear HL. Oxidative killing of the intraerythrocytic malaria parasite *Plasmodium yoelii* by activated macrophages. J Immunol. 1984; 132:424-31.

Ockenhouse CF, Schulman S, Shear HL. Induction of crisis forms in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by gamma-interferon-activated, monocyte-derived macrophages. J Immunol. 1984; 133:1601-1608.

Oster CN, Koontz LC, Wyter DI. Malaria in asplenic mice: effect of splenectomy, congenital asplenia, and splenic reconstitution on the course of infection. Am J Trop Med Hyg. 1980; 29:1138-41.

Parish CR. The relationship between humoral and cell-mediated immunity. Transplant Rev. 1972; 13: 35-66.

Perry J, Rush A, Wilson R, Olver C, Avery A. Dendritic cells from malaria-infected mice are fully functional APC. J Immunol. 2004; 172:475-82.

Phillips RS, Brannan LR, Balmer P, Neuville P. Antigenic variation during malaria infection—the contribution from the murine parasite *Plasmodium chabaudi*. Parasite Immunol. 1997; 19:427-34.

Pitcher CJ, Quittner C, Peterson DM, Connors M, Koup RA, Maino VC, Picker LJ. HIV-1-specific CD4⁺ T cells are detectable in most individuals with active HIV-1 infection, but decline with prolonged viral suppression. Nat Med. 1999; 5(5):518-25.

Podoba JE, Stevenson MM. CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes both contribute to acquired immunity to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS. *Infect Immun*. 1991; 59:51-8.

Pombo DJ, Lawrence G, Hirunpetcharat C, Rzepczyk C, Bryden M, Cloonan N et al. Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Lancet*. 2002; 360:610-7.

Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature*. 1992; 356:397-400.

Refaeli Y, Parijs LV, London CA, Tschopp J, Abbas KA. Biochemical Mechanisms of IL-2-Regulated Fas-Mediated T Cell Apoptosis. *Immunity*. 1998; 8:615-623.

Rénia L, Potter SM, Mauduit M, Rosa DS, Kayibanda M, Deschemin JC, Snounou G, Grüner AC. Pathogenic T cells in cerebral malaria. *Intern J Parasitol*. 2006; 36: 547-54.

Riccio EK, Júnior IN, Riccio LR, das Graças Alecrim M, Corte-Real S, Morgado M, Daniel-Ribeiro CT, de Fátima Ferreira-da-Cruz M. Malaria associated apoptosis is not significantly correlated with either parasitemia or the number of previous malaria attacks. *Parasitol Res*. 2003; 90(1):9-18.

Riley EM, Allen SJ, Wheeler JG, Blackman MJ, Bennett S, Takacs B, Schönfeld HJ, Holder AA, Greenwood BM. Naturally acquired cellular and humoral immune responses to the major merozoite surface antigen (PfMSP1) of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced malaria morbidity. *Parasite Immunol*. 1992; 14:321-37.

Riley EM, Morris Jones S, Blackman MJ, Greenwood BM, Holder AA. A longitudinal study of naturally acquired cellular and humoral immune responses to a merozoite surface protein (MSP-1) of *Plasmodium falciparum* in an area of seasonal malaria transmission. *Parasite Immunol*. 1993; 15:513-24.

Roberts DW, Weidanz WP. Splenomegaly, enhanced phagocytosis, and anemia are thymus-dependent responses to malaria. *Infection and Immunity*. 1978; 20:728-31.

Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA, Walker BD. Vigorous HIV-1-specific CD4⁺ T cell responses associated with control of viremia. *Science*. 1997; 278(5342):1447-50.

Sabchareon A, Burnouf T, Outtara D, Attanath P, Bouharon Tayoun H et al. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 1991; 45:297-308.

Sanchez Torres L, Rodriguez Ropon A, Aguilar-Medina M, Favila-Castillo L. Mouse splenic CD4⁺ and CD8⁺ T cells undergo extensive apoptosis during a *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS infection. *Parasite Immunol*. 2001; 23:617-26.

Sangster MY, Topham DJ, D'Costa S, Cardin RD, Marion TN, Myers LK, Doherty PC. Analysis of the virus-specific and nonspecific B cell response to a persistent B lymphotropic γ herpesvirus. *J Immunol.* 2000; 164:1820-8.

Sardinha LR, D'imperio Lima MR, Alvarez JM. Influence of the polyclonal activation induced by *Plasmodium chabaudi* on ongoing OVA-specific B- and T-cell responses. *Scand J Immunol.* 2002; 56(4):408-16.

Saul A. Kinetic constraints upon the development of a malaria vaccine. *Parasite Immunol.* 1987; 9:1-9.

Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, Lefrançois L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells *in vivo*. *Nat Immunol.* 2000; 1:426-32.

Schluns KS, Williams K, Ma A, Zheng XX, Lefrançois L. Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *J. Immunol.* 2002; 168:4827-31.

Schofield L, Villaquiran J, Ferreira A, Schellekens H, Nussenzweig RS, Nussenzweig V. Gamma-interferon, CD8⁺ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature.* 1987; 330:664-6.

Sedegah M, Finkelman F, Hoffman SL. Interleukin-12 induction of interferon gamma-dependent protection against malaria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91(22):10700-2.

Seguin MC, Klotz FW, Schneider I, Weir JP, Goodbaty M, Slayter M et al. Induction of nitric oxide synthase protects against malaria in mice exposed to irradiated *Plasmodium berghei* infected mosquitoes: involvement of interferon gamma and CD8⁺ T cells. *J Exp Med.* 1994; 180:353-8.

Selin LK, Lin MY, Kraemer KA, Pardoll DM, Schneck JP, Varga SM et al. Attrition of T cell memory: selective loss of LCMV epitope-specific memory CD8 T cells following infections with heterologous viruses. *Immunity.* 1999; 11: 733-42.

Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev.* 2002; 2:116-26.

Shata MT, Tricoche N, Perkus M, Tom D, Brotman B, McCormack P et al. Exposure to low infective doses of HCV induces cellular immune responses without consistently detectable viremia or seroconversion in chimpanzees. *Virology.* 2003; 314:601-16.

Sinigaglia F, Pink JRL. Human T lymphocyte clones specific for malaria (*Plasmodium falciparum*) antigens. *EMBO J.* 1985; 4:3819-22.

Slifka MK, Ahmed R. Long-term humoral immunity against viruses: revisiting the issue of plasma cell longevity. *Trends Microbiol.* 1996; 4:394-400.

Slifka MK, Antia R, Whitmire JK, Ahmed R. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity*. 1998; 8:363-72.

Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2005; 434:214-7.

Snow RW, Korenromp EL, Gouws E. Pediatric mortality in Africa: *Plasmodium falciparum* malaria as a cause or risk? *Am J Trop Med Hyg*. 2004; 71:16-24.

Soares IS, Oliveira SG, Souza JM, Rodrigues MM. Antibody response to the N and C-terminal regions of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of *P. vivax* malaria in the north of Brazil. *Acta Trop*. 1999; 72:13-24.

Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4: 169-80.

Stevenson MM, Tam MF. Differential induction of helper T cell subsets during blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection in resistant and susceptible mice. *Clin Exp Immunol*. 1993; 92:77-83.

Stevenson MM, Su Z, Sam H, Mohan K. Modulation of host responses to blood-stage malaria by interleukin-12: from therapy to adjuvant activity. *Microbes Infect*. 2001; 3:49-59.

Struik S, Riley E. Does Malaria suffer from lack of memory? *Immunol Rev*. 2004; 201:268-90.

Su Z, Stevenson M. Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *Infect Immun*. 2000; 68:4399-406.

Su Z, Stevenson MM. IL-12 is required for antibody mediated protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria. *J. Immunol*. 2002; 168:1348-55.

Süss G, Eichmann K, Kury E, Linke A, Langhorne J. Roles of CD4- and CD8-bearing T lymphocytes in the immune response to the erythrocytic stages of *Plasmodium chabaudi*. *Infect Immun*. 1988; 56:3081-8.

Swain SL. CD4 T-cell memory can persist in the absence of class II. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2000; 355(1395):407-11.

Sze DM, Toellner KM, Garcia de Vinuesa C, Taylor DR, MacLennan IC. Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival. *J Exp Med*. 2000; 192: 813-21.

Takahashi Y, Dutta PR, Cerasoli DM, Kelsoe G. *In situ* studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3- nitrophenyl) acetyl. V. Affinity maturation develops in two stages of clonal selection. J Exp Med. 1998; 187:885-95.

Tanchot C, Lemonnier FA, Pérarnau B, Freitas AA, Rocha B. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. Science. 1997; 276(5321):2057-62.

Taverne J, Sheikh N, de Souza JB, Playfair JHL, Probert L, Kollias G. Anaemia and resistance to malaria in transgenic mice expressing human tumor necrosis factor. Immunology. 1994; 82:397-403.

Taylor-Robinson AW, Phillips RS, Severn A, Moncada S, Liew FY. The role of Th1 and Th2 cells in a rodent malaria infection. Science. 1993; 260:1931-4.

Taylor-Robinson AW, Smith EC. A role for cytokines in potentiation of malaria vaccines through immunological modulation of blood stage infection. Immunol Rev. 1999; 171:105-23.

Thelu J, Sheick-Zakiuddin I, Boudin C, Peyron F, Picot S, Ambroise-Thomas P. Development of natural immunity in *Plasmodium falciparum*: study of antibody response by Western immunoblotting. J Clin Microbiol. 1991; 29:510-18.

Tolle R, Früh K, Doumbo O, Koita O, N'Diaye M, Fischer A et al. A prospective study of the association between the human humoral response to *Plasmodium falciparum* blood stage antigen gp190 and control of malarial infections. Infect Immun. 1993; 61:40-7.

Tomoda T, Ogura H, Kurashige T. The longevity of the immune response to filamentous hemagglutinin and pertussis toxin in patients with pertussis in a semiclosed community. J Infect Dis. 1992; 166:908-10.

Tongren JE, Zavala F, Roos DS, Riley EM. Malaria vaccines: if at first you don't succeed... Trends Parasitol. 2004; 20(12):604-10.

Touré-Baldé A, Sarthou JL, Aribot G, Michel P, Trape JF, Rogier C, Roussilhon C. *Plasmodium falciparum* induces apoptosis in human mononuclear cells. Infect. Immun. 1996; 64:744-50.

Traggiai E, Puzone R, Lanzavecchia A. Antigen dependent and independent mechanisms that sustain serum antibody levels. Vaccine. 2003; 21:S35-S37.

Tsuji M, Romero P, Nussenzweig RS, Zavala F. CD4+ cytolytic T cell clone confers protection against murine malaria. J Exp Med. 1990; 172(5):1353-7.

Van Druten H, van Knapen F, Reintjes A. Epidemiologic implications of limited-duration seropositivity after toxoplasma infection. Am J Epidemiol 1990; 132:169-80.

van Essen D, Dullforce P, Brocker T, Gray D. Cellular interactions involved in Th cell memory. *J Immunol.* 2000; 165(7):3640-6.

Vande Waa JA, Jensen JB, Akood MA, Bayoumi R. Longitudinal study on the in vitro immune response to *Plasmodium falciparum* in Sudan. *Infect Immun* 1984; 45:505-10.

Vella AT, Dow S, Potter TA, Kappler J, Marrack P. Cytokine-induced survival of activated T cells *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:3810-15.

Vella AT, Teague TK, Ihle JN, Kappler J, Marrack P. Interleukin-4 (IL-4) or IL-7 prevents the death of resting T cells: STAT6 is probably not required for the effect of IL-4. *J Exp Med.* 1997; 186:325-30.

Vieira P, Rajewsky K. Persistence of memory B cells in mice deprived of T cell help. *Int Immunol.* 1990; 2:487-94.

Villeval JL, Lew A, Metcalf D. Changes in hematopoietic and regulator levels in mice during fatal or nonfatal malarial infections. 1. Erythropoietic populations. *Exp Parasitol.* 1990; 71: 364-74.

Vinetz JM, Kumar S, Good MF, Fowlkes BJ, Berzofsky JA, Miller LH. Adoptive transfer of CD8+ T cells from immune animals does not transfer immunity to blood stage *Plasmodium yoelii* malaria. *J Immunol.* 1990; 144:1069-74.

Wahlgren M, Berzins K, Perlmann P, Persson M. Characterization of the humoral immune response in *Plasmodium falciparum* malaria II, IgG subclass levels of anti-*P. falciparum* antibodies in different sera. *Clin Exp Immunol.* 1983; 54:135-42.

Weiss, L. Mechanism of splenic control of murine malaria: cellular reactions of the spleen in lethal (strain 17XL) *Plasmodium yoelii* malaria in BALB/c mice, and the consequences of pro-infective splenectomy. *Am J Trop Med Hyg.* 1989. 41:144-60.

Wen L, Hanvanich M, Werner-Favre C, Brouwers N, Perrin LH, Zubler RH. Limiting dilution assay for human B cells based on their activation by mutant EL4 thymoma cells: total and antimalaria responder B cell frequencies. *Eur J Immunol* 1987;17:887-92.

Wargo AR, Randle N, Chan BH, Thompson J, Read AF, Babiker HA. *Plasmodium chabaudi*: reverse transcription PCR for the detection and quantification of transmission stage malaria parasites. *Exp Parasitol.* 2006; 112(1):13-20.

Wipasa J, Xu H, Stowers A, Good MF. Apoptotic deletion of Th cells specific for the 19-kDa carboxyl-terminal fragment of merozoite surface protein 1 during malaria infection. *J Immunol.* 2001; 167(7):3903-9.

World Health Organization Malaria, other vectorborne and parasitic diseases: Regional trend in cases and deaths, 2003. Available from: <http://www.wpro.who.int/sites/mvp/data/> [2007 out 28]

World Health Organization. International Travel and Health. (World Health Organization, Geneva, 2003). 2002. Available from: <http://www.who.int/ith>

Xu H, Hodder AN, Yan H, Crewther PE, Anders RF, Good MF. CD4⁺ T cells acting independently of antibody contribute to protective immunity to *Plasmodium chabaudi* infection after apical membrane antigen 1 immunization. J Immunol. 2000; 165:389-96.

Xu H, Wipasa J, Yan H, Zeng M, Makobongo MO, Finkelman FD et al. The mechanism and significance of deletion of parasite-specific CD4(+) T cells in malaria infection. J Exp Med. 2002; 195(7):881-92.

Yadava A, Kumar S, Dvorak JA, Milon G, Miller LH. Trafficking of *Plasmodium chabaudi adami*-infected erythrocytes within the mouse spleen. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93:4595-9.

Yap GS, Stevenson MM. *Plasmodium chabaudi* AS: erythropoietic responses during infection in resistant and susceptible mice. Exp Parasitol. 1992; 75:340-52.

Zerboni L, Nader S, Aoki K, Arvin AM. Analysis of the persistence of humoral and cellular immunity in children and adults immunized with varicella vaccine. J Infect Dis. 1998; 177:1701-04.

Zinkernagel RM. On natural and artificial vaccinations. Annu Rev Immunol. 2003; 21:515-46.