Cláudia Augusta Zago

O papel das células T_{reg} e da IL-2 na
resposta policlonal de células CD4⁺
durante a infecção pelo *Plasmodium*
chabaudi

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

São Paulo
2008

Cláudia Augusta Zago

**O Papel Das Células T_{reg} E Da IL-2 NA
Resposta Policlonal De Células CD4⁺
Durante A Infecção Pelo *Plasmodium*
*chabaudi***

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

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

Zago, Cláudia Augusta.

O papel das células T_{reg} e da IL-2 na resposta policlonal de linfócitos $T\ CD4^{+}$ durante a infecção pelo *Plasmodium chabaudi* / Cláudia Augusta Zago. -- 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: The role of T_{reg} cells and IL-2 in polyclonal $CD4^{+}$ T cells response during *Plasmodium chabaudi* infection.

Descritores: 1. *Plasmodium chabaudi* 2. Malária 3. IL-2 4. Células T reguladoras 5. Linfócitos 6. Resposta imune I. Lima, Maria Regina D'Império II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia. III. Título.

ICB/SBIB031/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Cláudia Augusta Zago.

Título da Tese: O papel das células T_{reg} e da IL-2 na resposta policlonal de linfócitos T CD4⁺ durante a infecção pelo *Plasmodium chabaudi*.

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:

Este trabalho foi realizado 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 – 05/51170-7 e CNPq (Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico), projeto Universal Número – 472966-2004-9

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

Dedico esta tese aos meus pais

Deus é realmente maravilhoso, ele criou o mar para encantar o universo com o mistério de suas águas. Ele criou a natureza, para brilhar no nosso amanhecer com o frescor da sua beleza, ele colocou estrelas no céu, para que iluminasse os nossos caminhos. E ele, na obra máxima de sua criação, me deu vocês! Pais queridos que enfeitam o meu caminho e alegam os meus dias com sorriso e força. Sem vocês, o que eu poderia encontrar... Caminharia pelo mundo sem ter os braços abertos, mas sim, de punhos fechados, de olhos cerrados, e coração solitário. Vocês representam todos os meus sonhos, é por vocês que construo castelos, é para vocês que escrevo histórias nas páginas da minha história, da nossa história, do nosso cotidiano. Pra mim, basta apenas que vocês caminhem comigo ajudando a contar as estrelas do céu, ensinando-me a traçar novos rumos, porque vocês têm o poder de trazer ao meu mundo o brilho da lua, a magia da noite, a suavidade da brisa, o calor do sol. Vocês são o mais maravilhoso presente de Deus, sem vocês não haveria motivo para eu existir... Obrigada

E ao meu noivo Gil

Muitas vezes temos dificuldade em expressar o que sentimos pelas pessoas, achamos que elas sabem e que isso é suficiente.

Hoje sei que não é..

Hoje sei...

Quais foram as pessoas que realmente fizeram a diferença, e quais fazem parte desse "eu" que eu me tornei hoje.

Sei...

Que você é muito mais que uma pessoa importante na minha vida.

É parte dela...

Ter você é caminhar pela vida confiante....

Sem medo de errar, mesmo errando,

Sem medo de me entregar, já entregue.

Andar pelas flores, mesmo com arranhões....

Ter você é querer ser melhor, é querer dar o melhor de mim,

é ver as coisas de uma melhor forma, é ter força para lutar,

crer, vencer.

Obrigada por permitir que eu contasse sempre com você.

AGRADECIMENTOS

À minha **família**, companheiros de todas as horas, sempre me incentivando e me apoiando. Muito obrigada, pela certeza de não estar sozinha, o que me dá forças para seguir qualquer caminho.

À Prof^a. Dra. **Maria Regina D'Império Lima**, por sempre estar presente mostrando uma saída quando eu não enxergava, pela paciência, por ter acreditado em mim, pelas discussões e críticas que em muito auxiliaram no desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. **José Maria Alvarez Mosig (Pepe)**, Prof. Dr. **Momtchilo Russo**, Prof. Dr. **Magnus Ake Gidlund** e Profa. Dra **Ises de Almeida Abrahamsohn** por estarem sempre dispostos a ajudar.

À **Karina**, obrigada pela presença constante e pelos conselhos que sempre foram fundamentais. O pouco que eu sei aprendi com o muito que você me ensinou principalmente nos momentos mais difíceis. Muito obrigada, minha amiga.

À **Meire**, obrigada por me ajudar com os hibridomas, por “cuidar da arrumação” do laboratório, pela paciência, até pelos palavrões, mas acima de tudo obrigada pela amizade.

Ao **Luiz Sardinha**, **Sheyla** e a **Rosa** pela paciência, disposição, companheirismo e pelo apoio nos momentos mais difíceis.

Aos colegas de laboratório que contribuíram com auxílio e amizade: **Ana Paula**, **Sandra**, **Sérgio**, **Henrique**, **Luis N.**, **Daniela**, **Christian**, **André**, **Fernando**, que sempre se mostraram dispostos a ajudar e por possibilitarem um convívio diário agradável e divertido.

Aos amigos e companheiros que não fazem mais parte do laboratório: **Cláudio**, **Tainá**, **Renato** que além do auxílio em diversos momentos, tornaram-se muito mais que companheiros de trabalho.

Ao **Rogério**, por se ocupar da maioria dos assuntos de rotina do laboratório e por seu zelo no preparo dos materiais utilizados no desenvolvimento da tese e a **Marilu**, pela ajuda com os hibridomas.

À **Sílvia**, e todo o **peçoal do Biotério** de camundongos isogênicos, pelo cuidado e zelo no fornecimento de camundongos.

Valéria, Jô, Eni e Amarildo, pelo auxílio nos assuntos burocráticos.

Aos amigos **Cláudia Freitas, Valéria, Luciano, Rodrigo, Michele, Rita, Caco, Eduardo, Adriana, Caio, Cibele, Leonardo, Renata, Evandro, Cristiany, Ico, Ana Paula** pelo apoio e companheirismo.

Aos colegas do **Departamento de Imunologia**.

RESUMO

Zago CA. O papel das células T reguladoras e da IL-2 na resposta policlonal de células CD4⁺ durante a infecção pelo *Plasmodium chabaudi* [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciência Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

A ativação policlonal de linfócitos T e B e a produção de auto-anticorpos são características comuns na resposta imune induzida pela infecção com *Plasmodium chabaudi*. A IL-2 é uma citocina que está envolvida tanto na ativação e apoptose dos linfócitos T, como na indução e manutenção das células T reguladoras (T_{reg}), podendo assim participar de várias maneiras na resposta ao *P. chabaudi*. Observamos, no dia 7 após a infecção, que as células CD4⁺ com tamanho celular grande e que expressam CD25 e CD122 (cadeias α e β do receptor de IL-2, respectivamente) são as maiores produtoras de IL-2 e também expressam altos níveis de CTLA-4, mTGF- β , GITR e CD45RB. Verificamos também, a expansão de uma população de células CD4⁺ que expressa marcadores característicos de células T_{reg}, ou seja, tamanho celular pequeno, com alta expressão de Foxp3, CD25, CTLA-4, mTGF- β , GITR e baixos níveis de CD45RB e CD122. Para avaliar o papel dessas células na infecção pelo *P. chabaudi*, reconstituímos camundongos SCID com células totais ou desprovidas da população CD25⁺. Na ausência de células T_{reg}, as células CD4⁺ apresentam um aumento significativo da expressão de CD25, CD122 e CD69 e secretam grande quantidade de IFN- γ . Esses camundongos também apresentam um aumento nos níveis de anticorpos IgG anti-*P.chabaudi* e auto-anticorpos, indicando que as células T_{reg} parecem contribuir para limitar a ativação policlonal induzida pelo *P. chabaudi*. Trabalhos mostram que o tratamento com anticorpos monoclonais (mAbs) de diferentes hibridomas leva a efeitos antagônicos. Assim, os mAb S4B6 formam um complexo citocina-anticorpo que potencializa a ação da citocina por deixá-la mais estável, enquanto os mAb JES6-1 neutralizam a citocina. Nossos estudos mostram que, na infecção aguda pelo *P. chabaudi*, o tratamento com mAb S4B6 induz um aumento na frequência de células CD4⁺ ativadas (alta expressão de CD44 e CD69 e tamanho celular grande) sem alterar o número de células T_{reg}. Em contraposição, o tratamento com mAb JES6-1, na fase aguda da infecção, induz uma redução no número de células T_{reg} que retorna aos níveis basais no dia 20 de infecção. Além disso, a frequência de células CD4⁺ ativadas (alta expressão de CD44 e CD69 e tamanho celular grande)

esteve elevada no dia 20 de infecção, assim como a proliferação específica. Além da IL-2, as citocinas IL-7 e IL-15 também promovem a sobrevivência e a proliferação de células T. Experimentos *in vitro* mostraram que a neutralização da IL-2 não altera a proliferação antígeno-específica de células CD4⁺ da fase aguda da infecção, que se torna ainda maior na presença de IL-7 e IL-15. Podemos concluir que a IL-2 não é essencial para a ativação e a expansão das células CD4⁺ durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*, podendo ser substituída por outras citocinas como a IL-7 e a IL-15. Além disso, o nosso estudo indica que a IL-2 e as células T_{reg} são capazes de limitar a ativação policlonal das células CD4⁺ induzida pela infecção, ainda que com cinéticas distintas.

Palavras-chave: *P. chabaudi*; Células T reguladoras; IL-2; Ativação policlonal.

ABSTRACT

Zago CA. The role of regulatory T cells and IL-2 during polyclonal CD4⁺ T cells response induced by *Plasmodium chabaudi* infection [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciência Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Polyclonal lymphocyte activation (PLA) and autoantibody production are common features of the immune response to *Plasmodium chabaudi* infection. IL-2 plays an essential role in T cell activation and apoptosis, and also in regulatory T (T_{reg}) cell homeostasis. Therefore, IL-2 could participate in different ways in the immune response against malaria. At day 7 of infection, we observed that among CD4⁺ T cells, large cells expressing CD25 and CD122 (α and β chains of IL-2R, respectively) were the major source of IL-2 and also express high levels of CTLA-4, mTGF- β , GITR and CD45RB. We also observed the expansion of a population bearing surface markers characteristic of T_{reg} cells, that is, small lymphocytes expressing Foxp3 and high amounts of CD25, CTLA-4, mTGF- β and GITR and low levels of CD45RB and CD122. In order to evaluate the role of this population during *P. chabaudi* infection, C57Bl/6 SCID mice were reconstituted with total or CD25-depleted spleen cells. CD4⁺ T cells of infected mice lacking CD25⁺ cells showed a significant higher expression of CD25, CD122 and CD69. In addition, CD4⁺ T cells of infected CD25⁻SCID mice secreted huge amounts of IFN- γ compared to infected TOTAL SCID mice (reconstituted with total spleen cells). These mice also showed increased serum levels of parasite-specific IgG and autoantibodies. Thus according to these results T_{reg} cells seem to limit PLA during *P. chabaudi* malaria. Several studies report that treatment with anti-IL-2 monoclonal antibodies (mAbs) proceeding from different clones lead to antagonist effects. Anti-IL-2 S4B6 mAb produces a cytokine-Ab complex guaranteeing the cytokine action by leaving it more stable, while anti-IL-2 JES6-1 mAb neutralizes the cytokine. Our findings have shown that during the acute infection, S4B6 mAb treatment produces a huge increase in the frequency of activated CD4⁺ T cells (large cells expressing high amounts of CD44 and CD69) without interfering in T_{reg} cell numbers per spleen. On the other hand, JES6-1 mAb treatment during the early infection results on a decrease in T_{reg} cell numbers. Even though these values become similar to controls at day 20 of infection, the frequency of activated CD4⁺ T cells remains upraised as well as the parasite-stimulated T cell proliferation. In addition to IL-2, IL-7 and IL-15 also promote T

cell survival and proliferation. In our experiments, IL-2 neutralization *in vitro* is unable to suppress the parasite-stimulated CD4⁺ T cell proliferation when cells are obtained at the early infection, and a huge increase in the response is observed in the presence of IL-7 and IL-15. Taken together, our results indicate that IL-2 is dispensable for CD4⁺ T cell activation and expansion during the acute *P. chabaudi* malaria. In this regard, IL-2 could be substituted by other cytokines such as IL-7 and IL-15. Furthermore, our study indicates that IL-2 and T_{reg} cells are able to limit PLA of CD4⁺ T cells during *P. chabaudi* malaria, although with different kinetics.

Key words: *P. chabaudi*; Regulatory T cells; IL-2; Polyclonal activation.

LISTA DE ABREVIATURAS

- BSA**- Albumina sérica bovina (*Bovine serum albumin*)
- CD**- Grupos de diferenciação (*Cluster of differentiation*)
- CFSE**- (*Carboxifluorescein Diacetate Succinimidil Ester*)
- CTLA-4**- Antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos (*cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*)
- Cy**- (Cy-chrome)
- ELISA**- Ensaio imunoenzimático (*Enzyme-linked immunoabsorbent assay*)
- EP**- Eritrócitos parasitados
- FACS**- Ensaio de citometria de fluxo (*Fluorescence-activated cell sorter*)
- FITC**- Isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein isothiocyanate*)
- Foxp3** – Fator de transcrição da família “forhead” (*forkhead box p3*)
- FSC**- Parâmetro de tamanho (*Forward scatter*)
- GITR**- receptor da família do TNF induzido por glicocorticóide (*glucocorticoid-induced TNF receptor*)
- LDL** – Lipoproteína de baixa densidade (*Low density lipoprotein*)
- IL** – Interleucina (*interleukin*)
- i.p** - Intraperitoneal
- IFN- γ** - Interferon gama
- Ig**- Imunoglobulina
- Mab** – Anticorpo monoclonal (*monoclonal antibody*)
- MACS**- (*Magnetic cell sorting*)
- ME**- Mercaptoetanol
- OPD**- o-Fenilenodiamina (*o-Phenilenediamine*)
- OXLDL** – Lipoproteína de baixa densidade oxidada (*Low density lipoprotein oxidized*)
- PBS**- Salina tamponada com fosfato (*Phosphate buffered saline*)
- PE**- Ficoeritrina (*Phycoerythrin*)
- RPMI**- Meio McCoy de cultura modificado
- SBF**- Soro fetal bovino (*Fetal calf serum*)
- SCID** – Imunodeficiência combinada severa (*Severe Combined Immunodeficiency*)
- TCR** – Receptor de linfócitos T (*T cell receptor*)

TGF– Fator indutor de crescimento (*Transforming growth factor*)

Th- Linfócito T auxiliador (*Lymphocyte T helper*)

TNF- Fator de necrose tumoral (*tumour necrosis factor*)

T_{reg} – Células Treguladoras (*regulatory T cell*)

LISTA DE FIGURAS

MATERIAL E MÉTODOS

Figura 1- Teste do anticorpo bifuncional	37
Figura 2- Análise da pureza após a separação da população CD25 ⁺ das células esplênicas de camundongos não infectados	40

RESULTADOS

Figura 1- Parasitemia, número de células esplênicas, células CD4 ⁺ e da expressão de CD25 e CD122 durante a infecção pelo <i>P. chabaudi</i>	47
Figura 2- Análise fenotípica de células CD4 ⁺ secretoras de IL-2 no baço de camundongos durante a infecção primária pelo <i>P. chabaudi</i>	50
Figura 3- Análise fenotípica das células CD4 ⁺ CD25 ⁺ durante a infecção pelo <i>P. chabaudi</i>	52
Figura 4- Análise da população de células CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ durante a ativação policlonal induzida pelo <i>P. chabaudi</i>	54
Figura 5: Análise funcional das células CD4 ⁺ CD25 ⁺ durante a infecção pelo <i>P. chabaudi</i>	56
Figura 6- Papel das células CD4 ⁺ CD25 ⁺ na ativação policlonal de células CD4 ⁺ induzida pelo <i>P. chabaudi</i>	58
Figura 7- Papel das células CD4 ⁺ CD25 ⁺ na resposta humoral durante a infecção pelo <i>P. chabaudi</i>	60
Figura 8- Efeito do tratamento com mAb S4B6 durante a infecção primária pelo <i>P. chabaudi</i>	63
Figura 9- Efeito do tratamento com mAb S4B6 na resposta das células CD4 ⁺ esplênicas de camundongos infectados pelo <i>P. chabaudi</i>	65
Figura 10- Efeito do tratamento com mAb S4B6 na resposta humoral durante a infecção pelo <i>P. chabaudi</i>	67
Figura 11- Efeito do tratamento com mAb S4B6 nas células T _{reg} durante a infecção pelo <i>P. chabaudi</i>	69
Figura 12- Efeito do tratamento com mAb JES6-1 durante a infecção primária pelo <i>P. chabaudi</i>	71
Figura 13- Efeito do tratamento com mAb JES6-1 na resposta das células CD4 ⁺ esplênicas de camundongos infectados pelo <i>P. chabaudi</i>	73

Figura 14- Efeito do tratamento com mAb JES6-1 nas células T _{reg} durante a infecção pelo <i>P. chabaudi</i>	75
Figura 15- Efeito do tratamento com mAb JES6-1 <i>in vitro</i> na resposta precoce das células CD4 ⁺ à infecção pelo <i>P. chabaudi</i>	77
Figura 16- Capacidade da IL-2, IL-7 e IL-15 sustentarem a resposta precoce das células CD4 ⁺ ao <i>P. chabaudi</i>	79
Figura 17- Alterações dos sintomas clínicos, alterações do peso e parasitemia dos camundongos tratados com mAb JES6-1 durante a infecção pelo <i>P. chabaudi</i>	81
Figura 18- Análise fenotípica das células CD4 ⁺ do baço de camundongos tratados com mAb JES6-1 20 dias p.i. pelo <i>P. chabaudi</i>	83
Figura 19- Estado de ativação e diferenciação das células CD4 ⁺ de camundongos tratados e não tratados com mAb JES6-1 no dia 20 p.i. com <i>P. chabaudi</i>	85
Figura 20- Influência do tratamento com mAb JES6-1 nas células CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ 20 dias após a infecção pelo <i>P. chabaudi</i>	87
Figura 21- O efeito do tratamento com mAb JES6-1 na geração de uma resposta secundária ao <i>P. chabaudi in vitro</i>	90

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 MALÁRIA	24
1.2 CÉLULAS T REGULADORAS	27
1.3 INTERLEUCINA-2.....	29
1.4 <i>P. chabaudi</i> , CÉLULAS T _{REG} E IL-2.....	30
2 OBJETIVO.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Camundongos, parasitemia e infecção.....	36
3.2 Suspensões de células esplênicas	36
3.3 Análise fenotípica das células esplênicas	36
3.4 Ensaio de secreção de IL-2.....	37
3.5 Expansão e purificação do hibridoma produtor dos mAbs anti-IL-2 (clones JES6-1A12 e S4B6) e GL117.....	38
3.6 Marcação de células esplênicas com carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster.....	38
3.7 Marcação para Foxp3	39
3.8 Reconstituição de camundongos SCID com células esplênicas totais e desprovidas da população CD25	39
3.9 Detecção por ELISA dos anticorpos totais, específicos ao parasita e auto-anticorpos anti-LDL e anti-LDL oxidado (anti-OXLDL).....	40
3.10 Ensaio de ELISASPOT	41
3.11 Marcação com anexina V	41
3.12 Determinação dos sintomas clínicos.....	41
3.13 Análise estatística	42
4 RESULTADOS.....	43
PARTE I INFLUÊNCIA DAS CÉLULAS T _{REG} NA ATIVAÇÃO POLICLONAL INDUZIDA PELO <i>P. chabaudi</i>	44
4.1 Expressão das cadeias α (CD25) e β (CD122) do IL-2R nas células CD4 ⁺ do baço de camundongos infectados com <i>P. chabaudi</i>	45
4.2 Análise fenotípica de células CD4 ⁺ secretoras de IL-2 no baço de camundongos durante a infecção primária pelo <i>P. chabaudi</i>	48
4.3 Análise fenotípica das células CD4 ⁺ CD25 ⁺ durante a infecção pelo <i>P. chabaudi</i> ..	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 MALÁRIA

A infecção do hospedeiro vertebrado pelo plasmódio inicia-se com a inoculação do esporozoíto no momento da picada do mosquito *Anopheles*. Uma vez inoculados, os esporozoítas caem na corrente circulatória e penetram nas células hepáticas, onde se multiplicam por esquizogonia, levando à formação de merozoítas. Com a ruptura dos hepatócitos, alguns dos merozoítas, agora postos em liberdade, são englobados por células fagocitíticas e destruídos. Entretanto, outros parasitas conseguem invadir os glóbulos vermelhos, dando início ao ciclo eritrocítico. A fase eritrocítica do ciclo do plasmódio é a responsável pelos sintomas clínicos associados à doença, tais como: a febre, a anemia e a malária cerebral, muitas vezes fatal. Após sucessivas fases de esquizogonia, aparecem no ciclo eritrocítico os gametócitos. A infecção do mosquito ocorre com a ingestão de eritrócitos infectados por gametócitos, que se reproduzem de forma sexuada no intestino médio do mosquito, dando origem aos esporozoítas que atingem progressivamente as glândulas salivares. A simples presença de um indivíduo portador do plasmódio pode desencadear um surto de malária em qualquer região onde haja o mosquito transmissor da doença.

A malária humana é causada por quatro espécies de *Plasmodium*: o *P. malarie*, o *P. ovale*, o *P. vivax* e o *P. falciparum*, sendo o *P. vivax* e o *P. falciparum* as espécies mais comuns. Aproximadamente 40% da população mundial, na maior parte aquelas que vivem nas regiões mais pobres como África, Ásia e América Latina, estão expostas à malária. Apesar dos esforços das autoridades de saúde, pelo menos 1 milhão de pessoas morrem todos os anos vítimas da malária. Noventa por cento das mortes ocorrem na África, principalmente em crianças com idade abaixo de cinco anos. Uma criança africana tem em média entre 1,6 e 5,4 episódios de febre decorrentes da malária por ano. Dados da Organização Mundial da Saúde mostram que a cada 30 segundos uma criança morre de malária (portal 10 facts on Malaria, World Health Organization, 2007).

No Brasil, a região da Amazônia Legal concentra quase todos os registros de malária no país. Em um recenseamento realizado na região em 2004, observou-se uma redução do número de casos de malária, diminuição dos municípios de alto risco (incidência parasitária acima de 49,9 casos/1.000 habitantes), de internações e de óbitos por malária, quando comparados a um levantamento feito em 1999. Apesar disso, a incidência da doença na Amazônia continuou elevada em 2004, chegando a

aproximadamente 20 casos para cada 1.000 habitantes, prejudicando o nível de saúde da população e o desenvolvimento socioeconômico da região.

Segundo dados do Ministério da Saúde, na Amazônia, a maior parte dos casos de malária é devida ao *P. vivax*. No entanto, apesar de haver uma redução geral de casos na região, é preocupante o aumento da frequência de casos de malária por *P. falciparum*, o que favorece a ocorrência da doença nas suas formas graves e de óbitos. No período de 1999 a 2004, observou-se o aumento da proporção de malária por *P. falciparum* de 18,6% para 23,7%, sendo que os estados do Amazonas, Amapá, Maranhão, Pará e Rondônia os que mais contribuíram para esse aumento.

Esplenomegalia e ativação policlonal do sistema imune são fatores comuns associados à malária humana (1-3). A malária cerebral, uma das complicações frequentes na infecção pelo *P. falciparum*, está associada à citoaderência de eritrócitos infectados nos capilares do cérebro (4).

Na malária, a imunidade induzida pela presença do parasita nunca chega a conferir proteção total. No entanto, indivíduos que contraíram por diversas vezes infecções adquirem uma proteção contra os sintomas clínicos e apresentam níveis de parasitemia mais brandos (5). Por outro lado, a exposição esporádica de indivíduos ao *Plasmodium*, torna-os vulneráveis ao aparecimento das manifestações clínicas (6, 7). Na malária, a imunidade induzida pela presença do parasita nunca chega a conferir proteção total. No entanto, indivíduos que contraíram por diversas vezes infecções adquirem uma proteção contra os sintomas clínicos e apresentam níveis de parasitemia mais brandos (5). Por sua vez, a exposição esporádica de indivíduos ao *Plasmodium*, torna-os vulneráveis ao aparecimento das manifestações clínicas (6, 7). Em áreas endêmicas de malária as chances de a infecção evoluir para as formas graves da doença como malária cerebral e placentária, anemia severa e doença pulmonar são grandes. Os mecanismos que levam a essas patologias ainda são incertos, no entanto, acredita-se que, entre outros fatores, uma resposta pró-inflamatória mediada por citocinas e células efetoras pode mediar essa patologia (8, 9). Algumas espécies de *Plasmodium* já são capazes de adquirir mecanismos de fuga do imune e desta forma prevenir o desenvolvimento de uma imunidade estéril (10-12). Dessa forma, entre os mecanismos envolvidos na imunossupressão podemos destacar a participação de uma população de células T reguladoras que podem beneficiar o parasita por controlar uma resposta imune efetora. A possível contribuição de células T reguladoras

Zago, C. A.

O papel das células T_{reg} e da IL-2 na resposta policlonal de células CD4⁺ durante a infecção pelo *P. chabaudi*

para a evasão imune durante a malária sugere que a ativação destas células pode ser um dos mecanismos pelo qual o *Plasmodium* manipula o sistema imune do hospedeiro. No entanto, pouco se sabe como os parasitas ativam as células T reguladoras.

1.2 CÉLULAS T REGULADORAS

A ativação do sistema imune é caracterizada por uma diversidade de células altamente dinâmicas e efetivas. Dentre os mecanismos envolvidos, destaca-se a capacidade da célula distinguir entre o próprio e o não próprio, além de diferenciar agentes inócuos de patogênicos, e com isso impedir uma resposta imune desnecessária, muitas vezes autodestrutiva. Na década de 90 foi descrita a ação de uma pequena população de linfócitos T que expressa a cadeia α (CD25) do receptor para IL-2 (IL-2R) (13). Estas células apresentam o fenótipo de células experimentadas e constituem, nos órgãos linfóides periféricos de camundongos normais (não imunizados), aproximadamente 10% das células CD4⁺ e 1% das células CD8⁺. A participação das células CD4⁺CD25⁺ na regulação das respostas autoimunes foi demonstrada experimentalmente em ensaios de transferência celular. Neste trabalho os autores mostram que, camundongos BALB/c^{nu/nu} (atímicos) reconstituídos com células do baço de camundongos BALB/c^{+/+} desprovidas da população CD25⁺ desenvolveram, três meses mais tarde, doenças autoimunes órgão-específicas e sistêmicas (14). O fato de que estas doenças autoimunes são acompanhadas do aumento de anticorpos auto-reativos na circulação, como por exemplo, anticorpos específicos contra células parietais gástricas, tireoglobulina e DNA dupla-fita, sugere que as células CD4⁺CD25⁺ exercem uma ação reguladora sobre as células B (15). Além disso, camundongos timectomizados até o terceiro dia após o nascimento desenvolveram várias doenças autoimunes devido à diminuição da população de células CD4⁺CD25⁺ residente (16). Neste caso, o aparecimento de doenças autoimunes em camundongos adultos desprovidos de células CD25⁺ podia ser revertido por meio da co-transferência destas células.

As células CD4⁺CD25⁺ reguladoras (T_{reg}) são caracterizadas pela expressão constitutiva de marcadores de ativação como GITR (proteína relacionada ao receptor do fator de necrose tumoral que é induzida por glicocorticóide) (17), CTLA-4 (antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos) (18), mTGF- β (fator indutor de crescimento β de membrana) (19), além do fator de transcrição Foxp3 (do inglês *forkhead box p3*) (20-22) e da baixa expressão do CD45RB (13). A principal ação do Foxp3 é reprimir vários sinais de ativação das células CD4⁺. Além disso, o Foxp3 também pode ativar também certos genes nas células T_{reg} embora o mecanismo exato de supressão ainda não esteja bem claro.

Até o momento, o mecanismo regulador das células CD4⁺CD25⁺ é bastante controverso, porém, existem evidências de que a regulação é exercida por meio da interação célula-célula e envolve o mTGF-β (19). Em modelos experimentais de infecção por *Leishmania major*, a resposta está sujeita à regulação pelas células CD4⁺CD25⁺. Nesse caso, camundongos BALB/c SCID reconstituídos com células esplênicas CD25⁻ produziram grandes quantidades de IL-4 e apresentavam um agravamento das lesões. Evidência da participação destas células na regulação das respostas imunes também foi demonstrada em um modelo de infecção por *Pneumocystis carinii*. Neste trabalho, os autores mostram que a transferência de uma população de células T desprovida de células CD4⁺CD25⁺ para camundongos SCID infectados pelo *P. carinii* leva ao desenvolvimento de uma pneumonia severa, enquanto que a transferência de células totais não induz a doença (24).

Células com capacidade reguladora que apresentam graus variados de semelhança com as células T_{reg} naturais também podem ser geradas na periferia. Essa população inclui as células do tipo 1 (T_{RI}) que secretam IL-10 (25), as células Th3 que secretam TGF-β (26), e as células que são convertidas em Foxp3⁺ (27). O contato com patógenos, por exemplo, pode ser um dos mecanismos responsáveis para a origem dessas células. Gazzinelli e colaboradores, em um modelo de infecção murina com *Toxoplasma gondii*, mostraram que a IL-10 produzida pelas células T é capaz de regular a resposta efetora, uma vez que camundongos deficientes para a produção desta citocina podem controlar o número de parasitas, mas sucumbem a uma imunopatologia por não conter a resposta imune (28). Além disso, estudos *in vitro* mostraram a conversão de células CD4⁺CD25⁻ virgens através da ligação com o TCR e na presença de TGF- em células reguladoras Foxp3⁺ (29). Da mesma forma, durante a infecção com *T. gondii*, linfócitos intra-epiteliais secretam TGF-β e previnem o desenvolvimento de uma forma letal de toxoplasmose (26).

Atualmente, já se sabe que as células T_{reg} podem controlar a intensidade de uma resposta infecciosa secundária. Em um modelo de infecção com HCV (vírus da hepatite C) em chimpanzés, as células T_{reg} naturais podem controlar as células T efectoras específicas não somente na fase crônica da doença, mas também após a sua cura (30). Além disso, estas células também podem aumentar a eficiência de vacinas contra agentes infecciosos (31, 32).

1.3 INTERLEUCINA-2

Estudos *in vitro* revelam que a produção precoce de IL-2 por células CD4⁺ ativadas, induz a proliferação e a diferenciação destas células após a ligação com o receptor de alta afinidade composto pelas cadeias α (CD25), β (CD122) e γ (CD132). A subunidade IL-2R α é necessária para aumentar a afinidade do receptor ao ligante, além de favorecer a aproximação das subunidades β e γ (33). A subunidade IL-2R β está constitutivamente ligada à Janus cinase 3 (Jak3), mas também ser induzida a se ligar à Jak1, por meio dos resíduos tirosina localizados na região S, dando início a uma cascata de sinalização que envolve Syk, STAT5, MAPK e PI3K, entre outras moléculas (33, 34). A subunidade IL-2R γ é compartilhada com outras citocinas, tais como IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21 (33), e é responsável pela endocitose do complexo IL-2/IL-2R (35).

Supunha-se que a capacidade da IL-2 induzir proliferação e diferenciação de linfócitos também seria observada *in vivo* uma vez que a injeção de IL-2 em pacientes com HIV ou câncer era capaz de aumentar o número de células T (36, 37). A ação da IL-2 começou a ser questionada quando se observou que camundongos deficientes em IL-2 ou IL-2R apresentavam linfoproliferação seguida pelo desenvolvimento de autoimunidade letal (38-40). Estes dados poderiam ser um indicativo de que a IL-2 estaria envolvida na regulação da resposta imune em um mecanismo de morte celular induzida por ativação (AICD) (41-43) via FAS e FAS-L (44, 45) ou prejudicando a geração e função de células T_{reg}, uma vez que camundongos deficientes em IL-2 (IL-2KO) apresentam uma diminuição do número de células CD4⁺CD25⁺ (46, 47). A reconstituição de camundongos IL-2KO com células CD4⁺CD25⁺ de camundongos imunocompetentes era capaz de prevenir o desenvolvimento de uma auto-imunidade letal (48).

Alguns trabalhos mostram que a resposta hiperproliferativa observada em camundongos deficientes em IL-2 e IL-2R não é devido a um defeito intrínseco das células T, mas sim da falta de células T_{reg}. Estes resultados sugerem um papel importante da IL-2 para a geração e manutenção dessas células (39, 49, 50). No entanto, estudos mais recentes mostram que os sinais da IL-2 não são necessários para a expressão de Foxp3 e nem para o estabelecimento de células T_{reg} naturais durante o desenvolvimento tímico, embora as vias metabólicas e de sobrevivência encontrem-se prejudicadas na ausência dos sinais da IL-2, mostrando que a IL-2 assegura a homeostase das T_{reg} naturais (51).

1.4 *P. chabaudi*, CÉLULAS T_{REG} E IL-2

O modo como o sistema imune comporta-se nas doenças infecciosas é certamente diferente daquele observado após imunizações com doses baixas e repetidas de antígenos administradas durante um longo período de tempo. Assim, nas infecções por diferentes patógenos como vírus (52-55), micoplasma (56), bactérias (57), protozoários (2, 58-68) e helmintos(69), observamos uma intensa ativação celular, seguida por proliferação e diferenciação de uma grande fração dos linfócitos T e B, ao invés de uma resposta linfocitária restrita a alguns clones patógeno-específicos. O aumento na produção de anticorpos que reagem com uma gama ampla de antígenos, incluindo moléculas próprias, também é uma característica comum a este tipo de resposta imune (70, 71). Além disso, em quase todas as infecções, a ativação policlonal coincide com o estabelecimento de uma imunossupressão severa, que é caracterizada pela incapacidade de gerar respostas oligoclonais a antígenos heterólogos (62, 63, 72-82). Porém, apesar das evidências sugerirem que esta é uma forma usual de reação do sistema imune às doenças infecciosas, ainda existe inúmeras lacunas no que se refere aos mecanismos envolvidos. Nesse sentido, vale ressaltar que a ativação policlonal, embora inclua os linfócitos T e B convencionais que normalmente participam na resposta imune adquirida, pode ser considerada como parte da imunidade inata uma vez que não requer contato prévio com o patógenos. Assim sendo, é razoável supor que componentes da imunidade inata e adquirida participem da ativação policlonal.

A ativação policlonal na malária, uma das doenças infecciosas mais prevalentes em países tropicais, está associada a esplenomegalia, hipergamaglobulinemia, produção de auto-anticorpos e imunossupressão (2, 58, 68, 83-88). Na infecção de camundongos pelo *P. chabaudi*, um modelo experimental extremamente útil para a investigação da imunobiologia do ciclo eritrocítico, observa-se uma intensa ativação policlonal das células T e B esplênicas que se caracteriza pela produção exacerbada de IFN- γ , IgM e IgG2a (67, 86-89). Enquanto a IgM é produzida independente de células T, a mudança de classe para IgG2a é T-dependente e requer a coestimulação através da molécula CD28 (67, 89). A análise por diluição limitante das células B ativadas durante a infecção pelo *P. chabaudi* corrobora a noção de que a ativação policlonal é responsável pela produção de IgM e IgG2a que reagem com antígenos próprios (87). Este estudo mostra que o aumento do número de células B que secretam auto-anticorpos durante a fase aguda da doença reflete a

expansão geral do compartimento de células ativadas, sem qualquer aumento de frequência que pudesse indicar a existência de uma resposta preferencialmente dirigida ao antígeno. As células B produtoras de anticorpos parasita-específicos também estão incluídas entre a população de células que se expande durante a ativação policlonal induzida pelo *P. chabaudi* (86). Com a evolução da doença, as células T e B ativadas policlonalmente são, em grande parte, eliminadas por apoptose (90, 91), assegurando o desenvolvimento da imunidade adquirida.

Enquanto a sobrevivência dos camundongos infectados pelo *P. chabaudi* depende da capacidade de controlar a replicação do parasita durante a fase aguda da doença através de mecanismos efetores mediados pelo IFN- γ , os anticorpos são essenciais tanto para a resolução da fase crônica como para a proteção contra infecções subseqüentes (91-100). Assim sendo, as células CD4⁺ desempenham um duplo papel na resistência às formas do ciclo eritrocítico, atuando não apenas como fonte de IFN- γ , mas também como coadjuvantes na geração da imunidade humoral. Uma vez que os eventos iniciais do processo de ativação celular são extremamente importantes para determinar o feitiço da resposta imune, torna-se crucial elucidar quais os mecanismos envolvidos na ativação policlonal das células CD4⁺ durante a infecção pelo *P. chabaudi*. Entre os diversos fatores que participam na ativação de células CD4⁺ destaca-se a participação da IL-2. Como já citado anteriormente a IL-2 foi originalmente descrita como um potente fator de crescimento para as células T (101), que também exibe uma atividade pró-apoptótica (102, 103), além de desempenhar uma função chave na regulação da resposta imune, que se acredita seja a principal atividade não redundante desta citocina (104). Assim, embora a imunidade contra algumas infecções virais possa ser gerada na ausência de IL-2 (19, 105), esta citocina parece ser essencial para prevenir o desenvolvimento de doenças autoimunes (106, 107), através de um mecanismo dependente de células CD4⁺CD25⁺ reguladoras (108, 109) que dependem da IL-2 parácrina para serem geradas, mantidas e ou exercerem sua função reguladora (102, 110, 111).

Ainda pouco se sabe sobre a ação da IL-2 na infecção pelo *P. chabaudi*. No entanto, durante a infecção pelo *P. berghei*, a proliferação de células CD4⁺ e a produção de IL-2 são fortemente inibidas em camundongos resistentes ao desenvolvimento da malária cerebral, os quais se tornam susceptíveis na ausência de células T_{reg} (112). Por outro lado, a IL-15 é capaz de aumentar os mecanismos protetores envolvidos na imunidade inata e

adaptativa, como a síntese de IL-12 e IFN- γ e a produção de anticorpos específicos para o *P. chabaudi* (113). Enquanto inúmeros trabalhos mostram a participação das células T_{reg} na infecção por diferentes espécies de *Plasmodium* (114-117), na infecção pelo *P. chabaudi adami* a expansão e a ativação de células T_{reg} representam uma resposta reguladora que diminui as respostas inata e adaptativa que estão associadas com a infecção letal (118).

Portanto, avaliar a participação da IL-2 na resposta imune ao *P. chabaudi* pode acrescentar informações relevantes não apenas em relação aos mecanismos envolvidos na ativação policlonal, mas também sobre a maneira como esta resposta é controlada por células T_{reg}. Esses são aspectos importantes a serem investigados na medida em que a ativação do sistema imune parece ser um elemento essencial para o desenvolvimento dos processos patogênicos associados à malária, tais como a anemia, a malária cerebral, a malária placentária e o choque sistêmico (119-121). Por outro lado, determinar o papel da IL-2 na proliferação e na apoptose de células T, durante a ativação policlonal induzida pelo *P. chabaudi*, pode contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos na aquisição de imunidade contra estes parasitas. Nesse sentido, é importante mencionar que a apoptose de células T tem sido apontada como um dos fatores responsáveis pela dificuldade dos indivíduos infectados desenvolverem imunidade contra a malária (122, 123).

2 OBJETIVO

Neste trabalho tivemos como objetivo avaliar a importância das células T_{reg} e da IL-2 durante a infecção pelo *P. chabaudi*. Para tanto enfocamos os seguintes aspectos:

1. Análise fenotípica das células T_{reg} durante a infecção primária;
2. Estudo da influência das células T_{reg} na ativação de células CD4⁺ e na produção de anticorpos;
3. Comparação dos efeitos *in vivo* e *in vitro* de dois anticorpos monoclonais anti-IL2;
4. Avaliação dos efeitos da neutralização da IL-2 na ativação de células CD4⁺, nos números de células T_{reg} e na evolução da doença;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Camundongos, parasitemia e infecção.

Camundongos fêmeas das linhagens isogênicas C57BL/6 e SCID C57BL/6, com 6 a 8 semanas de idade, foram obtidos do Biotério de Camundongos Isogênicos da Universidade de São Paulo. O *P. chabaudi* AS foi mantido congelado em nitrogênio líquido. Para as infecções, os camundongos foram inoculados pela via intra-peritoneal (i.p.) com 10⁶ eritrócitos parasitados (EP). As parasitemias foram monitoradas através de esfregaços sanguíneos corados pelo método de Giemsa.

3.2 Suspensões de células esplênicas

As células do baço foram processadas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml), 2-mercaptoethanol (50 µM), L-glutamina (2 mM), piruvato de sódio (1 mM) e 3% ou 10% de soro bovino fetal (SBF) inativado. Todos os suplementos foram adquiridos da Life Biotechnologies (CA, USA). O número de células esplênicas foi determinado por contagem em câmara de Neubauer.

3.3 Análise fenotípica das células esplênicas

As células esplênicas (10⁶) foram marcadas com anticorpos monoclonais (mAb) marcados com fluorocromo FITC (do inglês Fluorescein Isothiocyanate), PE (do inglês Phycoerythrin) ou Cy (do inglês Cy-chrome). Os mAbs anti-CD4 (H129.19), anti-CD25 (PC61), anti-CD122 (TMβ1), anti-CTLA-4 (UC-4F10-11), anti-CD45RB (16A) e anti-CD69 (H1.2F3) foram adquiridos da PharMingen. O anticorpo biotilado anti-mTGF-β (G766B, Promega, Wisconsin, USA) foi revelado com estreptoavidina marcada com FITC (PharMingen, CA, USA). O anticorpo não marcado anti-GITR (108619, RD System, MN, USA) foi revelado com imunoglobulina (Ig) policlonal anti-rato (PharMingen). As células foram analisadas em citômetro de fluxo (FACScalibur, CA, USA) usando o software CELL QUEST. Os números de células grandes de cada população foram determinados de acordo com tamanho (FSC), usando janelas definidas no histograma de esplenócitos não ativados.

3.4 Ensaio de secreção de IL-2

O ensaio de secreção de IL-2 foi executado de acordo com as recomendações do fabricante (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Em resumo, células esplênicas (2×10^6) foram incubadas em meio RPMI contendo 5% de SBF por 3 horas na presença ou não de mAb anti-CD3 (PharMingen) aderidos à placa de cultura. As células foram então marcadas com um anticorpo bifuncional capaz de se ligar ao CD45 por uma extremidade e a IL-2 pela outra e a seguir, incubadas por 45 minutos a 37°C a fim de permitir a secreção da citocina. A presença de IL-2 ligada ao anticorpo bifuncional foi detectada usando um mAb anti-IL-2 PE (PharMingen) seguida da marcação extracelular conforme descrito anteriormente. As suspensões de células foram analisadas em citômetro de fluxo usando o software CELL QUEST. O uso de células de camundongos não infectados estimuladas com mAb anti-CD3 (as quais sabidamente secretam IL-2) nos permitiu eliminar a possibilidade de uma marcação inespecífica durante o ensaio. Assim, após a incubação por 3 horas na presença de mAb anti-CD3 aderidos à placa de cultura, realizamos o ensaio de secreção, porém, as células não receberam o anticorpo bifuncional.

Figura 1- Teste do anticorpo bifuncional. Células esplênicas de camundongos não infectados estimuladas por 3 horas na presença de mAb anti-CD3 aderido à placa de cultura seguido do ensaio de secreção de IL-2 na presença ou ausência do anticorpo bifuncional.

3.5 Expansão e purificação do hibridoma produtor dos mAbs anti-IL-2 (clones JES6-1A12 e S4B6) e GL117

Os mAbs anti-IL-2 foram produzidos a partir dos hibridomas anti-IL-2 (clone JES6-1A12, rat IgG2a), anti-IL-2 (clone S4B6, rat IgG2a) gentilmente cedidos pela Dra. Ises de Almeida Abrahamsohn, USP. A expansão dos hibridomas foi realizada *in vitro*, a 37°C, em estufa de CO₂. Para a purificação foi utilizada uma coluna de proteína G (Amersham Bioscience, NJ, USA) acoplada a uma bomba a vácuo (Pharmacia Biotech, Uppala, Sweden), equilibrada com uma solução de fosfato de sódio bibásico (NaH₂PO₄ 0,01 M) pH 7. Após o equilíbrio da coluna e passagem do sobrenadante, os mAbs aderidos à proteína G foram eluídos com uma solução de glicina 0,1 M pH 2,7. Para a neutralização das amostras foi utilizada uma solução Tris 1 M pH 9. A quantidade de IgG foi determinada por espectrofotometria a 680 nm, usando o método de Lowry. A concentração de cada solução de mAbs foi estocada a 4°C. Os camundongos foram tratados i.p. com mAb (1 mg/animal/dia) nos dias 0, 2 e 4 após a infecção.

3.6 Marcação de células esplênicas com carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster

Para os experimentos de proliferação celular *in vitro* as células esplênicas dos animais não infectados e infectados nos dias 5 e 20 foram “marcadas” com CFSE (do inglês CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester, Molecular Probes, OR, EUA). Esta técnica permite a marcação e visualização de células por citometria de fluxo. Células esplênicas (3×10^7) foram incubadas em PBS (do inglês Phosphate-buffered saline) contendo 0,1% de BSA (do inglês Bovine serum albumin) e 5 µM de CFSE, por 15 minutos a 37°C, ao abrigo da luz. Após este passo, as células foram lavadas duas vezes (centrifugação por 5 minutos, 4°C, 250 g) em meio RPMI contendo 10% de SBF e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio RPMI contendo 10% de SBF na concentração de 1×10^7 células/ml e incubadas na ausência de estímulos, estimuladas com mAb anti-CD3 (1,25 µg/ml), ou com 3×10^6 eritrócitos parasitados. Após 72 horas de cultura proliferação celular foi analisada por citometria de fluxo.

3.7 Marcação para Foxp3

Após a marcação externa das células, conforme descrito anteriormente, as células esplênicas (1×10^6) foram incubadas com 100 μ l de Cytotfix/Cytoperm (Pharmingen) durante 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, as células foram lavadas uma vez (centrifugação por 5 minutos a temperatura ambiente) com PBS e a seguir incubadas com PBS contendo 1% de paraformaldeído (Sigma- Aldrich, Missouri, USA) e 0,5% de Tween 20 (Sigma- Aldrich) por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após este tempo, as células foram lavadas uma vez com PBS e incubadas com anticorpos anti-Foxp3 (clone FJK-16s, eBioscience, CA,USA) na concentração de 1:50 por 2 horas, lavadas novamente com PBS (por duas vezes) e ressuspensas em PBS contendo 1% de SBF e 0,05% de azida sódica.

3.8 Reconstituição de camundongos SCID com células esplênicas totais e desprovidas da população CD25

As células CD25⁺ foram retiradas da população de células esplênicas com o auxílio de microesferas de ferro (microbeads) de acordo com as instruções do fabricante (MACS; Miltenyi Biotec). Em resumo, as células esplênicas foram incubadas com anticorpos anti-CD25 PE em concentrações ideais por 30 minutos, em seguida as células foram incubadas com microbeads acopladas a anticorpos anti-PE (MACS; Miltenyi Biotec) por mais 30 minutos. A separação foi realizada com uma coluna LS (Midi MACS; Miltenyi Biotec). A pureza da população CD4⁺CD25⁺ foi de $\geq 98\%$. Os camundongos SCID foram reconstituídos i.v. com 1×10^7 células esplênicas totais (SCID total) ou desprovidas da população CD25⁺ (SCID CD25⁻) e infectados depois de 24 horas.

Figura 2- Análise da pureza após a separação da população CD25⁺ das células esplênicas de camundongos não infectados. Os dot-plots representam a janela de células CD4⁺.

3.9 Detecção por ELISA dos anticorpos totais, específicos ao parasita e auto-anticorpos anti-LDL e anti-LDL oxidado (anti-OXLDL)

Anticorpos totais, anti-*P. chabaudi*, auto-anticorpos anti-LDL e anti-OXLDL foram quantificados por ELISA (do inglês Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) como descrito por Cavinato e colaboradores (124). Em resumo, placas de 96 poços (Costar, NY, USA) foram incubadas por 18 horas a 4°C com anti-Ig (10 µg/ml), extrato *P. chabaudi* na fase intra-eritrocítica (8 µg/ml) e LDL ou OXLDL (10 µg/ml) (gentilmente cedidos pelo Dr. Magnus Ake Gidlund). Para o bloqueio da reação, as placas foram saturadas com PBS contendo 1% de BSA por 1 hora. Após a lavagem, 50 µl das amostras de soro dos camundongos em diluições decrescentes foram adicionadas e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. O ensaio foi revelado adicionando-se anticorpos de cabra anti-IgG conjugados á peroxidase (Southern Biotechnology Associates, Al, USA), diluídos 1:2000 em PBS-tween contendo 1% de BSA. Por fim, as placas foram novamente lavadas e 50 µl de uma solução contendo o substrato H₂O₂ e o cromógeno OPD (do inglês O-phenylenediamine, Sigma-Aldrich), diluídos em tampão citrato/fosfato de sódio, foram adicionados. A reação foi parada com ácido cítrico e a leitura realizada através de um espectrofotômetro Spectra Max 190 (Molecular Devices, CA, USA), utilizando o comprimento de onda 450 nm.

3.10 Ensaio de ELISASPOT

As células secretoras de anticorpos foram quantificadas pelo ensaio de ELISASPOT (do inglês Enzyme-linked Immunospot Assay), conforme descrito anteriormente (87). Em resumo, placas de 96 orifícios (Costar) foram revestidas com anticorpos de cabra anti-Ig total de camundongos (10 µl/ml). As placas foram saturadas com PBS contendo 1% de gelatina (Merck, Darmstadt, Germany). Diluições decrescentes de células esplênicas (10⁶ a 5 x 10² células/orifícios) em meio RPMI contendo 1% de SFB foram adicionadas a placa de cultura e incubadas por 6 horas, 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂. Os *spots* foram revelados adicionando-se anticorpos biotinilados de cabra anti-IgM ou IgG2a de camundongo seguido por avidina conjugada a fosfatase alcalina (todos os anticorpos e conjugado foram adquiridos da Southern Biotechnologies Associates). O BCIP (do inglês 5-Bromo-chloro-3-indolyl phosphate, Sigma-Aldrich) diluído em AMP (do inglês 2-amino 2-methyl 1-propanol, Merck) foi usado como substrato. Os números de *spots* por baço para cada isótipo foram calculados levando-se em consideração os números totais de células esplênicas. A diluição dos *spots* foi feita com 50 µl de DMSO (do inglês Dimethyl sulfoxide, Merck) por orifício.

3.11 Marcação com anexina V

Para a quantificação de apoptose, as células esplênicas (1x10⁶) foram marcadas com mAb anti-CD4 (H129.19) por 30 minutos a 4°C, sem lavagens prévias. Após este período, as células foram marcadas diretamente com uma solução anexina V (PharMingen) por 15 minutos à temperatura ambiente e protegidas da luz. A análise da expressão de anexina V em linfócitos T foi realizada a partir das janelas de células CD4⁺.

3.12 Determinação dos sintomas clínicos

O hematócrito foi determinado completando-se com sangue ¾ do tubo capilar com heparina (Perfecta, SP, BR) que foi vedado de um lado, seguido da centrifugação por 5 minutos na centrífuga de micro-hematócrito (Fanem, SP, BR), e analisado no cartão de leitura de hematócrito (Fanem). A temperatura retal foi averiguada com termômetro digital

(Becton Dickinson) e o peso determinado em balança de precisão (Sartorius, Goettingen, Germany). A hemoglobina foi dosada por reação colorimétrica pelo método de cianeto de hemiglobina (HiCN). As amostras de sangue total (2 µl), coletadas com heparina, foram adicionadas ao reagente de cor (Labtest, SP, BR) e homogeneizadas. Após 5 minutos, a absorbância foi determinada através de um espectrofotômetro Spectra Max 190 (Molecular Devices), utilizando o comprimento de onda 540 nm. O valor em g/dl foi calculado utilizando o fator de calibração obtido com o padrão de hemoglobina (Labtest).

3.13 Análise estatística

Foi utilizado o teste ANOVA, seguido por análise de comparações múltiplas, segundo o método Turkey. Para os gráficos que comparam dois grupos foi utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa InStat (Graph Pad Software). As diferenças entre os grupos são consideradas significantes para valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

PARTE I

**INFLUÊNCIA DAS CÉLULAS T_{REG} NA
ATIVAÇÃO POLICLONAL INDUZIDA PELO**

P. chabaudi

4.1 Expressão das cadeias α (CD25) e β (CD122) do IL-2R nas células CD4⁺ do baço de camundongos infectados com *P. chabaudi*

Inicialmente, a parasitemia e os números de células esplênicas e células CD4⁺ foram determinados nos camundongos C57BL/6 infectados i.p. com 10⁶ EP. O acompanhamento diário das parasitemias destes animais mostra o aparecimento dos parasitas a partir do terceiro dia após a infecção com as parasitemias atingindo valores máximos no dia 7, quando aproximadamente 60% dos eritrócitos estão parasitados, sendo que aos 30 dias de infecção raros parasitas são encontrados na circulação sanguínea (Figura 1A). Um aumento no número de células esplênicas e de células CD4⁺ acompanha o pico de parasitemia, ou seja, estes números aumentam de $69,6 \pm 7,4 \times 10^6$ e $43,0 \pm 1,6 \times 10^5$ nos camundongos não infectados (Dia 0) para $171,3 \pm 8,8 \times 10^6$ e $105,0 \pm 3,5 \times 10^5$ no dia 7 de infecção, respectivamente (Figura 1A).

Em relação à expressão do IL-2R, nossos resultados mostram que camundongos não infectados apresentavam apenas uma população de células de células CD4⁺ ($11,5 \pm 2,5$) com alta expressão de CD25 e baixa expressão de CD122 (CD25⁺CD122^{LOW}). No dia 4 p.i., observamos um aumento na frequência destas células ($14,0 \pm 1,9$), sendo que no dia 7 de infecção a população CD25⁺CD122^{LOW} era aproximadamente a metade da frequência observada nos camundongos controle ($5,4 \pm 0,5$). Porém no dia 30 de infecção os valores retornaram próximos dos observados nos camundongos não infectados ($13,3 \pm 0,2$ Figura 1B).

Após a infecção, a expressão de CD122 nas células CD4⁺ aumentou drasticamente, evidenciando duas subpopulações distintas. A primeira, que se caracteriza pela alta expressão das duas cadeias do IL-2R, CD25 e CD122, estava presente no quarto e no sétimo dias de infecção. A frequência destas células foi de $3,4 \pm 0,9$ no dia 0 para $13,2 \pm 2,8$ no dia 4 e $13,4 \pm 3,8$ no dia 7. A segunda subpopulação, que expressava apenas o CD122, pôde ser observada uma semana após a inoculação dos parasitas. Após esse período, a expressão de ambas as cadeias do IL-2R diminuiu, em relação ao dia 7, porém 30 dias p.i. apenas a população com alta expressão de CD122 permaneceu superior àquela observada nos camundongos não infectados (Figura 1B).

A fim de obter informações sobre o grau de ativação das diferentes subpopulações, as células CD4⁺CD25⁻CD122^{LOW}, CD4⁺CD25⁺CD122^{LOW}, CD4⁺CD25⁻CD122^{HIGH} e CD4⁺CD25⁺CD122^{HIGH} foram avaliadas de acordo com o

tamanho celular. Como mostra a figura 1C, nos camundongos não infectados apenas a população de células CD4⁺CD25⁺CD122^{HIGH} apresentava tamanho celular grande. No entanto, no dia 7 p.i., as células CD4⁺ que expressavam altos níveis de CD122, tanto a população CD4⁺CD25⁻CD122^{HIGH} como a população CD4⁺CD25⁺CD122^{HIGH}, apresentavam um tamanho celular grande, enquanto aquelas que possuíam o fenótipo CD122^{LOW} (CD4⁺CD25⁻CD122^{LOW} e CD4⁺CD25⁺CD122^{LOW}) eram, em sua maioria, de tamanho pequeno. Resultados similares foram observados nos dias 4 e 30 p.i.. Estes dados mostram que a maioria das células CD4⁺ que se encontram ativadas ou em proliferação em resposta ao *P. chabaudi* expressam a cadeia β do receptor de IL-2 (CD122), mas somente uma parte delas co-expressa a cadeia α CD25.

Figura 1- Parasitemia, número de células esplênicas, células CD4⁺ e da expressão de CD25 e CD122 durante a infecção pelo *P. chabaudi*. As células esplênicas dos camundongos C57BL/6 infectados i.p. com 10^6 EP pelo *P. chabaudi* foram analisadas no dia 7 de infecção. A, cinética da parasitemia, número de células por baço e de células CD4⁺ nos camundongos infectados. B, *Dot-plots* representativos da expressão de CD25 e CD122 em células CD4⁺ esplênicas de camundongos controles (dia 0) e nos dias 4, 7 e 30 p.i.. C, histogramas representativos do tamanho (FSC) das subpopulações de células CD4⁺ do baço de camundongos controles (dia 0) e infectados (dia 7), subdivididas em relação à expressão de CD25 e CD122. Camundongos não infectados foram usados com controle. Em B e C, as porcentagens de células em cada janela e os desvios-padrão (DP) estão indicadas nos painéis. Os dados são representativos de 2 experimentos realizados em separado (n=4). *, $p < 0,05$ entre os animais controles e infectados.

4.2 Análise fenotípica de células CD4⁺ secretoras de IL-2 no baço de camundongos durante a infecção primária pelo *P. chabaudi*

Determinado a cinética de expressão do receptor de IL-2, o próximo passo foi determinar quais são as subpopulações de células CD4⁺ que secretam IL-2 durante a ativação policlonal induzida pelo *P. chabaudi*. As células CD4⁺ esplênicas dos camundongos C57BL/6 infectados i.p. com 10⁶ EP foram analisadas de acordo com a secreção de IL-2, expressão do IL-2R e tamanho celular. Células de camundongos não infectados estimuladas *in vitro* com mAb anti-CD3 aderidos á placa de cultura foram utilizadas como controle positivo. Como mostra a figura 2A, observamos uma secreção basal de IL-2 entre os dias 0 e 4 p.i.. Porém, no dia 5 de infecção a frequência de células CD4⁺ que secretam IL-2 para 8% e permanece até o dia 7 de infecção, quando 10% das células CD4⁺ secretam a citocina. O número de células CD4⁺ esplênicas secretoras de IL-2 aumenta de $0,7 \pm 0,1 \times 10^6$ no camundongo não infectado para $6,9 \pm 0,2 \times 10^6$ no dia 7 de infecção ($p < 0,05$). No dia 15 p.i. , a frequência de células CD4⁺ secretoras de IL-2 retorna a valores próximos aos dos camundongos não infectados. Entretanto, nesse dia da infecção, o número destas células por baço é de $1,7 \pm 0,2 \times 10^6$, um valor significativamente superior ao observado nos camundongos não infectados ($p < 0,05$).

A análise das células CD4⁺ produtoras de IL-2, tanto no baço de camundongos não infectados como durante a infecção, revelou que a população secretora de IL-2 apresenta tamanho celular grande e co-expressa CD25 e CD122 (cadeias α e β do IL-2R). Em contraste, as células CD4⁺ que não secretam IL-2 apresentam tamanho celular pequeno e baixa expressão do IL-2R, indicativo de que estas células permanecem em repouso (Figura 2B). Estes resultados corroboram com a idéia que, durante a ativação policlonal induzida pelo *P. chabaudi*, a IL-2 é produzida por células CD4⁺ que estão proliferando e co-expressam as cadeias α e β do receptor de IL-2. É interessante notar que este fenótipo é ligeiramente diferente daquele observado em células que secretam IL-2 depois da estimulação com mAb anti-CD3 *in vitro*. Ou seja, estas células apesar de apresentarem um aumento estatisticamente significativo no tamanho celular e na expressão de ambas as cadeias do IL-2R, quando comparadas com as células que não secretam IL-2, apresentam esses parâmetros reduzidos em relação às células que não foram estimuladas com

Zago, C. A.

O papel das células T_{reg} e da IL-2 na resposta policlonal de células CD4⁺ durante a infecção pelo *P. chabaudi*

mAb anti-CD3 (Figura 2B). Provavelmente isto ocorre devido ao forte estímulo e ao tempo de cultura do ensaio.

Figura 2- Análise fenotípica de células $CD4^+$ secretoras de IL-2 no baço de camundongos durante a infecção pelo *P. chabaudi*. As células esplênicas dos camundongos C57BL/6 não infectados (Dia 0) e infectados nos dias 3, 5, 7 e 15 p.i. com 10^6 EP pelo *P. chabaudi* foram colocadas em cultura por 3 horas na presença de meio RPMI ou mAbs anti-CD3 aderidos à placa de cultura, seguido do ensaio de secreção de IL-2. A, secreção de IL-2 pelas células $CD4^+$ do baço de camundongos não infectados (Dia 0) e infectados pelo *P. chabaudi* nos 3, 5, 7 e 15 p.i.. B, dot-plots representativos do tamanho celular (FSC) e da expressão das cadeias α (CD25) e β (CD122) do receptor de IL-2 nas células $CD4^+$ do baço de camundongos não infectados (Dia 0) e infectados pelo *P. chabaudi* nos dias 0, 5, 7 e 15 p.i.. Os valores nos quadrantes e histogramas representam a média $\pm$ DP de um experimento. Os dados são representativos de 2 experimentos realizados em separado (n=4). *, $p < 0,05$ entre os camundongos não infectados (Dia 0) e os dias 3, 5, 7 e 15 p.i. #, $p < 0,05$ entre os camundongos não infectados estimulados ou não com mAb anti-CD3.

4.3 Análise fenotípica das células $CD4^+CD25^+$ durante a infecção pelo *P. chabaudi*

Os resultados anteriores mostraram que as células $CD4^+CD25^+$ nos camundongos infectados podem se dividir em duas subpopulações diferentes; uma composta por células grandes e altos níveis de CD122 e outra constituída de células pequenas apresentando baixa expressão de CD122. Para melhor caracterizar estas subpopulações, camundongos C57BL/6 foram infectados i.p. com 10^6 EP e 7 dias após, as células $CD4^+CD25^+$ do baço foram analisadas de acordo com o tamanho celular, secreção de IL-2 e expressão de alguns marcadores usualmente encontrados em células T_{reg} . Inicialmente, observamos que a grande maioria das células $CD4^+CD25^+$ que secretam IL-2 no dia 7 p.i. apresenta tamanho celular grande (Figura 3A). Resultados similares foram obtidos quando as células do baço de camundongos não infectados (Dia 0) foram estimuladas com mAb anti-CD3 aderidos à placa. Como mostra a figura 3B, células $CD4^+CD25^+$ pequenas de camundongos não infectados assim como de animais no dia 7 p.i. apresentam um fenótipo típico de células T_{reg} , expressando altos níveis de GITR, mTGF- β e CTLA-4, e baixos níveis de CD45RB, em relação às células $CD4^+CD25^-$. Esta análise também revela que em ambos os grupos de camundongos as células $CD4^+CD25^+$ grandes apresentam fenótipo de células ativadas, diferindo das células $CD4^+CD25^+$ pequenas devido à alta expressão de CTLA-4 e CD45RB (Figura 3B).

Figura 3- Análise fenotípica das células CD4⁺CD25⁺ durante a infecção pelo *P. chabaudi*. As células esplênicas dos camundongos C57BL/6 não infectados (Dia 0) e 7 dias p.i. com 10⁶ EP pelo *P. chabaudi* foram colocadas em cultura por 3 horas na presença de meio RPMI ou mAb anti-CD3 aderidos à placa de cultura, seguido do ensaio de secreção de IL-2. A, os *dot-plots* mostram a frequência de células secretoras de IL-2 e o tamanho celular na população de células CD4⁺CD25⁺ dos camundongos controle (Dia 0) e 7 dias p.i. com *P. chabaudi*. B, expressão de GITR, mTGF-β, CTLA-4 e CD45RB nas populações de células CD4⁺CD25⁻ (□), CD4⁺CD25⁺ pequenas (■) e CD4⁺CD25⁺ grandes (▒). Os dados são representativos de 2 experimentos realizados em separado. n=3. Em A, os valores nos quadrantes representam a média ± DP de um experimento.

4.4 Expansão da população de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ durante a ativação policlonal induzida pelo *P. chabaudi*

Com o objetivo de avaliar a participação das células T_{reg} durante a infecção pelo *P. chabaudi*, os números de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ foram determinadas no baço de camundongos C57BL/6 infectados i.p. com 10⁶ EP. Os resultados apresentados na figura 4A mostram que em camundongos não infectados (Dia 0) a grande maioria das células CD4⁺CD25⁺ expressam Foxp3, um fenótipo característico de células T_{reg}. Além disso, nesses camundongos, as porcentagens de células ativadas ou grandes nas populações CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ encontravam-se ao redor de 5%, 10% e 20%, respectivamente. Porém, no dia 7 p.i., apesar da frequência de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ permanecer semelhante aos controles, observou-se um crescimento na porcentagem de células grandes nessa população que praticamente duplicou (de 10% para 16,8%). É interessante notar ainda um aumento acentuado da frequência de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻, que em sua grande maioria encontravam-se ativadas. Considerando os números totais de células por baço, observamos que a infecção pelo *P. chabaudi* induziu um aumento do número de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ no dia 7 p.i. acompanhando a cinética das células CD4⁺ (Figura 4B).

Estes resultados indicam que as células T_{reg} se ativam durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*. Os dados mostram também que, nessa fase da doença, a molécula CD25 está presente tanto nas células T_{reg} como nas células CD4⁺ convencionais que se encontram ativadas.

Figura 4- Análise da população de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ durante a ativação policlonal induzida pelo *P. chabaudi*. A, números de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ no baço de camundongos controles (Dia 0) e 7 e 20 dias p.i. com 10⁶ EP pelo *P. chabaudi*. B, os dot-plots representam a expressão de CD25 e Foxp3 em células CD4⁺ esplênicas de camundongos C57BL/6 controles (dia 0) e infectados (dia 7) e os histogramas representam tamanho celular (FSC) da população de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e células CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ nos dias 0 e 7 p.i. em comparação com população de células CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻. Os valores nos quadrantes e histogramas representam a média ± DP de um experimento. Os dados são representativos de 2 experimentos realizados separadamente (n=4). Em A, * p>0,05 entre os camundongos controle (Dia 0) e infectados. Em B, * p>0,05 entre a população de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ e a população de células CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ no mesmo dia de infecção.

4.5 Análise funcional das células CD4⁺CD25⁺ durante a infecção pelo *P. chabaudi*

Para determinar se as células T_{reg} participam da ativação policlonal induzida pelo *P. chabaudi*, camundongos SCIDs C57BL/6 foram reconstituídos com 1x10⁷ células esplênicas (SCID total) ou com 1x10⁷ células esplênicas desprovidas da população de células CD25 (SCID CD25⁻) provenientes de camundongos C57BL/6. Os camundongos reconstituídos foram infectados i.p. com 10⁶ EP um dia após a reconstituição. Os grupos SCID total e SCID CD25⁻ infectados foram acompanhados durante 20 dias para análise da cinética de parasitemia, que foi verificada através da análise de esfregaços sangüíneos corados por Giemsa. O gráfico mostra que o curso da parasitemia foi similar entre os grupos, no entanto, enquanto os camundongos C57BL/6 foram capazes de controlar a infecção por volta do dia 11, os camundongos SCID total e SCID CD25⁻ continuaram apresentando picos de parasitemia que variavam de 10% a 50% de eritrócitos parasitados até o dia 20 p.i., quando todos os animais foram sacrificados (Figura 5A).

A média do pico de parasitemia, observada no dia 7 de infecção, foi similar entre os camundongos SCID total e camundongos C57BL/6 (em torno de 65%), enquanto que no grupo SCID CD25⁻ a média do pico foi estatisticamente inferior (45%) à observada tanto nos camundongos SCID total como nos camundongos C57BL/6.

Para avaliarmos os efeitos da ausência de células T_{reg} na ativação policlonal induzida pela infecção com *P. chabaudi*, analisamos o número total de células esplênicas e das subpopulações de células CD4⁺, CD8⁺ e B220⁺. Nossos resultados mostram que a ausência de células T_{reg} parece não alterar o número de células esplênicas durante a infecção, uma vez que tanto os grupos de camundongos SCID total como os grupos de camundongos SCID CD25⁻ apresentavam por volta de 30 milhões de leucócitos esplênicos no dia 7 da infecção pelo *P. chabaudi*. (Figura 5B). A análise por citometria de fluxo das subpopulações de células CD4⁺, CD8⁺ e B220⁺ também não revelou diferenças no número absoluto dessas subpopulações entre os grupos de camundongos estudados (Figura 5B).

Figura 5- Análise funcional das células $CD4^+CD25^+$ durante a infecção pelo *P. chabaudi*. Os camundongos C57BL/6 SCID foram reconstituídos com células totais (SCID total) ou desprovidos da população CD25 (SCID CD25⁻) e infectados i.p. com 10^6 EP pelo *P. chabaudi* um dia após a reconstituição. A, parasitemia dos camundongos C57BL/6, SCID total e SCID CD25⁻ infectados com 10^6 EP pelo *P. chabaudi*. B, número de células esplênicas e células $CD4^+$, $CD8^+$ e B220 nos camundongos C57BL/6 e SCID total e SCID CD25⁻ não infectados (Dia 0) e 7 dias p.i. pelo *P. chabaudi*. Dados representativos de 4 experimentos com resultados similares. n=8. *, p>0.05 entre os camundongos SCIDs total e CD25⁻ no mesmo dia de infecção.

4.6 Ativação das células CD4⁺ esplênicas de camundongos infectados pelo *P. chabaudi* na ausência de células CD4⁺CD25⁺

Com a finalidade de verificar a influência das células T_{reg} na ativação das células CD4⁺ durante a infecção pelo *P. chabaudi*, as células CD4⁺ esplênicas dos grupos de camundongos SCID total e SCID CD25⁻ foram analisadas quanto à expressão dos marcadores CD25 (cadeia α do receptor de IL2), CD122 (cadeia β do receptor de IL2) e CD69 (marcador precoce de ativação celular). A análise mostrou que as células CD4⁺ provenientes dos camundongos SCID total apresentam um aumento da expressão desses marcadores no dia 7 de infecção quando comparado aos camundongos C57BL/6 (Figura 6A). No entanto, os camundongos SCID CD25⁻ apresentaram quase o dobro de células com alta expressão de CD25, CD122 e CD69 em relação aos camundongos SCID total no mesmo dia de infecção.

Esse fato também foi observado com relação à produção de IFN- γ . Células esplênicas provenientes de camundongos SCID total e SCID CD25⁻ obtidos no dia 7 da infecção pelo *P. chabaudi* foram colocados em cultura por 48 horas para análise da presença de IFN- γ nos sobrenadantes. Os sobrenadantes de cultura de esplenócitos dos camundongos SCID CD25⁻ mostraram níveis de IFN- γ cerca de 4 vezes maiores que os observados nos sobrenadantes de cultura de esplenócitos dos camundongos SCID total ($4,6 \pm 2,4$ e $21,5 \pm 6,3$ ng/ml, respectivamente) (Figura 6B).

Figura 6- Papel das células $CD4^+CD25^+$ na ativação policlonal de células $CD4^+$ induzida pelo *P. chabaudi*. Camundongos C57BL/6 SCID foram reconstituídos com células totais (SCID total) ou desprovidos da população $CD25$ (SCID $CD25^-$) e infectados i.p. com 10^6 EP pelo *P. chabaudi* um dia após a reconstituição. A, expressão de $CD25$, $CD122$ e $CD69$ nas células $CD4^+$ do baço de camundongos C57BL/6, SCID total e SCID $CD25^-$ não infectados (histogramas brancos) e 7 dias p.i. (histograma cinza) com 10^6 EP pelo *P. chabaudi*. Os valores nos histogramas representam a média $\pm$ DP de um experimento. B, dosagem de IFN- γ no sobrenadante de culturas de 48 horas de células esplênicas dos camundongos SCID total não infectados (Dia 0 $\square$) e 7 dias p.i. ($\circ$) e SCID $CD25^-$ não infectados (Dia 0 $\square$) e no dia 7 de infecção ($\circ$) com 10^6 EP pelo *P. chabaudi*. Dados representativos de 4 experimentos com resultados similares. n=8. *p<0.05 entre os camundongos SCID total e SCID $CD25^-$ no mesmo dia de infecção.

4.7 Análise da resposta humoral nos camundongos infectados pelo *P. chabaudi* na ausência de células CD4⁺CD25⁺

Uma vez constatado a exacerbação da resposta celular em camundongos SCID CD25⁻, o próximo passo foi analisar a resposta humoral entre os grupos de camundongos SCID total e SCID CD25⁻ através da detecção de células produtoras de anticorpos por ELISASPOT na fase aguda e 20 dias p.i.. Analisamos os níveis de anticorpos IgG totais, específicos para o *P. chabaudi* e auto-anticorpos anti-LDL e anti-OXLDL. Nossos resultados mostram que, no dia 7 da infecção, o número de células produtoras de anticorpos do tipo IgM e IgG2a em camundongos SCID CD25⁻ foi similar àquele apresentado por camundongos SCID total (Figura 7A). No entanto, os camundongos SCID CD25⁻ apresentaram um número maior de células produtoras de anticorpos do tipo IgG1 que os camundongos SCID total.

No dia 20 p.i., embora não tenhamos observado diferença nos níveis totais de anticorpos do tipo IgG, é notável que os camundongos SCID CD25⁻ apresentavam níveis elevados no soro de anticorpos do tipo IgG específicos para antígenos do *P. chabaudi* e quase 2 vezes mais auto-anticorpos da classe IgG anti-LDL e anti-OXLDL que os camundongos SCID total (Figura 7B).

Baseado nestes resultados, concluímos que as células T_{reg} apresentam um papel importante no controle da ativação policlonal induzida pelo *P. chabaudi* tanto no que se refere às células CD4⁺ como às células B.

Figura 7- Papel das células $CD4^+CD25^+$ na resposta humoral durante a infecção pelo *P. chabaudi*. Camundongos C57BL/6 SCID foram reconstituídos com células totais (SCID total) ou desprovidos da população $CD25$ (SCID $CD25^-$) e infectados i.p. com 10^6 EP pelo *P. chabaudi* um dia após a reconstituição. A, número de células produtoras de anticorpos do tipo IgM (□), IgG2a (▨) e IgG1 (■) no baço dos camundongos SCID total e SCID $CD25^-$ não infectados (Dia 0) e dia 7 p.i. pelo *P. chabaudi*. B, níveis de anticorpos do tipo IgG totais diluídos 1/800 e 1/600, *P.c.c.* específico e auto-anticorpos anti-LDL e anti-OXLDL em camundongos SCID total e SCID $CD25^-$ 20 p.i. pelo *P. chabaudi*. Os dados são representativos de 4 experimentos com resultados similares. $n=8$. * $p>0.05$ entre os camundongos SCID total e SCID $CD25^-$ no mesmo dia de infecção.

PARTE II

**INFLUÊNCIA DA IL-2 NA ATIVAÇÃO
POLICLONAL INDUZIDA PELO *P. chabaudi***

4.8 Efeito do tratamento com mAb S4B6 durante a infecção primária pelo *P. chabaudi*

Segundo Boyman e colaboradores (125), o mAb S4B6 induz uma proliferação massiva de células CD8⁺ de memória por aumentar a atividade da IL-2 pré-existente através da formação de imunocomplexos citocinas-anticorpos. Assim, com o objetivo de verificar o envolvimento da IL-2 na ativação e na expansão das populações de células CD4⁺ e células T_{reg} decorrentes da infecção pelo *P. chabaudi*, camundongos foram tratados nos dias 0, 2 e 4 p.i. com 10⁶ EP com 1 mg de mAb S4B6.

Inicialmente, a fim de avaliar o curso da infecção pelo *P. chabaudi* durante o tratamento com mAb S4B6, acompanhamos diariamente as parasitemias a partir do terceiro dia de infecção. Os resultados apresentados na figura 8A mostram uma evolução da parasitemia entre os grupos de camundongos tratados com mAb S4B6 e não tratados. No entanto, no dia 7 p.i. os animais tratados com mAb S4B6 apresentaram uma maior frequência de eritrócitos parasitados (48,5±4,9), quando comparados aos camundongos não tratados com o anticorpo (39,5±3,5).

A análise do peso do baço destes animais, no sétimo dia de infecção, mostrou que o tratamento com mAb S4B6 leva a um aumento de 65% no tamanho do baço. A contagem de células esplênicas nucleadas, através de câmara de Neubauer, refletiu os resultados dos pesos do baço, ou seja, um aumento na celularidade dos camundongos tratados com mAb S4B6 no dia 7 p.i. foi maior do que aquela observada nos camundongos não tratados (Figura 8A). Além disso, camundongos não infectados (Dia 0) e tratados mAb S4B6, apesar de não apresentarem um aumento no peso do baço, apresentam um número maior de células esplênicas quando comparados aos animais não tratados.

Observamos um aumento no número de células CD4⁺ no grupo de camundongos controles (Dia 0) e tratados com mAb S4B6, quando comparados com os camundongos não tratados (Figura 8A). Além disso, a infecção nos camundongos tratados com mAb S4B6 resulta em um maior aumento de células CD4⁺ que expressam CD122, sendo que uma parte delas co-expressa o CD25 (Figura 8B). Notavelmente, no dia 7 de infecção, as células CD122⁺ somam até 70% das células CD4⁺ no grupo de camundongos tratados com mAb S4B6 (Figura 8B). Este

fenômeno também foi observado, mas com menos intensidade, nos camundongos tratados com mAb S4B6, mas não infectados (Dia 0).

Figura 8- Efeito do tratamento com mAb S4B6 durante a infecção primária pelo *P. chabaudi*. Camundongos C57BL/6 foram tratados ou não com 1 mg de mAb S4B6 nos dias 0, 2 e 4 p.i. com 10^6 EP pelo *P. chabaudi*. Camundongos não infectados foram usados como controle (Dia 0). A, parasitemia, peso do baço, número de células esplênicas e células $CD4^+$ dos camundongos não tratados ou tratados com mAb S4B6 analisados nos dias 0 e 7 p.i. pelo *P. chabaudi*. B, expressão de CD25 e CD122 nas células $CD4^+$ de camundongos tratados com mAb S4B6 e analisados nos dias 0 e 7 de infecção. Em B os valores nos histogramas representam a média $\pm$ DP de um experimento.. Dados representativos de 4 experimentos com resultados similares. n=6. *p>0.05 entre os camundongos tratados com mAb S4B6 e não tratados no mesmo dia de infecção.

4.9 Efeito do tratamento com mAb S4B6 na resposta das células CD4⁺ esplênicas de camundongos infectados pelo *P. chabaudi*

Para melhor caracterizar o efeito do tratamento com mAb S4B6 na ativação policlonal de células CD4⁺ induzida pelo *P. chabaudi*, analisamos a expressão de CD44, CD69 e o tamanho celular nos grupos de camundongos estudados. Nossos resultados mostram um aumento significativo no número de células esplênicas e na frequência de células CD4⁺CD122⁺CD25⁺ e CD4⁺CD122⁺CD25⁻, em camundongos não infectados (Dia 0) e tratados com mAb S4B6. Estas células apresentam um fenótipo de células em repouso, com tamanho celular pequeno e baixa expressão de CD44 e CD69. No sétimo dia de infecção, os camundongos tratados com mAb S4B6 apresentaram um aumento significativo nas frequências de células CD4⁺ grandes e com alta expressão de CD44 e CD69, quando comparadas com camundongos não tratados e no mesmo dia de infecção (Figura 9).

Figura 9- Efeito do tratamento com mAb S4B6 na resposta das células CD4⁺ esplênicas de camundongos infectados pelo *P. chabaudi*. Camundongos C57BL/6 foram tratados ou não com 1 mg de mAb S4B6 nos dias 0, 2 e 4 p.i. com 10⁶ EP pelo *P. chabaudi*. Camundongos não infectados foram usados como controle (Dia 0). Tamanho celular (FSC) e expressão de CD122, CD44 e CD69 nas células CD4⁺ do baço de camundongos tratados com mAb S4B6 () ou não tratados () no dia 7 de infecção com 10⁶ EP pelo *P. chabaudi* e controles não infectados (Dia 0). Os valores nos histogramas representam a média ± DP de um experimento. Dados representativos de 4 experimentos com resultados similares. n=6. *p>0.05 entre os camundongos não tratados e tratados com mAb S4B6 no mesmo dia de infecção

.4.10 Efeito do tratamento com mAb S4B6 na resposta humoral durante a infecção pelo *P. chabaudi*

Com relação à resposta humoral, determinamos o número de células produtoras de anticorpos IgM e IgG2a nos camundongos tratados ou não com mAb S4B6 através da técnica de ELISASPOT, sendo que os níveis de anticorpos também estão representados pela densidade óptica dos *spots* diluídos em DMSO. Não observamos diferenças no número de células produtoras de anticorpos por baço (Figura 10A) ou nos níveis de anticorpos IgM e IgG2a (Figura 10B), entre os grupos de camundongos não infectados (Dia 0), não tratados e tratados com mAb S4B6.. No entanto, com relação ao dia 7 de infecção, observamos um aumento nos níveis e no número de células produtoras de anticorpos IgG2a nos camundongos tratados com mAb S4B6, quando comparados aos camundongos não tratados e no mesmo dia de infecção (Figura 10A). Por outro lado, no dia 7 de infecção não observamos diferenças estatísticas nos números de células produtoras de anticorpos e níveis de anticorpos IgM entre os camundongos não tratados e tratados com mAb S4B6 (Figura 10B).

Figura 10- Efeito do tratamento com mAb S4B6 na resposta humoral durante a infecção pelo *P. chabaudi*. Camundongos C57BL/6 foram tratados ou não com 1 mg de mAb S4B6 nos dias 0, 2 e 4 p.i. com 10^6 EP pelo *P. chabaudi*. Camundongos não infectados foram usados como controle (Dia 0). A, números de células produtoras de anticorpos IgM e IgG2a total no baço de camundongos não tratados e tratados com mAb S4B6, nos dias 0 e 7 de infecção pelo *P. chabaudi*. B, densidade óptica relativa ao número de células produtoras de anticorpos IgM e IgG2a totais diluídos em DMSO nos camundongos não tratados no dia 0 (círculo branco) e dia 7 (círculo preto) p.i. pelo *P. chabaudi* e camundongos tratados com mAb S4B6 dia 0 (quadrado branco) e dia 7 (quadrado preto) p.i. pelo *P. chabaudi*. Os dados são representativos de 4 experimentos. $n=6$. * $p<0.05$ entre os camundongos não tratados e tratados com mAb S4B6 no mesmo dia de infecção.

4.11 Efeito do tratamento com mAb S4B6 nas células T_{reg} durante a infecção pelo *P. chabaudi*

Para avaliar se o tratamento com mAb S4B6 é capaz de interferir na biologia das células T_{reg} durante a ativação policlonal induzida pelo *P. chabaudi*, analisamos as células CD4⁺ dos camundongos tratados com mAb S4B6 quanto à expressão de Foxp3. Como mostra a figura 11A, nos camundongos não infectados (Dia 0) e tratados com mAb S4B6, a frequência de células CD4⁺Foxp3⁺ está diminuída quando comparada aos camundongos não tratados e não infectados (de 9,7% para 5,3%), sendo que essa diminuição é mais evidente na população de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (de 7,8% para 3,5%). Entre os animais tratados com mAb S4B6 no dia 7 p.i. não houve diferença na frequência de células CD4⁺Foxp3⁺, porém a frequência de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ apresentam quase a metade dos valores observados no grupo não tratado e infectado (de 8,6% para 5,5%) (Figura 11A). Entretanto, apesar da diminuição na frequência, não observamos diferenças no número total da população de células CD4⁺Foxp3⁺ e CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ entre os grupos de camundongos tratados ou não mAb S4B6 (Figura 11B).

Estes dados sugerem que durante a ativação policlonal induzida pelo *P. chabaudi* o tratamento com mAb S4B6, o qual potencializa ação da IL-2, também determina uma maior proliferação e ativação de células CD4⁺, no entanto, não são capazes de alterar o número de células T_{reg}.

Figura 11- Efeito do tratamento com mAb S4B6 nas células T_{reg} durante a infecção pelo *P. chabaudi*. Camundongos C57BL/6 foram tratados ou não com 1 mg de mAb S4B6 nos dias 0, 2 e 4 p.i. com 10^6 EP pelo *P. chabaudi*. Camundongos não infectados foram usados como controle (Dia 0). A, expressão de CD25 e Fcγp3 nas células $CD4^+$ de camundongos tratados ou não com mAb S4B6 7 dias p.i.. B, número de células $CD4^+$ Fcγp3⁺ e $CD4^+$ CD25⁺Fcγp3⁺ no baço dos camundongos não tratados e tratados com mAb S4B6 7 dias p.i.. Os dados são representativos de 4 experimentos. n=6. Em A, os valores nos quadrantes representam a média ± DP de um experimento. Em B, * p<0,05 entre os camundongos tratados com mAb S4B6 e não tratados no mesmo dia de infecção.

4.12 Efeito do tratamento com mAb JES6-1 durante a infecção primária pelo *P. chabaudi*

Segundo Boyman e colaboradores (125), o mAb JES6-1 é capaz de bloquear *in vivo* a ação da IL-2. Assim, com o objetivo de verificar o efeito da neutralização da IL-2 na ativação e na expansão das populações de células CD4⁺ e T_{reg} decorrentes da infecção pelo *P. chabaudi*, os camundongos foram tratados nos dias 0, 2 e 4 p.i. com 10⁶ EP com 1 mg mAb JES6-1.

Da mesma forma que o mAb S4B6, no tratamento com mAb JES6-1 a curva de parasitemia foi semelhante à observada no grupo de camundongos que não receberam o anticorpo. No entanto, no dia 7 p.i., os animais que foram tratados com mAb JES6-1 apresentam um aumento significativo na frequência de eritrócitos parasitados quando comparados aos camundongos que não foram tratados com o anticorpo. Ao contrário do que foi observado no tratamento com mAb S4B6, não observamos um aumento no peso do baço dos camundongos tratados com mAb JES6-1 (Figura 12). Além disso, o tratamento com mAb JES6-1 também não altera o número de células esplênicas e de células CD4⁺ quando comparados com os respectivos controles não tratados (Figura 12).

Figura 12- Efeito do tratamento com mAb JES6-1 durante a infecção primária pelo *P. chabaudi*. Camundongos C57BL/6 foram tratados ou não com 1 mg de mAb JES6-1 nos dias 0, 2 e 4 p.i. com 10^6 EP pelo *P. chabaudi*. Camundongos não infectados foram usados como controle (Dia 0). A, parasitemia, peso do baço, celularidade e número de células $CD4^+$ dos camundongos não tratados e tratados com mAb JES6-1 e analisadas nos dias 0 e 7 p.i.. Dados representativos de 4 experimentos com resultados similares. n=6. *, $p < 0.05$ entre os camundongos não tratados e tratados com mAb JES6-1 no mesmo dia de infecção.

4.13 Efeito do tratamento com mAb JES6-1 na resposta das células $CD4^+$ esplênicas de camundongos infectados pelo *P. chabaudi*

A fim de observarmos o efeito do tratamento com mAb JES6-1 nas células $CD4^+$, avaliamos o tamanho celular e a expressão de marcadores característicos de ativação celular no dia 7 p.i. pelo *P. chabaudi*. Novamente, ao contrário do observado no tratamento com mAb S4B6, não observamos diferenças na expressão de CD44 e CD69 nas células $CD4^+$ dos camundongos tratados com mAb JES6-1 e infectados, quando comparados aos grupos de camundongos que não foram tratados (Figura 13A).

A análise das células $CD4^+$ através da marcação com CD45RB e CD62L, nos possibilita avaliar o estado de ativação dessas células. Deste modo, células $CD4^+$ com alta expressão de CD62L e CD45RB correspondem às células *naive*, enquanto aquelas com alta expressão de CD45RB e baixa expressão de CD62L correspondem às células efetoras (126-128). Com relação às células de memória, foram descritos dois grupos distintos: o grupo de células de memória central (TCM) e o grupo de células de memória efetoras (TEM). As primeiras apresentam baixa expressão CD45RB e alta expressão de CD62L, enquanto as TEM apresentam uma baixa expressão de CD45RB e CD62L (129). Como podemos observar na figura 13B o tratamento com mAb JES6-1 não foi capaz de alterar a ativação das células $CD4^+$ que permanecem praticamente com a mesma frequência de células *naive* ($CD62L^{HIGH}CD45RB^{HIGH}$), de memória central ($CD62L^{HIGH}CD45RB^{LOW}$), de memória efetora ($CD62L^{LOW}CD45RB^{LOW}$) e células efetoras ($CD62L^{LOW}CD45RB^{HIGH}$) que os camundongos não tratados com o anticorpo e não infectados (Dia 0). Observamos também, que 7 dias p.i. ocorre um aumento da frequência de células $CD4^+$ de memória efetora e memória central que não foi alterada pelo tratamento com mAb JES6-1, no entanto a frequência de células $CD4^+$ com fenótipo de células efetoras ($CD62L^{LOW}CD45RB^{HIGH}$), estava aumentada nos camundongos tratados com mAb JES6-1 (Figura 13B).

Figura 13- Efeito do tratamento com mAb JES6-1 na resposta das células CD4⁺ esplênicas de camundongos infectados pelo *P. chabaudi*. Camundongos C57BL/6 foram tratados ou não com 1 mg de mAb JES6-1 nos dias 0, 2 e 4 p.i. com 10⁶ EP pelo *P. chabaudi*. Camundongos não infectados foram usados como controle (Dia 0). A, tamanho celular (FSC) e expressão de CD44 e CD69 nas células CD4⁺ esplênicas de camundongos não tratados ou tratados com mAb JES6-1 analisadas no dia 7 p.i.. B, expressão de CD45RB e CD62L nas células CD4⁺ do baço de camundongos tratados ou não com mAb JES6-1 tratados no dia 7 p.i.. Os valores nos histogramas representam a média ± DP de um experimento. Dados representativos de 4 experimentos com resultados similares. n=6. *, p<0.05 entre os camundongos não tratados e tratados com mAb JES6-1 no mesmo dia de infecção.

4.14 Efeito do tratamento com mAb JES6-1 nas células T_{reg} durante a infecção pelo *P. chabaudi*

A importância da IL-2 para a biologia das células T_{reg} foi demonstrada em vários modelos murinos de deficiência de IL-2 ou do seu receptor. Para avaliarmos o efeito do mAb JES6-1 sobre as células T_{reg} durante a infecção pelo *P. chabaudi* tratamos os camundongos nos dias 0, 2 e 4 p.i. com um total de 3 mg de anticorpo. Em nossos resultados, observamos que os camundongos tratados com mAb JES6-1, tanto os não infectados (Dia 0) como no dia 7 de infecção, apresentam metade da frequência de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (de 11,3% para 3,8% nos camundongos não infectados e de 7,6% para 4,3% no dia 7 de infecção - Figura 14A). Além disso, o número de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, no dia 0 e no dia 7 p.i., também está diminuído nos camundongos que foram tratados com mAb JES6-1, quando comparado aos respectivos grupos não tratados (Figura 14B).

Com relação à população de células CD4⁺Foxp3⁺, observamos que o tratamento com mAb JES6-1 leva a uma diminuição na frequência da população destas células tanto nos camundongos não infectados (de 14,3% para 7,1%) como no dia 7 dias p.i. (de 8,2% para 6,4%). No entanto, essa diminuição não se reflete no número de células onde não observamos diferenças estatísticas no grupo de camundongos não infectados (de 18,9±1.1 x10⁵ para 12,0±1,4 x 10⁵) e nem no dia 7 p.i. (de 46,9±11,5 x 10⁵ para 57,4±17,0 x 10⁵) (Figura 14B).

Figura 14- Efeito do tratamento com mAb JES6-1 nas células T_{reg} durante a infecção pelo *P. chabaudi*. Camundongos C57BL/6 foram tratados ou não com 1 mg de mAb JES6-1 nos dias 0, 2 e 4 p.i. com 10⁶ EP pelo *P. chabaudi*. Camundongos não infectados foram usados como controle (Dia 0). A, expressão de CD25 e Foxp3 nas células CD4⁺ de camundongos tratados ou não com mAb JES6-1 no dia 7 p.i.. B, número de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e CD4⁺Foxp3⁺ nos camundongos não tratados e tratados com mAb JES6-1 no dia 7 de infecção. Em A os valores nos quadrantes representam a média ± DP de um experimento. Os dados são representativos de 2 experimentos. n=6. *, p<0,05 entre os camundongos não tratados e tratados com mAb JES6-1 no mesmo dia de infecção.

4.15 Efeito do tratamento com mAb JES6-1 *in vitro* na resposta precoce das células CD4⁺ à infecção pelo *P. chabaudi*

Para determinar em que extensão a IL-2 é necessária para a resposta precoce das células CD4⁺ durante a infecção pelo *P. chabaudi*, o efeito do tratamento com mAb JES6-1 na resposta proliferativa *in vitro* de células CD4⁺ em resposta aos EP foi avaliado no dia 4 dia de infecção. As células CD4⁺ de camundongos infectados há 200 dias foram utilizadas como controle desde, uma vez que resultados obtidos em nosso laboratório mostraram que a IL-2 é necessária para a resposta proliferativa destas células a EP (dados não mostrados). Os resultados corroboraram com os nossos achados *in vivo* mostrando que, diferente das células CD4⁺ tardias (200 dias p.i.), a resposta *in vitro* das células CD4⁺ precoces (4 dias p.i.) a EP não foi neutralizada pela adição de mAb JES6-1 (Figura 15). A partir destes resultados, é possível concluir que a IL-2 não é essencial para a resposta precoce das células CD4⁺ ao *P. chabaudi*.

Figura 15- Efeito do tratamento com mAb JES6-1 in vitro na resposta precoce das células $CD4^+$ à infecção pelo *P. chabaudi*. As células esplênicas dos camundongos C57BL/6 não infectados (Dia 0), dia 4 e dia 200 p.i. com 10^6 EP pelo *P. chabaudi* foram marcadas com CFSE e mantidas em cultura por 72 horas na presença de meio RPMI ou eritrócitos parasitados. Em algumas culturas celulares, a IL-2 foi neutralizada com mAb JES6-1 (225 μ g/ml). Os números dentro dos histogramas referem-se às médias $\pm$ DP das porcentagens de células em divisão (CFSE^{LOW}) em cada janela. Os dados mostrados nessa figura eram representativos de 3 experimentos em separado (n=4). *, $p < 0.05$ entre as células esplênicas que receberam ou não o mAb JES6-1 na cultura.

4.16 Capacidade da IL-2, IL-7 e IL-15 sustentarem a resposta precoce das células CD4⁺ ao *P. chabaudi*

Os resultados anteriores sugerem que outras citocinas, diferentes da IL-2, podem estar participando na resposta proliferativa das células CD4⁺ durante a fase inicial da infecção pelo *P. chabaudi*. Para testar essa possibilidade, o experimento seguinte foi realizado a fim de avaliar os efeitos das citocinas IL-2, IL-7 e IL-15 recombinantes (r) na resposta proliferativa das células CD4⁺ de camundongos no dia 4 de infecção. Enquanto a capacidade de proliferação precoce das células CD4⁺ em resposta a EP encontrava-se 2 vezes aumentada na presença de rIL-2, a adição de rIL-7 e rIL-15 às culturas celulares resultou em um aumento de 3-4 vezes em relação aos controles que não receberam a citocina recombinante (Figura 16). Surpreendentemente, a adição de mAb JES6-1 às culturas celulares também induziu um resposta proliferativa maior a EP, que foi pouco afetada pela presença de rIL-2, rIL-7 ou rIL-15. Estes dados sugerem que a IL-7 e a IL-15 são ainda mais potentes que a IL-2 em sustentar a proliferação das células CD4⁺ estimulada precocemente por EP.

Figura 16- Capacidade da IL-2, IL-7 e IL-15 sustentarem a resposta precoce das células $CD4^+$ ao *P. chabaudi*. As células esplênicas dos camundongos C57BL/6 não infectados (Dia 0) e dia 4 p.i. com 10^6 EP pelo *P. chabaudi* foram marcadas com CFSE e mantidas em cultura por 72 horas na presença de meio RPMI ou eritrócitos parasitados. Em algumas culturas celulares, a IL-2 foi neutralizada com mAb JES6-1 (225 μ g/ml) e suplementadas com rIL-2 (0,5 U/ml), rIL-7 (0,5 U/ml) e rIL-15 (0,5 U/ml). As células de camundongos não infectados foram usadas como controle negativo (dia 0). Cada barra corresponde à média $\pm$ DP dos valores das porcentagens de células em divisão (CFSE^{LOW}). Os resultados mostrados nessa figura eram representativos de 2 experimentos em separado. n=3. *, p<0,05 entre as células esplênicas que receberam e as que não receberam as citocinas recombinantes. #, p< 0,05 entre as células esplênicas que receberam e as que não receberam o mAb JES6-1.

4.17 Sintomas clínicos, alterações do peso e parasitemia dos camundongos tratados com mAb JES6-1 durante a infecção pelo *P. chabaudi*

Os camundongos infectados com *P. chabaudi* apresentam perda de peso, hipotermia e a diminuição dos parâmetros hematológicos (130, 131). A fim de determinar se o tratamento com mAb JES6-1 é capaz de alterar os sintomas clínicos como modificações nos níveis de hemoglobina, o hematócrito, a temperatura corporal e perda de peso durante a infecção pelo *P. chabaudi*, os camundongos foram avaliados nos dias 4, 7, 11 e 17 p.i..

A figura 17 mostra uma diminuição nos sinais os sinais clínicos da doença por volta do dia 7 de infecção, sendo que no dia 17 p.i. os valores retornam próximos aos observados nos animais não infectados. O tratamento com mAb JES6-1 não altera a redução dos níveis de hemoglobina, a perda de peso e nem a queda da temperatura. No entanto, no dia 7 p.i., os camundongos tratados com mAb JES6-1 apresentam uma diminuição na frequência de eritrócitos, medida pelo hematócrito. No dia 7 de infecção, não foi possível medir a temperatura nos grupos de camundongos infectados devido ao limite mínimo do termômetro (32°C), sugerindo que os camundongos de ambos os grupos infectados apresentavam temperaturas inferiores a 32°C, o mesmo ocorreu nos camundongos não tratados com mAb JES6-1 no dia 11 de infecção.

É interessante notar que os resultados mais críticos do hematócrito, hemoglobina, temperatura e peso são observados no dia 11 de infecção quando a frequência de eritrócitos parasitados está muito baixa, em torno de 10%, tanto para os camundongos tratados com mAb JES6-1, como para os não tratados com o anticorpo (Figura 17).

Figura 17- Determinação dos sintomas clínicos, alterações do peso e parasitemia nos camundongos tratados com mAb JES6-1 durante a infecção pelo *P. chabaudi*. Os camundongos C57BL/6 foram tratados ou não com 1 mg de mAb JES6-1 nos dias 0, 2 e 4 p.i. com 10^6 EP pelo *P. chabaudi* e acompanhados nos dias 4, 7, 11 e 17 p.i. pelo *P. chabaudi* para determinação do hematócrito, hemoglobina, peso e temperatura. Camundongos não infectados foram usados como controle (Dia 0). Os dados são representativos de 1 experimento. n=6. *, $p < 0,05$ entre os camundongos não tratados e tratados com mAb JES6-1 no mesmo dia de infecção.

4.18 Análise fenotípica das células CD4⁺ do baço de camundongos tratados com mAb JES6-1 20 dias p.i. pelo *P. chabaudi*

A fim de avaliar o efeito do tratamento com o mAb JES6-1 em tempos mais tardios da infecção, analisamos as células CD4⁺ do baço de camundongos tratados com esse anticorpo quanto ao tamanho celular, à expressão de marcadores de ativação e memória (CD44, CD69, CD45RB e CD62L), além de morte celular pela incorporação de anexina V⁺.

Como mostra a figura 18A, camundongos tratados com mAb JES6-1 e infectados pelo *P. chabaudi* não apresentam diferenças quanto ao número de células esplênicas (de $15,6 \pm 1.3 \times 10^7$ nos camundongos não infectados para $21,3 \pm 3.2 \times 10^7$ no dia 20 p.i.) quando comparado aos grupos de camundongos não tratados (de $12,7 \pm 0,5 \times 10^7$ nos camundongos não infectados para $29,7 \pm 0,3 \times 10^7$ no dia 20 de infecção). O tratamento com mAb JES6-1 também não alterou o número de células CD4⁺ no baço dos camundongos estudados. Apesar de não observarmos diferenças no número de células o tratamento com mAb JES6-1 induziu a uma maior ativação das células CD4⁺, que apesar de permanecerem com o mesmo tamanho celular, apresentam uma frequência aproximadamente duas vezes maior dos marcadores CD44 e CD69 em relação aos camundongos não tratados com mAb JES6-1 no mesmo dia de infecção (Figura 18 B).

Figura 18- Análise fenotípica das células CD4⁺ do baço de camundongos tratados com mAb JES6-1 20 dias p.i. pelo *P. chabaudi*. Camundongos C57BL/6 foram tratados ou não com 1 mg de mAb JES6-1 nos dias 0, 2 e 4 p.i. com 10⁶ EP pelo *P. chabaudi*. Camundongos não infectados foram usados como controle (Dia 0). A, números de células esplênicas e células CD4⁺ dos camundongos não tratados e tratados com mAb JES6-1 analisadas 20 dias p.i.. B, tamanho celular (FSC) e expressão de CD44 e CD69 nas células CD4⁺ esplênicas de camundongos não tratados ou tratados com mAb JES6-1 20 p.i.. Os valores nos histogramas representam a média ± DP de um experimento. Dados representativos de 2 experimentos com resultados similares. n=6. *, p<0.05 entre os camundongos tratados ou não com mAb JES6-1 no mesmo dia de infecção.

A seguir, para avaliar o estado de ativação e diferenciação das células $CD4^+$ de camundongos tratados e não tratados com o mAb JES6-1 no dia 20 p.i., analisamos novamente a expressão dos marcadores CD45RB e CD62L. Os resultados apresentados na figura 19A mostram que, o tratamento com mAb JES6-1 leva a uma diminuição da população de células *naive* ($CD4^+CD45RB^{HIGH}CD62L^{HIGH}$) e efetoras ($CD4^+CD45RB^{HIGH}CD62L^{LOW}$) (respectivamente de $26,1 \pm 3,8$ e $29,8 \pm 9,3$ nos camundongos não tratados para $19,2 \pm 3,8$ e $20,0 \pm 0,9$ nos camundongos tratados). A população de células *naive* permanece diminuída nos camundongos tratados com mAb JES6-1 20 dias p.i. com *P. chabaudi* (de $19,4 \pm 6,3$ nos camundongos não tratados para $13,0 \pm 2,5$ nos camundongos tratados). Além disso, nos camundongos tratados (não infectados e 20 dias p.i.), as células $CD4^+$ apresentam um aumento na frequência de células de memória efetora ($CD4^+CD45RB^{LOW}CD62L^{LOW}$) ($52,1 \pm 6,2$ nos não infectados e $66,7 \pm 3,3$ 20 dias p.i.), quando comparadas às dos camundongos nos mesmos dias de infecção, mas que não foram tratados ($34,0 \pm 8,5$ e $57,8 \pm 4,6$ respectivamente – Figura 18A).

Após estabelecer que o tratamento não altera o número de células $CD4^+$ e sabendo-se que a IL-2 está envolvida na morte celular induzida por ativação via Fas/FasL (41, 42, 44-46), avaliamos se o tratamento com mAb JES6-1 interfere na apoptose, uma vez que com a evolução da doença as células T e B ativadas policlonalmente são, em grande parte, eliminadas por apoptose. Desta forma, analisamos a incorporação de anexina V pelas células $CD4^+$ dos camundongos não tratados e tratados com mAb JES6-1. No dia 20 de infecção, observamos um aumento da frequência de células $CD4^+$ que expressam anexina V, tanto nos camundongos não tratados, como nos que receberam o anticorpo. No entanto, os camundongos tratados com mAb JES6-1, tanto não infectados, como 20 dias p.i., apresentam uma diminuição significativa na frequência de células $CD4^+$ anexina V⁺ (10,6% e 21,5%, respectivamente), em relação aos camundongos não infectados ou no mesmo dia de infecção, mas que não receberam o tratamento com o anticorpo (14,9% e 27,7%, respectivamente) (Figura 19B).

Figura 19- Estado de ativação e diferenciação das células CD4⁺ de camundongos tratados e não tratados com mAb JES6-1 no dia 20 p.i. com *P. chabaudi*. Camundongos C57BL/6 foram tratados ou não com 1 mg de mAb JES6-1 nos dias 0, 2 e 4 p.i. com 10⁶ EP pelo *P. chabaudi*. Camundongos não infectados foram usados como controle (Dia 0). A, expressão de CD45RB e CD62L nas células CD4⁺ dos camundongos tratados ou não com mAb JES6-1 20 dias p.i.. B, frequência de células anexina V⁺ nas células CD4⁺ do baço dos camundongos tratados ou não com mAb JES6-1. Os valores nos quadrantes representam a média ± DP de um experimento. Os dados são representativos de 2 experimentos. n=6. *p<0,05 entre os camundongos tratados e não tratados com o mAb JES6-1 no mesmo dia de infecção. Em B, # p<0,05 entre camundongos controle (Dia 0) e infectados.

4.20 Influência do tratamento com mAb JES6-1 nas células $CD4^+Foxp3^+$ 20 dias após a infecção pelo *P. chabaudi*

Para determinar o efeito do tratamento com mAb JES6-1 nas células T_{reg} em tempos mais tardios da infecção, avaliamos o número de células $CD4^+Foxp3^+$ e $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 20 dias após a infecção com 10^6 EP pelo *P. chabaudi*. Os resultados apresentados na figura 20 mostram que, vinte dias p.i. o número de células $CD4^+Foxp3^+$ e $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, nos camundongos não tratados ($5,0 \pm 1,0$ e $2,7 \pm 1,0 \times 10^6$ respectivamente), como nos tratados com mAb JES6-1 ($7,3 \pm 2,7$ e $3,9 \pm 1,6 \times 10^6$) apresentam valores semelhantes aos observados nos camundongos não infectados (Dia 0) e não tratados. É interessante notar, no entanto, que 20 dias após o tratamento com o mAb JES6-1, o número de células $CD4^+Foxp3^+$ e $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ nos camundongos não infectados permanece diminuído ($3,9 \pm 0,8$ e $1,7 \pm 0,3 \times 10^6$), quando comparado aos camundongos não tratados ($5,2 \pm 0,2$ e $3,3 \pm 0,1 \times 10^6$) (Figura 20).

Figura 20- Influência do tratamento com mAb JES6-1 nas células $CD4^+Foxp3^+$ 20 dias após a infecção pelo *P. chabaudi*. Camundongos C57BL/6 foram tratados ou não com 1 mg de mAb JES6-1 nos dias 0, 2 e 4 p.i. com 10^6 EP pelo *P. chabaudi*. Camundongos não infectados foram usados como controle (Dia 0). A, número de células $CD4^+Foxp3^+$ e $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ esplênicas dos camundongos tratados ou não com mAb JES6-1 20 dias p.i.. Os dados são representativos de 2 experimentos. $n=6$. * $p < 0,05$ entre os camundongos tratados e não tratados com mAb JES6-1 no mesmo dia de infecção.

4.21 O efeito do tratamento com mAb JES6-1 na geração de uma resposta secundária ao *P. chabaudi* *in vitro*

Para determinar se o tratamento com mAb JES6-1 interfere na geração de uma resposta secundária, analisamos a resposta proliferativa *in vitro* dos esplenócitos obtidos dos camundongos tratados com mAb JES6-1 e controles não tratados 20 dias após a infecção com *P. chabaudi*. Neste ensaio as células foram incubadas com EP, anti-CD3 solúvel ou na ausência de estímulos. Após 96 horas de cultura, observamos a mesma intensidade de resposta proliferativa nas células CD4⁺ de camundongos tratados com mAb JES6-1 estimuladas com anti-CD3, além de um aumento espontâneo da proliferação em relação aos valores obtidos sem o tratamento no mesmo dia de infecção (Figura 21A). A resposta exacerbada das células CD4⁺ também é observada após o estímulo com EP, quando 30,5% destas células provenientes dos camundongos tratados 20 dias após a infecção estão proliferando (Figura 21A). Para os camundongos infectados, se descontarmos a proliferação espontânea observada nas células CD4⁺ não estimuladas (de 3,8% para os camundongos não tratados e 14,4% para os camundongos tratados) dos valores observados nas mesmas células estimuladas com EP (de 20,0% para os camundongos não tratados e 30,5% para os camundongos tratados), concluímos que não há um aumento da resposta proliferativa antígeno específica nas células CD4⁺ dos camundongos tratados, os quais apresentam uma média de fluorescência em torno de 16%.

Este aumento da proliferação espontânea observada nos camundongos tratados com mAb JES6-1 poderia ser devido a retirada dos anticorpos anti-IL-2, como consequência da manipulação *in vitro*, deixando livre a citocina. Para testar essa possibilidade adicionamos 225 µg/ml de mAb JES6-1 às culturas. A adição do anticorpo deixou evidente diferenças importantes entre as células CD4⁺ dos camundongos tratados e não tratados no dia 20 dias p.i.. A análise das células CD4⁺ de camundongos não tratados mostra que a presença do mAb JES6-1 na cultura impede a proliferação antígeno-específica, confirmando que a IL-2 é importante para a proliferação específica *in vitro* (Figura 21B). As células CD4⁺ dos camundongos tratados com mAb JES6-1 e não infectados permanecem com um valor basal alto de proliferação espontânea (em torno de 8%), mesmo após a adição do anticorpo anti-IL-2 à cultura (Figura 19B). Já na presença de EP, as células CD4⁺ dos camundongos

tratados e não infectados apresentam um aumento na frequência de células em proliferação (19,3%), que é exacerbado nos camundongos tratados que se encontram no dia 20 p.i. (42,0%). Estes resultados mostram que o tratamento com mAb JES6-1 *in vivo* e *in vitro* faz com que uma frequência elevada de células CD4⁺ prolifere em resposta a EP, mesmo que estas células não tenham entrado em um contato prévio com antígeno.

Figura 21- O efeito do tratamento com mAb JES6-1 na geração de uma resposta secundária ao *P. chabaudi* *in vitro*. As células esplênicas dos camundongos C57BL/6 tratados ou não com 1 mg de mAb JES6-1 nos dias 0, 2 e 4 p.i. com 10⁶ EP pelo *P.chabaudi* foram marcadas com CFSE 20 dias p.i. e mantidas em cultura por 96 horas na presença de meio RPMI, mAb anti-CD3 ou estimuladas com EP para análise da resposta proliferativa. Em algumas culturas celulares, a IL-2 foi neutralizada com mAb JES6-1 (225 µg/ml). Os valores histogramas representam a média ± DP das porcentagens de células CD4⁺ em divisão (CFSE^{LOW}). Os dados são representativos de 2 experimentos. n=6. *, p<0,05 entre as células esplênicas dos camundongos não tratados ou tratados com mAb JES6-1 *in vivo*. #, p< 0,05 entre as células esplênicas que receberam e as que não receberam o mAb JES6-1 *in vitro*.

5 DISCUSSÃO

A ativação policlonal observada na infecção pelo *P. chabaudi* envolve várias interações moleculares e celulares que influenciam o desempenho geral do sistema imune, levando a uma imunossupressão caracterizada pela incapacidade de gerar respostas clonais ou assegurando a geração de células B parasita-específicas responsáveis, em grande parte, pela resistência à infecção e pela eliminação do parasita. Uma vez que a IL-2 está envolvida tanto na proliferação e apoptose de células T efetoras (102, 103), como na regulação destas células pelas células T_{reg} (104, 106, 108), o objetivo do nosso trabalho foi avaliar qual o papel desta citocina na ativação policlonal induzida pelo *P. chabaudi*. Os nossos resultados mostram que a IL-2 é produzida na fase aguda da doença por células CD4⁺ ativadas, mas não por células T_{reg}. Ainda que as células CD4⁺ estimuladas pelo parasita possuam IL-2R e respondam à IL-2, essa citocina não parece ser essencial para a sua ativação, podendo ser substituída por outras citocinas, tais como a IL-7 e a IL-15, que atuam de forma redundante. Os nossos dados indicam também que as células T_{reg} estão envolvidas no controle da ativação policlonal das células T e B, regulando a produção de IFN- γ , anticorpos IgG parasita-específicos e auto-anticorpos. Além disso, observamos que a expansão da população de células T_{reg} no início da infecção é dependente de IL-2, sendo que a neutralização dessa citocina determina uma exacerbação da resposta das células CD4⁺ a eritrócitos parasitados.

A análise do baço na fase precoce de infecção pelo *P. chabaudi* revelou uma intensa produção de IL-2 pelas células CD4⁺CD25⁺CD122⁺GITR⁺mTGF- β ⁺CTLA-4⁺CD45RB^{HIGH}, as quais apresentam um tamanho celular aumentado e não expressam Foxp3. Por outro lado, a população de células CD4⁺CD25⁺CD122^{LOW}GITR^{HIGH}mTGF- β ⁺CTLA-4^{HIGH}CD45RB^{LOW} apresentam tamanho celular pequeno, além de não secretarem IL-2, mas aumentam em número absoluto na primeira semana da infecção, quando analisadas de acordo com a expressão de Foxp3. Estes dados indicam que as células CD4⁺ que produzem IL-2 estão ativadas ou são efetoras e expressam grandes quantidades do IL-2R. Além disso, estes resultados sugerem que, na infecção pelo *P. chabaudi*, as células com fenótipo de reguladoras não produzem IL-2. De fato, modelos *in vivo* e *in vitro* mostram que as células T_{reg} não secretam IL-2 (109, 132) e dependem da IL-2 parácrina para manter sua homeostase e função. Neste sentido, trabalhos mostram que a fonte de IL-2 pode ser as células dendríticas que além de secretarem essa citocina (133) são importantes para a ativação de células T_{reg}, ou, ainda mais

provável, as células $CD4^+$ convencionais que uma vez ativadas produzem grandes quantidades de IL-2 (134), uma resposta que também ocorre na fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi* como mostra os nossos experimentos.

Os resultados obtidos nos camundongos SCID $CD25^-$ mostram ainda que a ausência de células T_{reg} determina um aumento da resposta das células $CD4^+$ à infecção pelo *P. chabaudi*, assim como da produção de anticorpos IgG parasita-específicos e auto-anticorpos anti-LDL e anti-OXLDL. A participação das células T_{reg} na regulação da ativação das células T e B esplênicas, em decorrência da infecção, também foi sugerida pela observação de que a sua ausência resulta em maior expressão de CD44 e CD69 nas células $CD4^+$. Estudos prévios, em alguns modelos de doenças infecciosas, mostraram que as células T_{reg} podem suprimir as células T antígeno-específicas, reduzindo a patologia imune à custa do fracasso na eliminação dos patógenos (32, 135-137). Assim, o fato de que a ausência de células T_{reg} acarreta um aumento da produção de auto-anticorpos e de anticorpos parasita-específicos indica que, se por um lado o controle dos mecanismos efetores parece ser essencial para evitar a ativação de clones auto-reativos, por outro lado, essa regulação parece prejudicar a produção de anticorpos específicos ao parasita. Esse resultado era esperado, pois como foi descrito anteriormente a eliminação de células T_{reg} protege o camundongo da morte causada pela cepa letal de *P. yoelli*, permitindo o restabelecimento de uma resposta imune efetora (117), além de favorecer a imunidade protetora contra o *P. berghei* (138).

Como citado anteriormente, alguns trabalhos mostram que o tratamento com mAb S4B6 forma um complexo citocina-anticorpo que deixa a citocina mais estável ou aumenta sua atividade biológica por reconhecer o epítipo da citocina que se liga à cadeia α do receptor de IL-2, cuja principal função é estabilizar a ligação da citocina com as outras duas cadeias do receptor de IL-2 (β e γ) (139). Por outro lado, mAb JES6-1 reconhece o epítipo da citocina que se liga à cadeia β do receptor de IL-2 e apesar de formar um complexo citocina-anticorpo não permite que a IL-2 exerça sua função (125). Durante o tratamento com mAb S4B6 o aumento da ativação de células $CD4^+$ e B decorrente da potencialização de IL-2 não parece requerer que as células T_{reg} sejam eliminadas, uma vez que o número absoluto de células com fenótipo de células T_{reg} , $CD4^+CD25^+$ Foxp3⁺ permanecem semelhantes aos encontrados em camundongos não tratados. Além disso, o aumento da ativação de células $CD4^+$ e do número de células produtoras de anticorpos IgG2a mostra que em

altas doses o mAb S4B6 é capaz de induzir um aumento da ativação do sistema imune. Nesse sentido, Kamimura e colaboradores (140) mostraram que o tratamento com mAb S4B6 e um plasmídeo de cDNA de IL-2 protege o camundongo da metástase de câncer de pulmão por induzir uma maior proliferação de células CD8⁺ específicas para o antígeno. Por outro lado, Sakaguchi e colaboradores (141) mostraram que camundongos tratados com mAb S4B6 apresentam linfoproliferação, mas, no entanto, esse fato foi interpretado na época como a consequência da capacidade da IL-2 induzir a proliferação fisiológica e a sobrevivência de células T_{reg}. Esse aumento na ativação policlonal provavelmente não está envolvido com o aumento da imunidade anti-*Plasmodium* uma vez que os camundongos tratados com mAb S4B6 apresentam uma cinética semelhante de parasitemia que os camundongos não tratados, apesar de apresentarem um pico maior de parasitemia. No entanto, experimentos que dosam anticorpos anti-*Plasmodium* e auto-anticorpos, precisam ser realizados para melhor caracterizar essa hipótese.

Como citado anteriormente a IL-2, apesar de ter sido descrita inicialmente como um potente fator de crescimento e diferenciação de células T *in vitro* (101), atualmente acredita-se que ela desempenhe um papel crucial na biologia das células T_{reg}. Neste sentido, alguns trabalhos indicam que a IL-2 está diretamente envolvida com a função das células T_{reg}, uma vez que na ausência de IL-2 não se observa supressão da proliferação de células respondedoras (134, 142). No entanto, estes trabalhos se baseiam apenas na expressão de CD25, que além de estar expresso em células T_{reg} faz parte do receptor de IL-2 e, portanto, também está presente também em células ativadas tornando difícil a discriminação entre as duas populações celulares. Por outro lado, alguns autores associam a participação da IL-2 na geração de células T_{reg} por meio de experimentos onde mostram que camundongos deficientes em IL-2 ou em uma das cadeias do receptor de IL-2 apresentam uma redução do número dessas células (46, 110, 143) e desenvolvem doenças autoimunes que no caso dos camundongos deficientes em IL-2 pode ser revertido através do tratamento com rIL-2 (144). A IL-2 também pode representar um sinal de sobrevivência para as células T_{reg} e nesse caso, sua ação depende das interações TCR-MHC classe II e CD28-CD80/CD86 (145, 146). Embora o papel da IL-2 na biologia das células T_{reg} ainda seja controverso, observamos que a IL-2 secretada pelas células CD4⁺ ativadas durante a infecção pelo *P. chabaudi* apresenta um importante papel para a homeostase e/ou função dessa população celular. De fato, os nossos resultados

mostram que, no início da infecção, a IL-2 exerce alguma ação nas células T_{reg} . No entanto, o mecanismo exato não foi estabelecido. Porém é pouco provavelmente que a IL-2 exerça algum papel na função de células T_{reg} , pois mesmo em número diminuído as células T_{reg} dos camundongos tratados com mAb JES6-1 são capazes de limitar a ativação de células $CD4^+$ no início da infecção.

Assim, como em algumas infecções virais (19), na infecção pelo *P. chabaudi* a IL-2 não parece ser essencial para a ativação do sistema imune, uma vez que as células $CD4^+$ dos camundongos tratados com mAb JES6-1, anticorpo capaz de neutralizar a IL-2, apresentam a mesma habilidade de se ativar e proliferar em resposta ao parasita, quando comparado aos camundongos não tratados. Por outro lado, durante a infecção pelo *P. berghei*, a produção de IL-2 é fortemente inibida nos camundongos resistentes à malária cerebral, que passam a ser susceptíveis a esta síndrome na ausência de células T_{reg} (112). Os nossos resultados mostram que a ausência de IL-2 na fase inicial da infecção leva a uma exacerbação da resposta de células $CD4^+$ e maior geração de células de memória, as quais podem ou não ser específica para ao *P. chabaudi*, em tempos tardios da infecção. Resultados semelhantes foram observados em camundongos SCID $CD25^-$ onde a ausência de células T_{reg} também induziu um aumento precoce na ativação celular. Como a IL-2 também esta envolvida com AICD (41, 102) a exacerbação da resposta de células $CD4^+$ poderia ser explicada pela diminuição na frequência de células apoptóticas (Anexina V), ao contrário do que foi observado nos camundongos que tiveram a IL-2 neutralizada. Além disso, 20 dias p.i., não observamos nenhuma diferença no número de células esplênicas entre os grupos de camundongos.

No início da infecção, apesar da redução pela metade, do número de células T_{reg} ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) nos camundongos tratados com mAb JES6-1, observamos um aumento no número dessa população celular quando comparado com os camundongos não infectados. Esses dados indicam que durante a infecção pelo *P. chabaudi* a IL-2 não interfere na geração de algum tipo de células T_{reg} que expressam a cadeia α do seu receptor. Essa população pode ser composta por novas células T_{reg} naturais ou células T_{reg} adaptativas. Nesse sentido, trabalhos mostram que células $Foxp3^+$ somente são geradas na presença de IL-2, uma vez que camundongos deficientes na citocina ou em uma das cadeias do seu receptor desenvolvem linfoproliferação e autoimunidade em função da diminuição de células T_{reg} durante a

infecção pelo *P. chabaudi* (38-40, 46, 47). No entanto, outros experimentos precisam ser realizados para melhor caracterizar as populações de células T_{reg}.

O fato de não observarmos diferenças no número de células CD4⁺Foxp3⁺, mas apenas na população CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, após o tratamento com mAb JES6-1 no início da infecção nos induz a pensar em duas possibilidades. Primeira, no dia 7 p.i., o aumento na frequência de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ nos camundongos tratados pode indicar uma expressão transitória de Foxp3 nas células ativadas. Nesse sentido, Gavin e colaboradores mostraram que, células CD4⁺ e CD8⁺ humanas apresentam um aumento da expressão de Foxp3 após a estimulação *in vitro* (147). A segunda, e mais provável, a ação da IL-2 ocorreria primeiro nas células que expressam a cadeia α do seu receptor. No entanto 20 dias após o tratamento, ambas as populações de células T_{reg} CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e CD4⁺Foxp3⁺ estão diminuídas mostrando que com o passar do tempo as populações de células T_{reg} dependem da IL-2. Nos camundongos infectados as populações de células T_{reg} voltaram ao normal provavelmente porque o aumento da secreção de IL-2 consumiu todo anticorpo injetado, apesar das altas doses usadas nos tratamentos. Por outro lado, outras citocinas poderiam contribuir para o desenvolvimento de células T_{reg} e nesse sentido, as candidatas mais prováveis seriam as citocinas dependentes da cadeia γ do receptor de IL-2, uma vez que não se observa a expressão de Foxp3 em camundongos deficientes dessas moléculas (51).

A ausência de IL-2 e conseqüentemente, a diminuição transitória de células T_{reg} não interfere na patologia da infecção pelo *P. chabaudi*, a não ser pelo aumento na parasitemia e diminuição do hematócrito no dia 7 de infecção. Quanto a este fato podemos apenas especular, uma vez que não temos dados suficientes que mostram, que a falta de IL-2 diminui a regulação aumentando a retirada de eritrócitos não parasitados (148).

Quando a infecção ocorre na ausência de IL-2 ocorre um drástico aumento na frequência de células CD4⁺ que proliferam de maneira espontânea ou em resposta a eritrócitos parasitados, em tempos tardios da infecção. A proliferação, no dia 4 p.i., parece não depender de IL-2 e esse fato poderia ser explicado pela existência de outras citocinas que também exercem essa função como a IL-7 e a IL-15. A IL-7 é um potente fator de crescimento de células T, atuando tanto na geração das células nos órgãos linfóides primários como na sua manutenção e expansão na periferia (149, 150). Esse fato se deve à capacidade da citocina induzir sinais anti-

apoptóticos (150, 151). Já o papel da IL-15 está melhor caracterizado em células $CD8^+$ de memória. Dessa forma camundongos deficientes em IL-15 apresentam uma diminuição de 50% na expansão clonal de células $CD8^+$ específicas para o vírus da estomatite vesicular (VSV) (152).

Em relação à proliferação em tempos tardios da infecção, a IL-2 parece ser essencial uma vez que no dia 20 p.i. pelo *P. chabaudi* as células $CD4^+$ dos camundongos não tratados apresentam uma significativa diminuição da resposta proliferativa à EP, quando adicionamos mAbJES6-1 nas culturas celulares. Porém para as células $CD4^+$ de camundongos tratados com o mAb JES6-1, a neutralização da IL-2 *in vitro* resultou em aumento da proliferação espontânea e estimulada por EP. Isso pode ser explicado de três formas diferentes. Primeira, pode ocorrer uma melhora na qualidade da resposta específica para o *P. chabaudi*, apesar de que essa hipótese seja pouco provável uma vez que as células $CD4^+$ dos camundongos tratados com mAb JES6-1 20 dias p.i. apresentam mais de 40% de células em divisão em resposta ao EP. Segunda, ocorre uma nova diminuição no número ou na atividade de células T_{reg} o que poderia levar a uma nova ativação policlonal inespecífica. Nesse sentido, Zhang e colaboradores, baseados na observação de que as células $CD8^+$ de memória respondem pouco a IL-2 (153), propuseram que a IL-15 age diretamente nas células de memória enquanto a IL-2 age indiretamente em outro tipo celular, provavelmente as células T_{reg} , que inibe a proliferação de células $CD8^+$ de memória. E o terceiro, a falta de IL-2 permitiria a ação de outras citocinas que ligam-se a receptores que compartilham uma ou duas cadeias do IL-2R, como por exemplo, IL-4, IL-7, IL-15 e IL-21, sendo que a atividade destas citocinas seria superior à da IL-2.

Os resultados obtidos com camundongos SCIDs reconstituídos e com a neutralização da IL-2, sugerem que em cinéticas distintas ambas as células T_{reg} e IL-2 são capazes de controlar a ativação policlonal induzida pelo *P. chabaudi*. As células T_{reg} limitando de forma direta e portanto mais rápida a ativação de células $CD4^+$ e a IL-2 de forma indireta atuando nas células T_{reg} . No entanto, nem as células T_{reg} nem a IL-2 são capazes de interferir no controle da patologia decorrente da infecção pelo *P. chabaudi* demonstrando que a ação de limitar a ativação policlonal poderia estar envolvida mais com o controle da ativação de células não específicas para a infecção e até mesmo células que reconhecem o próprio.

6 CONCLUSÕES

- 1) A IL-2 é secretada pelas células CD4⁺ ativadas (caracterizada pelo tamanho celular aumentado e altos níveis de CD25, CD122, CTLA-4, mTGF- β , GITR e CD45RB) no início da infecção pelo *P. chabaudi*.
- 2) O número de células T_{reg} aumenta no dia 7 p.i. pelo *P. chabaudi*.
- 3) A potencialização de IL-2 leva a um aumento na ativação de células CD4⁺ sem, no entanto, alterar o número de células T_{reg}.
- 4) No início da infecção, a ausência de IL-2 induz uma diminuição no número de células T_{reg}, mas não altera a ativação de células CD4⁺.
- 5) A ausência de IL-2 não altera a patologia decorrente da infecção pelo *P. chabaudi*.
- 6) Na fase inicial da infecção, a IL-2 não é essencial para a ativação de células CD4⁺, podendo ser substituída por outras citocinas como a IL-7 e a IL-15.
- 7) Durante a infecção pelo *P. chabaudi*, as células T_{reg} estão envolvidas no controle da ativação policlonal de células T e B, regulando a produção de IFN- γ , anticorpos IgG parasita-específicos e auto-anticorpos.
- 8) A neutralização de IL-2, no início da infecção, não altera a ativação de células CD4⁺, mas leva a uma diminuição do número de células T_{reg} 7 dias após a infecção pelo *P. chabaudi*.
- 9) A neutralização de IL-2, no início da infecção, determina uma exacerbação da resposta de células CD4⁺ 20 dias após a infecção pelo *P. chabaudi*.
- 10) No dia 20 dias de infecção o número de células T_{reg} nos camundongos tratados com mAb JES6-1 volta a valores próximos dos camundongos não tratados.

- 11) A neutralização de IL-2 no início da infecção determina uma exacerbação da resposta das células CD4⁺ a eritrócitos parasitados.

Zago, C. A.

O papel das células T_{reg} e da IL-2 na resposta policlonal de células CD4⁺ durante a infecção pelo *P. chabaudi*

BIBLIOGRAFIA

International Committee of Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. C2003 – [update 2005 June 15; cited 2006 May 16]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

1. Daniel-Ribeiro C, Druilhe P, Monjour L, Homberg JC, Gentilini M. Specificity of auto-antibodies in malaria and the role of polyclonal activation. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1983;77(2):185-8.
2. Daniel-Ribeiro C, de Oliveira-Ferreira J, Banic DM, Galvao-Castro B. Can malaria-associated polyclonal B-lymphocyte activation interfere with the development of anti-sporozoite specific immunity? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1989;83(3):289-92.
3. Rolland L, Ballet JJ, Daniel-Ribeiro C. Kinetics of antigen specific and non-specific polyclonal B-cell responses during lethal *Plasmodium yoelii* malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992;87(2):197-204.
4. Berendt AR, Tumer GD, Newbold CI. Cerebral malaria: the sequestration hypothesis. *Parasitol Today.* 1994;10(10):412-4.
5. Trape JF, Zoulani A, Quinet MC. Assessment of the incidence and prevalence of clinical malaria in semi-immune children exposed to intense and perennial transmission. *Am J Epidemiol.* 1987;126(2):193-201.
6. Trape JF, Rogier C, Konate L, Diagne N, Bouganali H, Canque B, Legros F, Badji A, Ndiaye G, Ndiaye P, et al. The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;51(2):123-37.
7. Dubois P, Pereira da Silva L. Towards a vaccine against asexual blood stage infection by *Plasmodium falciparum*. *Res Immunol.* 1995;146(4-5):263-75.
8. 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.
9. Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(9):722-35.
10. Ocana-Morgner C, Mota MM, Rodriguez A. Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. *J Exp Med.* 2003;197(2):143-51.
11. Urban BC, Willcox N, Roberts DJ. A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(15):8750-5. Epub 2001 Jul 10.

12. Urban BC, Ferguson DJ, Pain A, Willcox N, Plebanski M, Austyn JM, Roberts DJ. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature*. 1999;400(6739):73-7.
13. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995;155(3):1151-64.
14. Sakaguchi S, Toda M, Asano M, Itoh M, Morse SS, Sakaguchi N. T cell-mediated maintenance of natural self-tolerance: its breakdown as a possible cause of various autoimmune diseases. *J Autoimmun*. 1996;9(2):211-20.
15. Bystry RS, Aluvihare V, Welch KA, Kallikourdis M, Betz AG. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat Immunol*. 2001;2(12):1126-32.
16. Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol*. 1998;160(3):1212-8.
17. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol*. 2002;3(2):135-42. Epub 2002 Jan 22.
18. Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med*. 2000;192(2):295-302.
19. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med*. 2001;194(5):629-44.
20. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4(4):330-6. Epub 2003 Mar 3.
21. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299(5609):1057-61. Epub 2003 Jan 9.
22. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol*. 2003;4(4):337-42. Epub 2003 Mar 3.

23. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med*. 2001;194(5):629-44.
24. Hori S, Carvalho TL, Demengeot J. CD25+CD4+ regulatory T cells suppress CD4+ T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by *Pneumocystis carinii* in immunodeficient mice. *Eur J Immunol*. 2002;32(5):1282-91.
25. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:683-765.
26. Mennechet FJ, Kasper LH, Rachinel N, Minns LA, Luangsang S, Vandewalle A, Buzoni-Gatel D. Intestinal intraepithelial lymphocytes prevent pathogen-driven inflammation and regulate the Smad/T-bet pathway of lamina propria CD4+ T cells. *Eur J Immunol*. 2004;34(4):1059-67.
27. Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, Belkaid Y. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med*. 2007;204(8):1775-85. Epub 2007 Jul 9.
28. Gazzinelli RT, Wysocka M, Hieny S, Scharton-Kersten T, Cheever A, Kuhn R, Muller W, Trinchieri G, Sher A. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol*. 1996;157(2):798-805.
29. Park HB, Paik DJ, Jang E, Hong S, Youn J. Acquisition of anergic and suppressive activities in transforming growth factor-beta-costimulated CD4+CD25- T cells. *Int Immunol*. 2004;16(8):1203-13. Epub 2004 Jul 5.
30. Manigold T, Shin EC, Mizukoshi E, Mihalik K, Murthy KK, Rice CM, Piccirillo CA, Rehermann B. Foxp3+CD4+CD25+ T cells control virus-specific memory T cells in chimpanzees that recovered from hepatitis C. *Blood*. 2006;107(11):4424-32. Epub 2006 Feb 14.
31. Kursar M, Bonhagen K, Fensterle J, Kohler A, Hurwitz R, Kamradt T, Kaufmann SH, Mittrucker HW. Regulatory CD4+CD25+ T cells restrict memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med*. 2002;196(12):1585-92.
32. Toka FN, Suvas S, Rouse BT. CD4+ CD25+ T cells regulate vaccine-generated primary and memory CD8+ T-cell responses against herpes simplex virus type 1. *J Virol*. 2004;78(23):13082-9.

33. Gaffen SL, Liu KD. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine*. 2004;28(3):109-23.
34. Gaffen SL. Signaling domains of the interleukin 2 receptor. *Cytokine*. 2001;14(2):63-77.
35. Malek TR, Yu A, Scibelli P, Lichtenheld MG, Codias EK. Broad programming by IL-2 receptor signaling for extended growth to multiple cytokines and functional maturation of antigen-activated T cells. *J Immunol*. 2001;166(3):1675-83.
36. Pahwa S, Morales M. Interleukin-2 therapy in HIV infection. *AIDS Patient Care STDS*. 1998;12(3):187-97.
37. Dutcher J. High-dose interleukin-2 in metastatic disease: renal cell carcinoma and melanoma. *Oncology (Williston Park)*. 2002;16(11 Suppl 13):3.
38. Sadlack B, Kuhn R, Schorle H, Rajewsky K, Muller W, Horak I. Development and proliferation of lymphocytes in mice deficient for both interleukins-2 and -4. *Eur J Immunol*. 1994;24(1):281-4.
39. Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell*. 1993;75(2):253-61.
40. Sadlack B, Lohler J, Schorle H, Klebb G, Haber H, Sickel E, Noelle RJ, Horak I. Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol*. 1995;25(11):3053-9.
41. Lenardo MJ. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature*. 1991;353(6347):858-61.
42. Kneitz B, Herrmann T, Yonehara S, Schimpl A. Normal clonal expansion but impaired Fas-mediated cell death and anergy induction in interleukin-2-deficient mice. *Eur J Immunol*. 1995;25(9):2572-7.
43. Wang R, Rogers AM, Rush BJ, Russell JH. Induction of sensitivity to activation-induced death in primary CD4⁺ cells: a role for interleukin-2 in the negative regulation of responses by mature CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol*. 1996;26(9):2263-70.

44. Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, Yoo NJ, Mahboubi A, Echeverri F, Martin SJ, Force WR, Lynch DH, Ware CF, et al. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature*. 1995;373(6513):441-4.
45. Ju ST, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, el-Khatib M, Sherr DH, Stanger BZ, Marshak-Rothstein A. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature*. 1995;373(6513):444-8.
46. Malek TR, Yu A, Vincek V, Scibelli P, Kong L. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity*. 2002;17(2):167-78.
47. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. 1998;188(2):287-96.
48. Wolf M, Schimpl A, Hunig T. Control of T cell hyperactivation in IL-2-deficient mice by CD4(+)CD25(-) and CD4(+)CD25(+) T cells: evidence for two distinct regulatory mechanisms. *Eur J Immunol*. 2001;31(6):1637-45.
49. Willerford DM, Chen J, Ferry JA, Davidson L, Ma A, Alt FW. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity*. 1995;3(4):521-30.
50. Antov A, Yang L, Vig M, Baltimore D, Van Parijs L. Essential role for STAT5 signaling in CD25+CD4+ regulatory T cell homeostasis and the maintenance of self-tolerance. *J Immunol*. 2003;171(7):3435-41.
51. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2005;6(11):1142-51. Epub 2005 Oct 16.
52. Coutelier JP, Coulie PG, Wauters P, Heremans H, van der Logt JT. In vivo polyclonal B-lymphocyte activation elicited by murine viruses. *J Virol*. 1990;64(11):5383-8.
53. Coutelier JP, Johnston SJ, El Idrissi Me-A, Pfau CJ. Involvement of CD4+ cells in lymphocytic choriomeningitis virus-induced autoimmune anaemia and hypergammaglobulinaemia. *J Autoimmun*. 1994;7(5):589-99.
54. Li X, Hu B, Harty J, Even C, Plagemann PG. Polyclonal B cell activation of IgG2a and IgG2b production by infection of mice with lactate dehydrogenase-

elevating virus is partly dependent on CD4⁺ lymphocytes. *Viral Immunol.* 1990;3(4):273-88.

55. Hunziker L, Recher M, Macpherson AJ, Ciurea A, Freigang S, Hengartner H, Zinkernagel RM. Hypergammaglobulinemia and autoantibody induction mechanisms in viral infections. *Nat Immunol.* 2003;4(4):343-9. Epub 2003 Mar 10.

56. Biberfeld G, Gronowicz E. *Mycoplasma pneumoniae* is a polyclonal B-cell activator. *Nature.* 1976;261(5557):238-9.

57. Sultzer BM. Infection with *Bacillus Calmette-Guerin* activates murine thymus-independent (B) lymphocytes. *J Immunol.* 1978;120(1):254-61.

58. Greenwood BM. Possible role of a B-cell mitogen in hypergammaglobulinaemia in malaria and trypanosomiasis. *Lancet.* 1974;1(7855):435-6.

59. Rosenberg YJ. Autoimmune and polyclonal B cell responses during murine malaria. *Nature.* 1978;274(5667):170-2.

60. Freeman RR, Parish CR. Polyclonal B-cell activation during rodent malarial infections. *Clin Exp Immunol.* 1978;32(1):41-5.

61. Kobayakawa T, Louis J, Izui S, Lambert PH. Autoimmune response to DNA, red blood cells, and thymocyte antigens in association with polyclonal antibody synthesis during experimental African trypanosomiasis. *J Immunol.* 1979;122(1):296-301.

62. Ortiz-Ortiz L, Parks DE, Rodriguez M, Weigle WO. Polyclonal B lymphocyte activation during *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 1980;124(1):121-6.

63. Cunningham DS, Kuhn RE, Tarleton RL, Dunn RS. *Trypanosoma cruzi*: effect on B-cell-responsive and -responding clones. *Exp Parasitol.* 1981;51(2):257-68.

64. Galvao-Castro B, Sa Ferreira JA, Marzochi KF, Marzochi MC, Coutinho SG, Lambert PH. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 1984;56(1):58-66.

65. 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.
66. D'Imperio Lima MR, Joskowicz M, Coutinho A, Kipnis T, Eisen H. Very large and isotypically atypical polyclonal plaque-forming cell responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Immunol.* 1985;15(2):201-3.
67. Falanga PB, D'Imperio Lima MR, Coutinho A, Pereira da Silva L. Isotypic pattern of the polyclonal B cell response during primary infection by *Plasmodium chabaudi* and in immune-protected mice. *Eur J Immunol.* 1987;17(5):599-603.
68. Banic DM, Viana-Martins FS, De Souza JM, Peixoto TD, Daniel-Ribeiro C. Polyclonal B-lymphocyte stimulation in human malaria and its association with ongoing parasitemia. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;44(5):571-7.
69. Lopes LM, Pereira MA, Gerken SE, Vaz N. Polyclonal activation of B lymphocytes during experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasitology.* 1990;100(Pt 1):83-91.
70. Verdonck E, Pfau CJ, Gonzalez MD, Masson PL, Coutelier JP. Influence of viral infection on anti-erythrocyte autoantibody response after immunization of mice with rat red blood cells. *Autoimmunity.* 1994;17(1):73-81.
71. Ramos OP, Silva EE, Falcao DP, de Medeiros BM. Production of autoantibodies associated with polyclonal activation in *Yersinia enterocolitica* O: 8-infected mice. *Microbiol Immunol.* 2005;49(2):129-37.
72. Wedderburn N, Salaman MH. The immunodepressive effect of Friend virus. II. Reduction of splenic haemolysin-producing cells in primary and secondary responses. *Immunology.* 1968;15(3):439-54.
73. Salaman MH, Wedderburn N, Bruce-Chwatt LJ. The immunodepressive effect of a murine plasmodium and its interaction with murine oncogenic viruses. *J Gen Microbiol.* 1969;59(3):383-91.
74. Greenwood BM, Brown JC, De Jesus DG, Holborow EJ. Immunosuppression in murine malaria. II. The effect on reticulo-endothelial and germinal centre function. *Clin Exp Immunol.* 1971;9(3):345-54.
75. Goodwin LG, Green DG, Guy MW, Voller A. Immunosuppression during trypanosomiasis. *Br J Exp Pathol.* 1972;53(1):40-3.

76. Voller A, Gall D, Manawadu BR. Depression of the antibody response to tetanus toxoid in mice infected with malaria parasites. *Z Tropenmed Parasitol.* 1972;23(2):152-5.
77. Strickland GT, Voller A, Pettit LE, Fleck DG. Immunodepression associated with concomitant toxoplasma and malarial infections in mice. *J Infect Dis.* 1972;126(1):54-60.
78. Whitmore DB. Suppression of the immune response to heterologous erythrocytes in mice infected with *Plasmodium berghei berghei*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1972;66(1):5-6.
79. Hudson KM, Byner C, Freeman J, Terry RJ. Immunodepression, high IgM levels and evasion of the immune response in murine trypanosomiasis. *Nature.* 1976;264(5583):256-8.
80. McBride JS, Micklem HS, Ure JM. Immunosuppression in murine malaria. I. Response to type III pneumococcal polysaccharide. *Immunology.* 1977;32(5):635-44.
81. Strambachova-McBride J, Micklem HS. Immunosuppression in murine malaria. IV. The secondary response to bovine serum albumin. *Parasite Immunol.* 1979;1(2):141-57.
82. McBride JS, Micklem HS. Immunodepression of thymus-independent response to dextran in mouse malaria. *Clin Exp Immunol.* 1981;44(1):74-81.
83. Clagett JA, Engel D. Polyclonal activation: a form of primitive immunity and its possible role in pathogenesis of inflammatory diseases. *Dev Comp Immunol.* 1978;2(2):235-41.
84. Abele DC, Tobie JE, Hill GJ, Contacos PG, Evans CB. Alterations in Serum Proteins and 19s Antibody Production During the Course of Induced Malarial Infections in Man. *Am J Trop Med Hyg.* 1965;14:191-7.
85. Adu D, Williams DG, Quakyi IA, Voller A, Anim-Addo Y, Bruce-Tagoe AA, Johnson GD, Holborow EJ. Anti-ssDNA and antinuclear antibodies in human malaria. *Clin Exp Immunol.* 1982;49(2):310-6.
86. Boonpucknavig S, Ekapanyakul G. Autoantibodies in sera of Thai patients with *Plasmodium falciparum* infection. *Clin Exp Immunol.* 1984;58(1):77-82.

87. Lima MR, Bandeira A, Falanga P, Freitas AA, Kipnis TL, da Silva LP, Coutinho A. Clonal analysis of B lymphocyte responses to *Plasmodium chabaudi* infection of normal and immunoprotected mice. *Int Immunol*. 1991;3(12):1207-16.
88. D'Imperio Lima MR, Alvarez JM, Furtado GC, Kipnis TL, Coutinho A, Minoprio P. Ig-isotype patterns of primary and secondary B cell responses to *Plasmodium chabaudi chabaudi* correlate with IFN-gamma and IL-4 cytokine production with CD45RB expression by CD4⁺ spleen cells. *Scand J Immunol*. 1996;43(3):263-70.
89. 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.
90. Mota MM, Brown KN, Holder AA, Jarra W. Acute *Plasmodium chabaudi chabaudi* malaria infection induces antibodies which bind to the surfaces of parasitized erythrocytes and promote their phagocytosis by macrophages in vitro. *Infect Immun*. 1998;66(9):4080-6.
91. 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(3):1485-90.
92. Elias RM, Sardinha LR, Bastos KR, 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(2):790-9.
93. Stevenson MM, Tam MF, Belosevic M, van der Meide PH, Podoba JE. Role of endogenous gamma interferon in host response to infection with blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS. *Infect Immun*. 1990;58(10):3225-32.
94. Su Z, Stevenson MM. Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *Infect Immun*. 2000;68(8):4399-406.
95. 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(12):617-26.
96. Podoba JE, Stevenson MM. CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes both contribute to acquired immunity to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS. *Infect Immun*. 1991;59(1):51-8.

97. 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(6):529-43.
98. 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(3):239-54.
99. Cavinato RA, Bastos KR, Sardinha LR, Elias RM, Alvarez JM, d'Imperio Lima MR. Susceptibility of the different developmental stages of the asexual (schizogonic) erythrocyte cycle of *Plasmodium chabaudi chabaudi* to hyperimmune serum, immunoglobulin (Ig)G1, IgG2a and F(ab')₂ fragments. *Parasite Immunol.* 2001;23(11):587-97.
100. Stevenson MM, Urban BC. Antigen presentation and dendritic cell biology in malaria. *Parasite Immunol.* 2006;28(1-2):5-14.
101. Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science.* 1976;193(4257):1007-8.
102. Refaeli Y, Van Parijs L, London CA, Tschopp J, Abbas AK. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity.* 1998;8(5):615-23.
103. Lenardo MJ. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature.* 1991;353(6347):858-61.
104. Malek TR, Bayer AL. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(9):665-74.
105. Kundig TM, Schorle H, Bachmann MF, Hengartner H, Zinkernagel RM, Horak I. Immune responses in interleukin-2-deficient mice. *Science.* 1993;262(5136):1059-61.
106. Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell.* 1993;75(2):253-61.
107. Sadlack B, Lohler J, Schorle H, Klebb G, Haber H, Sickel E, Noelle RJ, Horak I. Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is

triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4⁺ T cells. Eur J Immunol. 1995;25(11):3053-9.

108. Malek TR, Yu A, Vincek V, Scibelli P, Kong L. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. Immunity. 2002;17(2):167-78.

109. Papiernik M, de Moraes ML, Pontoux C, Vasseur F, Penit C. Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. Int Immunol. 1998;10(4):371-8.

110. Almeida AR, Legrand N, Papiernik M, Freitas AA. Homeostasis of peripheral CD4⁺ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4⁺ T cell numbers. J Immunol. 2002;169(9):4850-60.

111. Pahwa S, Morales M. Interleukin-2 therapy in HIV infection. AIDS Patient Care STDS. 1998;12(3):187-97.

112. Nie CQ, Bernard NJ, Schofield L, Hansen DS. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells suppress CD4⁺ T-cell function and inhibit the development of Plasmodium berghei-specific TH1 responses involved in cerebral malaria pathogenesis. Infect Immun. 2007;75(5):2275-82. Epub 007 Feb 26.

113. Ing R, Gros P, Stevenson MM. Interleukin-15 enhances innate and adaptive immune responses to blood-stage malaria infection in mice. Infect Immun. 2005;73(5):3172-7.

114. Amante FH, Stanley AC, Randall LM, Zhou Y, Haque A, McSweeney K, Waters AP, Janse CJ, Good MF, Hill GR, Engwerda CR. A role for natural regulatory T cells in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. Am J Pathol. 2007;171(2):548-59. Epub 2007 Jun 28.

115. Vigario AM, Gorgette O, Dujardin HC, Cruz T, Cazenave PA, Six A, Bandeira A, Pied S. Regulatory CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells expand during experimental Plasmodium infection but do not prevent cerebral malaria. Int J Parasitol. 2007;37(8-9):963-73. Epub 2007 Jan 19.

116. Wu Y, Wang QH, Zheng L, Feng H, Liu J, Ma SH, Cao YM. Plasmodium yoelii: distinct CD4(+)CD25(+) regulatory T cell responses during the early stages of infection in susceptible and resistant mice. Exp Parasitol. 2007;115(3):301-4. Epub 2006 Nov 7.

117. Hisaeda H, Maekawa Y, Iwakawa D, Okada H, Himeno K, Kishihara K, Tsukumo S, Yasutomo K. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Med.* 2004;10(1):29-30. Epub 2003 Dec 21.
118. Cambos M, Belanger B, Jacques A, Roulet A, Scorza T. Natural regulatory (CD4⁺)CD25⁺)FOXP⁺) T cells control the production of pro-inflammatory cytokines during *Plasmodium chabaudi* adami infection and do not contribute to immune evasion. *Int J Parasitol.* 2008;38(2):229-38. Epub 2007 Jul 26.
119. Lamb TJ, Brown DE, Potocnik AJ, Langhorne J. Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. *Expert Rev Mol Med.* 2006;8(6):1-22.
120. Beeson JG, Duffy PE. The immunology and pathogenesis of malaria during pregnancy. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005;297:187-227.
121. Harbarth S, Meyer M, Grau GE, Loutan L, Ricou B. Septic Shock due to Cytomegalovirus Infection in Acute Respiratory Distress Syndrome after Falciparum Malaria. *J Travel Med.* 1997;4(3):148-9.
122. Riccio EK, Junior IN, Riccio LR, das Gracias Alecrim M, Corte-Real S, Morgado M, Daniel-Ribeiro CT, de Fatima 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. Epub 2003 Jan 28.
123. Xu H, Wipasa J, Yan H, Zeng M, Makobongo MO, Finkelman FD, Kelso A, Good MF. The mechanism and significance of deletion of parasite-specific CD4⁺ T cells in malaria infection. *J Exp Med.* 2002;195(7):881-92.
124. Cavinato RA, Bastos KR, Sardinha LR, Elias RM, Alvarez JM, d'Imperio Lima MR. Susceptibility of the different developmental stages of the asexual (schizogonic) erythrocyte cycle of *Plasmodium chabaudi chabaudi* to hyperimmune serum, immunoglobulin (Ig)G1, IgG2a and F(ab')₂ fragments. *Parasite Immunol.* 2001;23(11):587-97.
125. Boyman O, Kovar M, Rubinstein MP, Surh CD, Sprent J. Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes. *Science.* 2006;311(5769):1924-7. Epub 2006 Feb 16.
126. Jackson SS, Schmitz JE, Kuroda MJ, McKay PF, Sumida SM, Martin KL, Yu F, Lifton MA, Gorgone DA, Letvin NL. Evaluation of CD62L expression as a marker for vaccine-elicited memory cytotoxic T lymphocytes. *Immunology.* 2005;116(4):443-53.

127. Rogers PR, Dubey C, Swain SL. Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen. *J Immunol.* 2000;164(5):2338-46.
128. Dutton RW, Bradley LM, Swain SL. T cell memory. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:201-23.
129. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:745-63.
130. Hernandez-Valladares M, Naessens J, Musoke AJ, Sekikawa K, Rihet P, Ole-Moiyoi OK, Busher P, Iraqi FA. Pathology of Tnf-deficient mice infected with *Plasmodium chabaudi* adami 408XZ. *Exp Parasitol.* 2006;114(4):271-8. Epub 2006 May 22.
131. Cross CE, Langhorne J. *Plasmodium chabaudi chabaudi* (AS): inflammatory cytokines and pathology in an erythrocytic-stage infection in mice. *Exp Parasitol.* 1998;90(3):220-9.
132. Thornton AM, Shevach EM. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* 1998;188(2):287-96.
133. Granucci F, Vizzardelli C, Pavelka N, Feau S, Persico M, Virzi E, Rescigno M, Moro G, Ricciardi-Castagnoli P. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol.* 2001;2(9):882-8.
134. Thornton AM, Donovan EE, Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4⁺CD25⁺ T cell suppressor function. *J Immunol.* 2004;172(11):6519-23.
135. Kursar M, Kohler A, Kaufmann SH, Mittrucker HW. Depletion of CD4⁺ T cells during immunization with nonviable *Listeria monocytogenes* causes enhanced CD8⁺ T cell-mediated protection against listeriosis. *J Immunol.* 2004;172(5):3167-72.
136. Kullberg MC, Jankovic D, Gorelick PL, Caspar P, Letterio JJ, Cheever AW, Sher A. Bacteria-triggered CD4⁺ T regulatory cells suppress *Helicobacter hepaticus*-induced colitis. *J Exp Med.* 2002;196(4):505-15.

137. Sacks D, Anderson C. Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of Leishmania infection in mice. *Immunol Rev.* 2004;201:225-38.
138. Long TT, Nakazawa S, Onizuka S, Huaman MC, Kanbara H. Influence of CD4+CD25+ T cells on Plasmodium berghei NK65 infection in BALB/c mice. *Int J Parasitol.* 2003;33(2):175-83.
139. Phelan JD, Orekov T, Finkelman FD. Cutting edge: mechanism of enhancement of in vivo cytokine effects by anti-cytokine monoclonal antibodies. *J Immunol.* 2008;180(1):44-8.
140. Kamimura D, Sawa Y, Sato M, Agung E, Hirano T, Murakami M. IL-2 in vivo activities and antitumor efficacy enhanced by an anti-IL-2 mAb. *J Immunol.* 2006;177(1):306-14.
141. Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med.* 2005;201(5):723-35.
142. de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol.* 2004;34(9):2480-8.
143. Papiernik M, de Moraes ML, Pontoux C, Vasseur F, Penit C. Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *Int Immunol.* 1998;10(4):371-8.
144. Klebb G, Autenrieth IB, Haber H, Gillert E, Sadlack B, Smith KA, Horak I. Interleukin-2 is indispensable for development of immunological self-tolerance. *Clin Immunol Immunopathol.* 1996;81(3):282-6.
145. Cozzo C, Larkin J 3rd, Caton AJ. Cutting edge: self-peptides drive the peripheral expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2003;171(11):5678-82.
146. Gavin MA, Clarke SR, Negrou E, Gallegos A, Rudensky A. Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol.* 2002;3(1):33-41. Epub 2001 Dec 10.
147. Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, DeRoos P, Ho WY, Stray-Pedersen A, Ocheltree EL, Greenberg PD, Ochs HD, Rudensky AY. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T

cell development. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(17):6659-64. Epub 2006 Apr 14.

148. Ghosh K. Pathogenesis of anemia in malaria: a concise review. Parasitol Res. 2007;101(6):1463-9. Epub 2007 Sep 16.

149. Maraskovsky E, Teepe M, Morrissey PJ, Braddy S, Miller RE, Lynch DH, Peschon JJ. Impaired survival and proliferation in IL-7 receptor-deficient peripheral T cells. J Immunol. 1996;157(12):5315-23.

150. Akashi K, Kondo M, von Freeden-Jeffry U, Murray R, Weissman IL. Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in interleukin-7 receptor-deficient mice. Cell. 1997;89(7):1033-41.

151. Hassan J, Reen DJ. IL-7 promotes the survival and maturation but not differentiation of human post-thymic CD4⁺ T cells. Eur J Immunol. 1998;28(10):3057-65.

152. Schluns KS, Williams K, Ma A, Zheng XX, Lefrancois L. Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. J Immunol. 2002;168(10):4827-31.

153. Zhang X, Sun S, Hwang I, Tough DF, Sprent J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15. Immunity. 1998;8(5):591-9.

REFERÊNCIAS OBTIDAS ATRAVÉS DE SITES DA INTERNET

Organização das Nações Unidas. World Health Organization. Disponível em: www.who.int/topics/malaria/en/. Acesso em 15 de outubro de 2007.