Sandra Marcia Muxel

Papel das células T convencionais e não-convencionais do baço durante a infecção pelo *Plasmodium chabaudi* AS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2011

Sandra Marcia Muxel

Papel das células T convencionais e não-convencionais do baço durante a infecção pelo *Plasmodium chabaudi* AS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia

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

São Paulo
2011

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

© reprodução total

Muxel, Sandra Marcia.
Papel das células T convencionais e não-convencionais do baço durante a infecção pelo *Plasmodium chabaudi* AS / Sandra Marcia Muxel. -- São Paulo, 2011.

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.

Versão do título para o inglês: Role of conventional and non-conventional T cells in the spleen during *Plasmodium chabaudi* AS infection.

Descritores: 1. Malária 2. Linfócitos T 3. Linfócitos B 4. Interferon-gama 5. Poliferação 6. Anticorpos I. D`Império Lima, Maria Regina II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB026/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Sandra Marcia Muxel.

Título da Tese: Papel das células T convencionais e não-convencionais do baço durante a infecção pelo *Plasmodium chabaudi* AS.

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

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

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011)3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIM

Decl. CEEA.0019/2005

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 31/04/CEEA, aprovo a inclusão dos alunos **CLÁUDIA AUGUSTA ZAGO, SHEYLA INÊS CASTILLO MÉNDEZ, ROGÉRIO VALOIS E SANDRA MÁRCIA MUXEL** ao protocolo intitulado: *"Estudo da resposta imune inata e adquirida contra o plasmodium chabaudi"*, para uso da espécie animal utilizada e métodos semelhantes.

São Paulo, 03 de outubro de 2005.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Marília C. L. Seeleander
Coordenadora da CEEA- ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

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

Aos Meus Amados Pais, Francisco e Maria, e aos meus Irmãos, Alfredo e Paula, pelo amor e apoio incondicional em todas as horas, e que mesmo separados pela distância, sempre torceram pelo meu sucesso e me incentivaram em todos os momentos...

Ao meu amado esposo, Fabrizzio, pelo amor, carinho, cuidado e companheirismo de sempre, mesmo quando isso significava ir comigo ao laboratório nos finais de semana, feriados, etc... Ou seja, obrigada pelo apoio e compreensão, e por estar ao meu lado em todos os momentos ... e trazer a felicidade de termos nossa vida, amor e família...

Ao meu amado filho, Luccas, por tornar minha vida muito mais feliz, por sorrir pra mim, por cada abraço e beijo cheios de carinho ... e pelo adorado e sonoro: mamãe, mamãe.

AGRADECIMENTOS

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

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

Ao Prof. José Maria Alvarez Mosig (Pepe) pela contribuição neste trabalho e pelo convívio agradável.

Ao Prof. Niels por colaborar em meu trabalho, pela atenção, apoio e incentivo.

Aos professores Maurício Rodrigues, Sandro Almeida e Alexandre Keller pelas relevantes sugestões apresentadas no exame de qualificação, que certamente contribuíram para melhorar este trabalho.

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

À minha amiga Ana Paula pela amizade verdadeira, incentivo e colaboração em todos os momentos e experimentos. E que a saudade e a distância fortaleça nossa amizade.

Ao meu amigo Sérgio (mais conhecido como "colega"), pela atenção, incentivo, auxílio nos experimentos e pelas super dicas parasitárias!

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

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

A todos os amigos do Laboratório de Imunologia das Parasitoses, Luiz, Christian, Daniella, André, Fernando, Raquel, Érika, Eduardo e Henrique, que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho e para a convivência tão agradável no laboratório.

Ás Profa. Lucile Floeter-Winter e Profa. Regina Markus pelo carinho, confiança e pela oportunidade de aprender com vocês.

Aos amigos do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências, pelo acolhimento e confiança e também pela amizade e companheirismo, Cláudia, Camila, Érika, Daiane, Kelly, Marina, Leila, Fernanda, Pinato, Eduardo Tamura, Pedro, Marco, Sanseray, Eduardo Braga, Emersom, Marcos.

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

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

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

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

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: 05/54889-2, 05/51170-7 e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Projeto Universal número: 472966-2004-9.

Faça o que for necessário para ser feliz. Mas não se esqueça que a felicidade é um sentimento simples, você pode encontrá-la e deixá-la ir embora por não perceber sua simplicidade.

Mário Quintana

RESUMO

Muxel SM. Papel das células T convencinais e não-convencionais do durante a infecção pelo *Plasmodium chabaudi* AS. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

As células T $CD4^+$ do baço são importantes na proteção frente à malária através de mecanismos mediados pelas citocinas do perfil Th1 e também pelo auxílio na produção de anticorpos. No decorrer desse trabalho, nós investigamos o papel das células T $CD4^+$ convencionais (restritas por moléculas de classe II do MHC) e não-convencionais (restritas por moléculas CD1d, TL, Qa-1 ou H2-M3), das células $CD8^+$ e células B durante a infecção pelos estágios eritrocíticos de *Plasmodium chabaudi* AS. Para tanto, na primeira parte (I) do nosso estudo, nós caracterizamos as células T $NK1.1^+$ e $NK1.1^-$ do baço no início da resposta imune ao *P. chabaudi*; e na segunda parte (II), nós examinamos em detalhe o comportamento das células T $CD4^+$ convencionais e não-convencionais, células $CD8^+$ e células B do baço durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*, em comparação com a fase crônica. Na Parte I, nós observamos que o aumento no número de células $CD4^+NK1.1^+TCR\alpha\beta^+$, $CD8^+NK1.1^+TCR\alpha\beta^+$ e $CD4^+NK1.1^-TCR\alpha\beta^+$ por baço nos camundongos C57BL/6 correlaciona com o primeiro pico de parasitemia. Além disso, observamos um aumento maior para as células T $NK1.1^+$ comparadas com as células T $NK1.1^-$, sendo parcialmente dependente da presença da molécula CD1d. No entanto, no dia 7 de infecção, as células $CD4^+NK1.1^+$ não são células NKT invariantes. Neste período, praticamente todas as células T $NK1.1^+$ e por volta de 30% das células T $NK1.1^-$ apresentam o fenótipo de células experimentadas/ativadas ($CD44^{HI}CD69^{HI}CD122^{HI}$), com expressão de níveis altos de Fas e PD-L1 que correlaciona com a baixa capacidade proliferativa. As células $CD4^+NK1.1^+$ e $CD4^+NK1.1^-$ produzem IFN-γ nos dias 4 e 5 de infecção, mas as células $CD4^+NK1.1^-$ são a principal fonte dessa citocina durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*. Na Parte II, nós mostramos que camundongos com ausência das moléculas de classe II do MHC, que possuem somente células T $CD4^+$ não-convencionais, desenvolvem o primeiro pico de parasitemia significantemente maior e picos recrudescentes proeminentes quando comparados com os camundongos C57BL/6. Nós também verificamos que as células T $CD4^+$ convencionais são a principal subpopulação de células T ativadas na resposta imune frente à infecção, que se desenvolve em duas fases consecutivas concomitantemente com as parasitemias aguda e crônica. Na fase aguda da infecção, a resposta das células T $CD4^+$ convencionais é intensa e de curta duração, fornecendo rapidamente grandes quantidades de citocinas proinflamatórias e auxiliando na produção de anticorpos policlonais pelas células B da zona marginal e foliculares. A produção de TNF-α e IFN-γ depende principalmente das células T $CD4^+$ convencionais, que secretam IFN-γ com cinética semelhante às células T $CD4^+$ não-convencionais. A fase aguda da resposta imune termina após uma semana de infecção, com a eliminação de uma grande quantidade de células T $CD4^+$ e desenvolvimento da imunidade adquirida. Nossos resultados juntos indicam que as células T $CD4^+$ convencionais possuem um papel central no início da resposta ao *P. chabaudi*, respondendo em paralelo com as células T $CD4^+$ não-convencionais como uma ponte entre a imunidade inata e

adquirida. Ainda, as células T NK1.1^{+} e NK1.1^{-} do baço respondem à infecção aguda pelo *P. chabaudi* com cinéticas diferentes em termos de ativação, proliferação e produção de IFN-γ.

Palavras-chave: Malária. *Plasmodium chabaud.* Células T CD4^{+}. Células T NK1.1^{+}. Células B. Interferon-gama (IFN-γ). Fator de necrose tumoral (tumour necrosis factor-alpha - TNF-α). Anticorpos.

ABSTRACT

Muxel SM. Role of conventional and non-conventional Tcell in the spleen during *Plasmodium chabaudi* AS infection. [Ph. D. thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Spleen $CD4^+$ T cells have an important role for protection against malaria through mechanisms mediated by Th1 cytokines and also by the help for antibody production. In the present work, we investigated the role of conventional (class II MHC-restricted) and non-conventional (CD1d, TL, Qa-1 or H2-M3-restricted) $CD4^+$ T cells, $CD8^+$ cells and B cells during during the infection by blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS. For this, in the first part (I) of our study we characterized spleen $NK1.1^+$ and $NK1.1^-$ T cells in the early immune response to *P. chabaudi*; and in the second part (II), we examined in detail the behaviour of conventional and non-conventional $CD4^+$ T cells, $CD8^+$ and B cells from the spleen during the acute phase of *P. chabaudi* infection, in comparison with the chronic phase. In the Part I, we observed that the increase in $CD4^+NK1.1^+TCR\alpha\beta^+$, $CD8^+NK1.1^+TCR\alpha\beta^+$ and $CD4^+NK1.1^-TCR\alpha\beta^+$ cell numbers per spleen in C57BL/6 mice correlates with the first parasitemia peak. Moreover, we observed a higher increase for $NK1.1^+$ T cells compared to $NK1.1^-$ T cells, being partially dependent on the presence of CD1d molecules. However, on day 7 of infection, $CD4^+NK1.1^+$ cells are not predominantly invariant NKT cells. At that time, nearly all $NK1.1^+$ T cells and around of 30% of $NK1.1^-$ T cells show an experienced/activated ($CD44^{HI}CD69^{HI}CD122^{HI}$) cell phenotype, with high expression of Fas and PD-L1 correlating with their low proliferative capacity. $CD4^+NK1.1^+$ and $CD4^+NK1.1^-$ cells produce IFN-γ on days 4 and 5 of infection, but $CD4^+NK1.1^-$ cells are the major source of this cytokine during the acute *P. chabaudi* infection. In the Part II, we show that mice lacking class II MHC molecules, which only contain non-conventional $CD4^+$ T cells, develop significantly higher first parasitemia peak and prominent recrudescent peaks compared to C57BL/6 mice. We also find that conventional $CD4^+$ T cells are the main activated T cells subpopulation in the immune response to infection, which develops in two consecutive phases concomitantly with acute and chronic parasitemias. In the acute phase, the conventional $CD4^+$ T cell response is intense and short-lasting, rapidly providing large amounts of proinflammatory cytokines and helping follicular and marginal zone B cells to secrete polyclonal immunoglobulin. Both TNF-α and IFN-γ production mostly depends of the conventional $CD4^+$ T cells, which secrete IFN-γ with kinetics similar to non-conventional $CD4^+$ T cells. The early phase of the response finishes after a week of infection, with the elimination of a large proportion of $CD4^+$ T cells giving rise to the development of acquired immunity. Taken together, these results indicated the central role of conventional $CD4^+$ T cells during *P. chabaudi* malaria, acting in parallel with non-conventional $CD4^+$ T cells as a link between innate and acquired immunity. In addition, the spleen $NK1.1^+$ and $NK1.1^-$ T cells respond to acute *P. chabaudi* infection with different kynetics in terms of activation, proliferation and IFN-γ-production.

Keywords: Malaria. *Plasmodium chabaud.*, $CD4^+$ T cells. $NK1.1^+$ T cells. B cells. Interferon-gamma (IFN-γ). Tumour necrosis factor-alpha (TNF-α). Antibodies

LISTA DE ABREVIATURAS

α-GalCer : α-GalactosilCeramida(*α-GalactosylCeramide*)

AICD: Morte Celular Induzida pela Ativação (A*ctivation-Induced Cell Death*)

AMP: 2-Amino-2-Metil-1-Propanol

APC: Aloficocianina (A*llophycocyanin*)

BCIP: 5-Bromo-Cloro-3-Indolil Fosfato (*5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl phosphate*)

BSA: Albumina de Soro Bovina *(Bovine Serum Albumin)*

CBA: (C*ytometric Bead Array)*

CD: Grupos de Diferenciação (C*luster of Differentiation*)

CFSE: (*Carboxifluorescein Diacetate Succinimidil Ester)*

CS: Circumsporozoíta (C*ircunsporozoite*)

Cy: *(*Cy-chrome)

D.O.: Densidade Ótica

DCS: Células Dendríticas (*Dendritic Cells*)

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*),

ELISA: Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay*)

ELISPOT: (*Enzyme-lynked Immunosorbent SPOT Assay*)

EP: Eritrócitos Parasitados

FACS: Ensaio de Citometria de Fluxo (*Fluorescence-Activated Cell Sorter*)

Fc: (*Fragment crystallizable region*)

FITC*:* Isotiocianato Fluoresceína *(Fluorescein Isothiocyanate*)

FO: Células B Foliculares *(Follicular B cells)*

GPI: glicosilfosfatidilinositol (*glycosylphosphatidylinositol*)

HLA-E: (*Human Leukocyte Antigen-E*)

i.p: Intraperitoneal

IFN-γ: *(Interferon-γ)*

Ig: Imunoglobulina

IL: Interleucina *(Interleukin)*

mAb: Anticorpo Monoclonal (*Monoclonal Antibody*)

MSP-1: Proteína da Superfície do Merozoíta 1 (*Merozoite Surface Protein-1*)

MIP-1α: (*Macrophage Inflammatory Protein-1α*)

MIP-1β: (*Macrophage Inflammatory Protein-1β*)

MFI: Intensidade Média de Fluorescência *(Mean of Fluorescence Intensity)*

MHC: Complexo de Histocompatibilidade Principal (*Major Histocompatibility Complex)*

NKT : (*Natural Killer T*),

NO: Óxido Nítrico (*Nitric Oxide*)

PBS: Salina Tamponada com Fosfato (*Phosphate Buffered Saline)*

PE: Ficoeritrina *(Phycoetrin)*

PerCP : Proteína Peridina-Clorofil (*Peridin-Clorophyll-Protein*)

PD-1: (*Programmed Death-1)*

PD-L1: (*Programmed Death Ligand-1)*

SA: Estreptoavidina *(Streptavidin)*

SFB: Soro Fetal Bovino

SPF: Livre de Patógenos Específicos (*Specific Pathogen-Free)*

TCR: Receptor de Células T (*T Cell Receptor)*

TGF-β (*Transforming growth factor-β*)

Th: T auxiliar (*helper T*)

TMB: Tetra-Metil-Benzidina

TNF-α: Fator de Necrose Tumoral-α (T*umour Necrosis Factor-α*)

WT: Tipo Selvagem (*Wild Type*)

ZM: Células B da Zona Marginal *(Marginal Zone B cells)*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Endemicidade do *P. falciparum* no mundo em 2007..... 22

Figura 2: Endemicidade da malária no Brasil em 2008..... 23

Figura 3: Ciclo **de vida do *P. falciparum***..... 24

Figura 4: Subpopulações de células T NK1.1^{+}TCRαβ^{+} e NK1.1^{-}TCRαβ^{+} no baço de camundongos WT e CD1d$^{-/-}$ infectados pelo *P. chabaudi*..... 49

Figura 5: Reconhecimento do tetrâmero CD1d-α-GalCer e expressão das cadeias TCR Vβ7 e Vβ8 pelas células T NK1.1^{+} e NK1.1^{-} do baço de camundongos WT infectados pelo *P. chabaudi*..... 50

Figura 6: Expressão de CD44, CD69, CD122 e NK1.1 nas células T CD4^{+} e CD8^{+} do baço de camundongos WT infectados pelo *P. chabaudi*..... 52

Figura 7: Proliferação *das células T NK1.1^{+} e NK1.1^{-} do baço de camundongos WT infectados pelo P. chabaudi*..... 53

Figura 8: Expressão de Fas, FasL, PD-1 e PD-L1 em células T NK1.1^{+} e NK1.1^{-} do baço de camundongos WT infectados pelo *P. chabaudi*..... 56

Figura 9: Produção de IFN-γ e perforina pelas células T do baço de camundongos WT infectados pelo *P. chabaudi*..... 58

Figura 10: Curva de parasitemia dos camundongos WT, CD1d$^{-/-}$ e I-A$^{b-/-}$ infectados pelo *P. chabaudi*..... 60

Figura 11: Ativação das células CD4^{+} do baço de camundongos WT, CD1d$^{-/-}$ e I-A$^{b-/-}$ infectados pelo *P. chabaudi*..... 61

Figura 12: Resposta proliferativa das células CD4^{+} do baço de camundongos WT, CD1d$^{-/-}$ e I-A$^{b-/-}$ infectados pelo *P. chabaudi*..... 64

Figura 13: Produção de IFN-γ e TNF-α pelas células do baço de camundongos WT, CD1d$^{-/-}$ e I-A$^{b-/-}$ infectados pelo *P. chabaudi*..... 66

Figura 14: Ativação das células B do baço de camundongos WT, CD1d$^{-/-}$ e I-A$^{b-/-}$ infectados pelo *P. chabaudi*..... 68

Figura 15: Produção de anticorpos policlonais e específicos ao parasita em resposta a infecção de camundongos WT, CD1d$^{-/-}$ e I-A$^{b-/-}$ pelo *P. chabaudi*..... 70

Figura 16: Proliferação espontânea e estimulada por EP das células CD4^{+} e produção de IFN-γ no baço de camundongos WT durante a fase inicial e tardia da infecção pelo *P. chabaudi*..... 72

Figura 17: Ativação das células CD8^{+} do baço de camundongos WT, CD1d$^{-/-}$ and I-A$^{b-/-}$ infectados pelo *P. chabaudi*..... 74

Figura 18: Modelo para a resposta das células T CD4^{+} do baço durante o estágio eritrocítico da infecção pelo *P. chabaudi*..... 77

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21

1.1 A Malária 22

1.2 O Parasita e a Imunidade à Malária no Homem 23

1.3 A Resposta Imune no Baço durante a Infecção pelo *P. chabaudi* 26

1.4 O Papel das Células T e B Não-convencionais na Imunidade ao *P. chabaudi* 28

2 OBJETIVOS 38

3 MATERIAIS E MÉTODOS 40

3.1 Camundongos, Parasita e Infecção 41

3.2 Obtenção e Cultura de Esplenócitos 41

3.3 Análise Fenotípica das Células por Citometria de Fluxo 42

3.4 Ensaio de Proliferação com CFSE 42

3.5 Detecção Intracelular de Citocinas 43

3.6 Ensaio de CBA para Análise de Citocinas em Sobrenadantes 43

3.7 Purificação da Subpopulações Celulares 44

3.8 Transferência Adoptiva de Células $CD4^+$ Convencionais 44

3.9 Preparação do Extrato de *P. chabaudi* 45

3.10 ELISA para Detecção de IgG Parasita-específica 45

3.11 ELISPOT para Células Secretoras de Ig 46

3.12 Análise Estatística 46

4 RESULTADOS 47

Parte I 48

4.1 A População de Células T TCRαβ^{+} NK1.1^{+} Expande no Baço durante a Fase Aguda da Infecção pelo *P. chabaudi* 48

4.2 As Células TCRαβ^{+}NK1.1^{+} do Baço de Camundongos Infectados pelo *P. chabaudi* Não São Predominantemente Células *i*NKT 49

4.3 A Maioria das Células T NK1.1^{+} e uma Parte das Células T NK1.1^{-} do Baço de Camundongos WT Infectados pelo *P. chabaudi* Possuem o Fenótipo de Células Experimentadas/Ativadas 51

4.4 As Células T NK1.1^{+} do Baço de Camundongos WT Infectados pelo *P. chabaudi* Apresentam Baixa Capacidade Proliferativa Comparadas às Células T NK1.1^{-} 52

4.5 As Células T NK1.1^{+} de Camundongos WT Infectados pelo *P. chabaudi* Expressam Altos Níveis das Moléculas Fas, Fas-L, PD-1 e PD-L1 Comparadas às Células T NK1.1^{-} 55

4.6 As Células T NK1.1^{+} e NK1.1^{-} nos Camundongos WT Infectados pelo *P. chabaudi* Produzem IFN-γ com Cinéticas Diferentes 56

Parte II 59

4.7 As Células T Restritas por I-A^{b} são Necessárias para o Controle da Parasitemia durante a Fase Aguda e Crônica da Infecção pelo *P. chabaudi* ... 59

4.8 A Maioria das Células T CD4^{+} Ativadas durante a Fase Aguda da Infecção pelo *P. chabaudi* É Restrita pelas Moléculas de Classe II do MHC 60

4.9 As Células T CD4^{+} Restritas por I-A^{b} Proliferam Vigorosamente durante a Fase Aguda da Infecção pelo *P. chabaudi* 62

4.10 As Células T CD4^{+} Restritas por I-A^{b} são a Maior Fonte de Produção de IFN-γ no Baço durante a Fase Aguda da Infecção pelo *P. chabaudi* 65

4.11 As Células T CD4$^+$ Convencionais são Necessárias para a Ativação de Células B da Zona Marginal e Foliculares durante a Fase Aguda da Infecção pelo *P. chabaudi* 67

4.12 A Produção de Ig Policlonal e Específica ao Parasita durante a Fase Aguda e Crônica da Infecção pelo *P. chabaudi* Depende das Células T CD4$^+$ Restritas por I-A^b 70

4.13 A Ativação Precoce das Células T CD4$^+$ em Resposta à Infecção pelo *P. chabaudi* É Seguida pelo Desenvolvimento da Imunidade Adquirida 71

Parte II – Suplementar 73

4.14 As células T CD8$^+$ são Ativadas, Proliferam e Produzem IFN-γ durante a Fase Aguda da infecção pelo *P. chabaudi* 73

5 DISCUSSÃO 75

6 CONCLUSÃO 85

REFERENCIAS..... 88

ANEXO A - Comparative Analysis of Activation Phenotype, Proliferation, and IFN-γ Production by Spleen NK1.1$^+$ and NK1.1$^-$ T cells During *Plasmodium chabaudi* AS Malaria..... 105

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Malária

A malária é uma antiga causa de doença humana, com casos de morte causada pela febre que ocorrem em ciclos e esplenomegalia sendo reportados em escrituras chinesas e egípcias em meados dos anos 2700 A.C.. A malária chegou a Roma por volta de 200 A.C. e disseminou pela Europa continental no século XII e alcançou a Inglaterra no século XIV. Provavelmente, os exploradores e colonizadores europeus trouxeram o *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae* para as Américas, enquanto a chegada dos escravos trazidos da África trouxe o *Plasmodium falciparum*. No século XIX, a malária foi considerada uma doença de grandeza mundial (1, 2).

A malária afeta mais de 300-600 milhões de pessoas no mundo, entre 1,5 a 3 milhões de pessoas morrem anualmente, sendo que a maior parte das mortes acomete as crianças infectadas. A malária é uma doença endêmica que ocorre em mais de 90 países onde habitam 2,5 bilhões de pessoas, representando 40% da população mundial. Aproximadamente 90% das mortes causadas pela malária occorrem na África (Figura 1) (1, 3-8).

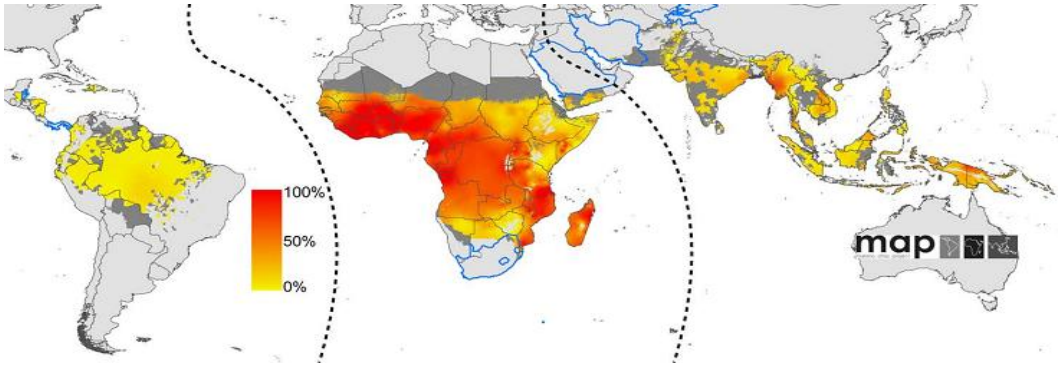

Figura 1: Endemicidade do *P. falciparum* no mundo em 2007.
Fonte: Adaptado de (9).

A malária é causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium (*filo *Sporozoa,* subfilo *Apicomplexa)* que é transmitido pelo repasto sangüíneo da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* infectada. No homem, a malária é causada por cinco espécies: *P. falciparum, P. vivax, P. malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*, sendo que a infecção pelo *P. vivax* e *P. falciparum* é responsável por 95% dos casos (3, 10, 11). Entre as espécies de *Plasmodium* que

infectam camundongos temos *Plasmodium chabaudi, Plasmodium yoelii, Plasmodium berghei e Plasmodium vinckei* (12, 13).

No Brasil, as espécies que causam a malária são *P. vivax, P. falciparum* e, menos freqüentemente, *P. malariae*. Aproximadamente, 99,5% dos casos de malária do Brasil ocorrem na Amazônia Legal, que é composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Rondônia, Roraima, Mato Grosso, Tocantis, Maranhão e Pará. Em 2008 foram registrados cerca de 380.000 casos de malária causados pelo *P. vivax* e 50.000 casos causados pelo *P. falciparum* (Figura 2) (14).

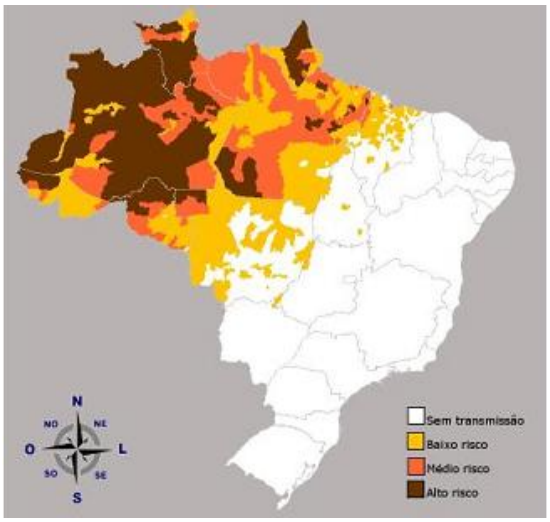

Figura 2: Endemicidade da malária no Brasil em 2008.
Fonte: SISMAL/SIVEP/SVS/MS (14)

1.2 O Parasita e a Imunidade à Malária no Homem

O ciclo vital do *Plasmodium* compreende duas fases: a assexuada no hospedeiro vertebrado (homens, primatas, roedores, aves, entre outros) e a sexuada no mosquito (Figura 3). A infecção inicia-se com a inoculação dos esporozoítas na pele pela picada do mosquito infectado, os esporozoítas atingem a corrente sanguínea e podem alcançar os hepatócitos entre 30-60 minutos, iniciando a fase pré-eritrocítica do ciclo (no fígado) (15, 16).

Dentro dos hepatócitos os parasitas proliferam por volta de 5-10 dias, para infecções com *P. falciparum*, originando os merozoítas (16, 17). Os merozoítas produzidos no fígado rompem os hepatócitos alcançam a corrente sanguínea e são

capazes de infectar os eritrócitos, iniciando a fase eritrocítica do ciclo. Dentro dos eritrócitos, os merozoítas passam por três diferentes estágios: anel, trofozoíta e esquizonte, gerando novos merozoítas, que são liberados após ruptura dessas células (16). Os merozoítas promovem o rompimento dos eritrócitos e, subsequentemente, invadem novos eritrócitos, iniciando outro ciclo de esquizogonia. O tempo de duração de cada ciclo na infecção pelo *P. falciparum* é de 48 horas, podendo desenvolver mais de 20 ciclos de esquizogonia em indivíduos não-imunes (1, 18). Após vários ciclos de esquizogonia, alguns merozoítas diferenciam-se em gametócitos, o estágio sexual do parasita, que é infectivo para os mosquitos (19). No intestino do mosquito, onde a temperatura é mais baixa, os gametas femininos e masculinos emergem das hemáceas infectadas, o que é seguido pela fertilização gerando zigotos. Estes se desenvolvem em oocistos dando início à esporogonia. Quando o oocisto se rompe há liberação de esporozoítas que se deslocam até a glândula salivar, onde se hospedam e de onde são liberados durante o repasto sanguíneo, reiniciando o ciclo.

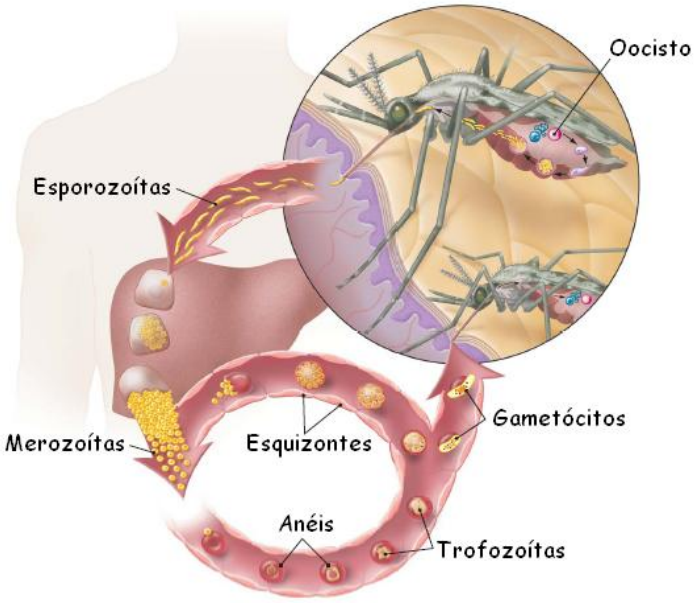

Figura 3: **Ciclo de vida do *P. falciparum*.**
Fonte: Adaptado de (20).

Indivíduos não-imunes à infecção pelo *P. falciparum* apresentam um período de incubação entre a inoculação dos esporozoítas e a detecção da parasitemia e de sintomas que varia entre 5 a 14 dias. O período de incubação pode

variar conforme o nível de imunidade adquirida pelas exposições prévias, tratamentos profiláticos, tratamentos incompletos e estado imunológico do indivíduo (como a idade ou tratamentos com imunossupressores) (18). A imunidade à malária, com presença de parasitas no sangue em níveis baixos e ausência de sintomatologia, pode levar mais de 5 anos para se estabelecer em indivíduos de regiões endêmicas (10, 21). Ao mesmo tempo, indivíduos que se deslocam da área endêmica (22, 23) e retornam à mesma região (24, 25) podem perder a imunidade à malária.

A ruptura dos eritrócitos e a liberação dos merozoítas estão relacionadas com o aparecimento dos sintomas em indivíduos não-imunes. Inicialmente, os sintomas são inespecíficos, com indivíduos apresentando febre, calafrios, taquicardia e cefaléia, ou apresentando sinais como hipoglicemia, acidose, trombocitopenia, hiperbilirrubinemia, altos níves de aminotransferase hepática, esplenomegalia, entre outros. Nos indivíduos não tratados essas manifestações da doença podem progredir para malária cerebral, anemia severa, colapso circulatório, convulsões, edema pulmonar, falência renal aguda e morte (5, 26-29).

Alguns sintomas da malária severa são semelhantes ao da sepse (30), além das evidências de uma resposta imune vigorosa e desordenada. Neste sentido, o TNF auxilia na proteção ao parasita (31), mas concentrações altas no soro de indivíduos estão também associadas ao aumento da severidade da malária e morte (32). Alguns estudos associam a severidade da malária a uma resposta com grandes quantidades de citocinas proinflamatórias, incluindo TNF (do inglês *Tumor necrosis factor*), IL (do inglês *Interleukin*)-1β, IL-6, IL-12, IL-8 e IFN (do inglês *Interferon*)-γ (33), assim como as quimiocinas CCL3 (MIP – do inglês *Macrophage Inflammatory Protein*)-1α e CCL4 (MIP-1β) (34). Estudos indicam que algumas citocinas podem estar associadas com diferentes manifestações clínicas (35). A anemia presente na malária severa estaria associada com respostas com níveis baixos de IL-10 (36), já a disfunção respiratória estaria associada com níveis anormalmente altos de IL-10 (37).

A resposta imune frente à infecção pelo *P. falciparum* tem início com a resposta aos esporozoítas mediada principalmente pelos linfócitos T $CD8^+$ efetores produtores de IFN-γ, que atuam nos parasitas que estão infectando os hepatócitos,

e também pelos anticorpos que reconhecem os esporozoítas (38-41). Citocinas, como IFN-γ e IL-12, e outros fatores incluindo o óxido nítrico (NO – do inglês *Nitric Oxide*) também são descritos como importantes na proteção contra o estágio pré-eritrocítico da malária (39, 41-46).

Indivíduos que desenvolveram proteção contra a infecção pelo *P. falciparum* apresentam mecanismos efetores mediados por IL-12 e IFN-γ, mas não por IL-4 e IL-10, intensa ativação e proliferação de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ e indução de concentrações altas de NO sintetase em atividade nas células mononucleares do sangue periférico (47). As células NK (do inglês *Natural Killer*) são capazes de produzir IFN-γ em reposta à infecção pelo *P. falciparum* de maneira dependente do contato com as DCs (do inglês Dendritic Cells) mielóides e de sinais mediados por citocinas, IFN-γ, IL-2 e IL-18, oriundas destas células (48-50).

A resposta humoral é de suma importância para o controle da fase eritrocítica do ciclo uma vez que as moléculas de classe I e II do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC – do inglês *Major Histocompatibily Complex*) estão ausentes na superfície dos eritrócitos infectados. Assim, na fase eritrocítica da infecção, os mecanismos efetores humorais do sistema imune atuam especialmente quando os merozoítas são liberados durante o rompimento dos eritrócitos, ou ainda, através do reconhecimento de antígenos variáveis codificados pelo parasita e que passam a ser expressos na superfície dos eritrócitos (51-53).

1.3 A Resposta Imune no Baço durante a Infecção pelo *P. chabaudi*

O modelo de infecção murina pelo *P. chabaudi* utilizando camundongos C57BL/6 apresenta níveis altos de parasitemia (40-60% dos eritrócitos infectados) na fase aguda da doença. A infecção com parasitas da cepa AS é frequentemente de extensão limitada, apresentando uma fase crônica com níveis baixos de parasitemia que se inicia ao redor de 2 semanas e permanece por 2 a 3 meses. Os camundongos são capazes de estabelecer uma resposta imune eficiente após apenas uma ou duas infecções (54-57). Já, a infecção com parasitas da cepa AJ é comparativamente mais letal, observando-se uma parasitemia

acentuada que em muitos casos leva o animal à morte (58). Ainda assim, mesmo nesse caso, dependendo do inóculo do parasita, da linhagem e idade do camundongo, a parasitemia aguda pode ser controlada permitindo o desenvolvimento de imunidade.

Durante a infecção pelo *P. chabaudi*, o controle da fase aguda, ou seja, do primeiro pico de parasitemia, ocorre após uma intensa produção de moléculas efetoras do tipo 1, como IFN-γ e IgG2a, devido à intensa ativação de células T e B (59-62)**.** Esta fase está associada com a esplenomegalia, hipergamaglobulinemia, produção de autoanticorpos e imunossupressão, que são características comuns da malária humana e murina (60, 63-70).

Muitos trabalhos evidenciam a importância dos mecanismos da imunidade inata para a proteção contra o *P. chabaudi*. A ausência das células NK promove um aumento no primeiro pico de parasitemia na fase aguda da infecção e um pico recrudescente de parasitemia mais elevado durante a fase crônica (71, 72). A citoxicidade induzida pelas células NK e a produção de IFN-γ são induzidas na infecção pelo *P. chabaudi* (71), sendo que a produção de IFN-γ é essencial para o desenvolvimento de uma imunidade protetora (71, 72). Além disso, a resposta das células NK é dependente de IL-12 (73) e o contato entre as DCs e as células NK contribui para a indução eficiente da ativação das células Th (T auxiliar - do ingles *helper T*) 1 e, consequentemente, da imunidade ao *P. chabaudi* de maneira dependente de IFN-γ (74). A população de linfócitos Tγδ expande durante a infecção pelo *P. chabaudi*, mas estas células não são essenciais para a resolução da infecção, ainda que a sua ausência promova o prolongamento da parasitemia na fase crônica (75).

Os receptores do tipo Toll (TLR - do inglês *Toll-Like Receptors*) potenciam a produção de citocinas pro-inflamatórias na fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*, de maneira dependente da molécula adaptadora MyD88 (do inglês *Myeloid Differentiation Primary-response* Gene *88*) (76), sendo que as DCs de camundongos deficientes em MyD88 produzem menor quantidade de IL-1, IL-6 e IL-12 e promovem menor indução da produção de IFN-γ pelas células T $CD4^+$. No entanto, a ativação celular através de TLRs e MyD88 pode contribuir, mas não é essencial para a imunidade protetora ao *P. chabaudi* (76). Por outro lado, a

imunização utilizando CpG com motivos não-metilados como adjuvante pode aumentar a imunidade induzida pela vacinação contra o *P. chabaudi*, através da estimulação via sinais mediados pelos TLRs (77).

Os linfócitos T $CD4^+$ αβ (78) têm sido implicados no controle inicial da parasitemia, através de mecanismos efetores mediados por uma resposta pró-inflamatória do tipo Th1, com produção de IL-12, IFN-γ e TNF (78-83), absolutamente cruciais para a ativação de células efetoras como macrófagos, que atuam mediando a eliminação dos parasitas, contribuindo diretamente para o controle da parasitemia (84). Este padrão de resposta mudaria para um perfil Th2 (85) com produção de IL-5 e IL-4 após a eliminação dos parasitas (86) (85, 87-89), mas a resposta do tipo Th1 é importante para auxiliar a resposta humoral (90).

Durante a fase crônica da malária, as células T $CD4^+$ e os anticorpos também são necessários para promover a eliminação completa dos parasitas, o que foi mostrado através de infecções de animais desprovidos de linfócitos T $CD4^+$ e B que foram incapazes de eliminar o parasita, apresentando infecção crônica com parasitemias recrudescentes (91, 92). Nosso grupo mostrou ainda que as células T $CD4^+$ de memória, além de auxiliar a produção de anticorpos específicos, atuam na proteção contra a reinfecção pelo *P. chabaudi* através de mecanismos, pelo menos em parte, independente da resposta humoral (86).

Alguns estudos reportam que o baço é o maior local de ativação e diferenciação dos linfócitos B em células plasmáticas durante a infecção pelo *P. chabaudi* (61, 93, 94). Durante a fase aguda da infecção ocorre a expansão das células B ($CD19^+$) (93, 95) e das células B produtoras de anticorpos ($CD19^+$Syndecan-1^+) (93, 95) do baço e o número destas células permanecem significamente altos na fase crônica da infecção, além do aumento do número de células B do centro germinativo que se mantêm mesmo após o primeiro mês de infecção (93).

Os anticorpos de fase aguda também contribuem para limitar a infecção, com predominância de imunoglobulina (Ig)M e IgG2a (59, 60), ainda que a maioria deles possua especificidade não relacionada ao parasita (60, 61, 96-99). E mesmo nessa fase, a produção de IgM seja parcialmente independente das células T, a mudança de classe para IgG2a é T-dependente e requer a coestimulação via

interação entre as moléculas B7-CD28 (60, 100). Estudos confirmam a importância dos anticorpos também na proteção em modelos murinos, pois soros obtidos de camundongos que sobreviveram à infecção pelo *P. chabaudi* podem transferir proteção a recipientes não imunes (54). Cavinato et al. (2001) demonstraram ainda que os anticorpos do tipo IgG2a, produzidos após a ativação decorrente da infecção, apresentam maior atividade protetora, mediando, de forma eficiente, a eliminação dos parasitas tanto através de mecanismos dependentes quanto independentes do reconhecimento da porção Fc (do inglês *Fragment crystallizable*) (101).

Com o curso da doença, ao final da fase aguda da infecção, a maioria dos linfócitos ativados policlonalmente é eliminada por apoptose (97, 102, 103) e uma resposta específica mediada por linfócitos T e B passa a ser estabelecida (54, 78, 101, 104, 105). Embora haja uma escassez de informações a respeito das conseqüências da ativação policlonal dos linfócitos para o desenvolvimento da imunidade adquirida ao *P. chabaudi*, um estudo mostrou que o grau de exposição ao parasita determina a qualidade da resposta imune (106).

Na fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*, a IL-2 é produzida pelas células T $CD4^+$ ativadas, mas não pelas células T_{reg} (107). A neutralização da IL-2 *in vivo* não promove alteração no número de células T $CD4^+$ na fase aguda da infecção. As citocinas IL-2, IL-7 e IL-15 promovem uma maior proliferação *in vitro* das células T $CD4^+$ da fase aguda da infecção (107). Na infecção pelo *P. chabaudi adami*, a expansão e a ativação das células T_{reg} representam uma resposta reguladora que diminui a resposta imune inata e adquirida que estão associadas com a infecção letal (108).

1.4 O Papel das Células T e B Não-convencionais na Imunidade ao *P. chabaudi*

As populações de células T não-convencionais, compostas por células T restritas por CD1d (NKT – do inglês *Natural Killer T cells*), células T γδ (podem ser restritas pelas moléculas T10/T22, MICA/MICB) e células T restritas por outros elementos, como as moléculas de classe Ib do MHC, Qa-1 (correspondente ao

HLA-E dos humanos – do inglês *Human Leukocyte Antigen-E*) e H2-M3 (do inglês *Histocompatibility 2, M region locus 3*), não parecem ser essenciais para o controle da parasitemia durante a infecção pelo *P. chabaudi*, mas contribuem para a resposta imune ao parasita. Assim, o trabalho de Cigel et al. (2003) mostra que as células T não-convencionais não são capazes de controlar a parasitemia na fase aguda e crônica de infecção pelo *P. chabaudi adami* 556KA (cepa não-letal). Ao contrário, esses autores evidenciaram níveis altos de parasitemia em camundongos deficientes na apresentação dos antígenos protéicos via moléculas de classe II do MHC, pela ausência das cadeias β ou invariante, comparados aos camundongos WT (109).

Apesar do grande número de trabalhos utilizando o modelo de infecção pelo *P. chabaudi*, ainda não foi esclarecido qual o papel das células NKT do baço na geração de uma resposta imune contra a infecção. Portanto, é essencial descrever alguns trabalhos que estudaram o papel das células NKT no baço, e também no fígado, de camundongos infectados por outras espécies de *Plasmodium*, *P. berghei* e *P. yoelii*, para nos auxiliar na compreensão do papel destas células.

Quanto ao fenótipo, muitos dos linfócitos T restritos por CD1d co-expressam CD161 (antígeno NK1.1), uma molécula de superfície usualmente observada em células NK, tendo sido por isso denominados linfócitos NKT. No entanto, os linfócitos T $CD3^{+}NK1.1^{+}$ são bastante heterogêneos e muitos deles são restritos por outros elementos, tais como as moléculas de classe I e II, Qa-1 e H2-M3 do MHC (110, 111). Vale ressaltar ainda que, após a ativação, a expressão de NK1.1 pode ser aumentada em linfócitos T convencionais (112, 113) e diminuída em linfócitos T restritos por CD1d (114, 115). As proteínas CD1 assemelham-se estruturalmente às moléculas de classe I do MHC, no entanto, enquanto as últimas associam-se a peptídeos, as moléculas CD1 ligam-se a lipídios. Uma parcela relevante dos linfócitos T restritos por CD1d possui a cadeia α do receptor de células T (TCR – do inglês *T Cell Receptor*) invariante. Em camundongos, o segmento gênico Vα14 está rearranjado na configuração da linhagem germinativa com Jα18, e este Vα14Jα18 TCRα está pareado predominantemente com cadeias de TCRβ que utilizam os segmentos gênicos Vβ8, Vβ7 e Vβ2 (116-118). Tanto no homem como em camundongos, a maioria dos linfócitos T restritos por CD1d que possuem o

TCRα invariante reconhecem α-GalactosilCeramida (α-GalCer – do inglês *α-GalactosylCeramide*) (119).

O trabalho de Schofield et al. (1999) foi o primeiro estudo que mostra o envolvimento das células NKT na imunidade protetora frente a malária, onde os dados nos levam a acreditar que a produção de anticorpos contra antígenos ancorados na superfície através de glicosilfosfatidilinositol (GPI – do inglês *glycosylphosphatidylinositol*) podem ser gerados de maneira dependente da apresentação via CD1d, uma vez que camundongos deficientes em CD1d apresentavam respostas reduzidas de anticorpos frente à proteína circumsporozoíta (CSP - do inglês *circunsporozoite protein*) do *P. berghei* (120). Em 2003, o grupo de Schofield mostrou que camundongos deficientes em CD1d ($CD1d^{-/-}$) apresentavam respostas reduzidas de anticorpos IgG frente à proteína da superfície do merozoíta 1 (MSP-1 – do inglês *Merozoite Surface protein-1*) ancoradas através de GPI quando comparados aos camundongos selvagens (WT – do inglês *Wild Type*), em tempos precoces da infecção pelo *P. berghei* (121). Além do mais, camundongos deficientes em moléculas de classe II do MHC infectados por *P. berghei* também foram capazes de gerar IgG anti-MSP-1 (121), sugerindo que a resposta de produção de anticorpos contra proteínas ancoradas por GPI ocorreria de maneira dependente e independente de moléculas de classe II do MHC.

No entanto, estes resultados não foram confirmados em outros estudos, nos quais camundongos $CD1d^{-/-}$ imunizados com esporozoítas irradiados de *P. berghei* foram capazes de produzir anticorpos anti-CSP de *P. berghei*, ao mesmo tempo que camundongos deficientes em moléculas de classe II do MHC não produziram níveis detectáveis de IgG anti-CSP (122). Além disso, camundongos deficientes em CD1d foram capazes de montar uma resposta protetora eficiente frente ao estágio pré-eritrocítico do *P. berghei* (123).

Schofield et al. (1999), no modelo de infecção com esporozoítas de *P. berghei*, mostraram que as células $CD4^+$ NKT ($CD4^+NK1.1^+$), purificadas do baço de camundongos deficientes de moléculas de classe II do MHC e de camundongos WT infectados, produzem IL-4 e proliferam em resposta a estimulação *in vitro* com a proteína CS ancorada por GPI purificadas do estágio eritrocítico de *P. falciparum*, de

maneira independente de moléculas de classe II do MHC e restrita pelas moléculas CD1d (120).

No início da fase aguda da infecção com eritrócitos parasitados pelo *P. berghei* ANKA, os esplenócitos de camundongos BALB/c WT e BALB/c CD1d$^{-/-}$ produzem níveis altos de IFN-γ após 3 dias em cultura, estes níveis caem para os camundongos WT no primeiro pico de parasitemia (dia 7 de infecção), mas são mantidos nos camundongos CD1d$^{-/-}$. Neste período, a produção de IL-4 aumenta nos camundongos WT, mas não nos camundongos CD1d$^{-/-}$, estes dados levaram os autores a sugerirem que as células NKT restritas por CD1d auxiliam no desenvolvimento de uma resposta imune Th2 (124). Estes autores também evidenciaram o envolvimento das células NKT restritas por CD1d na esplenomegalia decorrente da infecção pelo *P. berghei* ANKA (124). Outro trabalho do grupo, utilizando camundongos C57BL/6 deficientes para a cadeia do TCR invariante Vα14 (Jα281$^{-/-}$), que não possuem as células NKT Vα14^{+}, evidenciou um atraso na apresentação da doença promovida pelo *P. berghei* ANKA, em relação aos camundongos C57BL/6 WT (121). Mas, neste modelo de infecção, os níveis de parasitemia não foram afetados pela ausência de CD1d ou Jα281.

Na fase aguda da infecção com esporozoítas de *P. yoelii* (cepa não letal – 265BY), há um aumento no número de células CD4^{+} NKT (CD3^{+}NK1.1^{+}) do baço, de maneira independente das moléculas CD1d, estas células expressam níveis altos de TCRβ e CD4 em sua superfície, fenótipo que não é característico de células NKT, além de apresentarem aumento na expressão de NK1.1 durante o primeiro pico de parasitemia, no entanto, somente 5% das células NKT são capazes de reconhecer o tetrâmero CD1d-αGalCer (125). Neste período, as células CD4^{+}NKT do baço são capazes de produzir IFN-γ e TNF-α, uma característica que as diferenciam das células CD4^{+}NKT do fígado, que são capazes de produzir IFN-γ, TNF-α e IL-4 (125). As células NKT (TCRβ^{+}NK1.1^{+}) produtoras de IFN-γ do baço alcançam frequência máxima no dia 5 de infecção e caem a níveis semelhantes aos das células T CD4^{+} nos dias 6 e 7 de infecção e, neste período da infecção (dias 5-7), o número de células NKT IFN-γ^{+} é duas vezes maior em relação ao número nos camundongos não-infectados (126). Além disso, os modelos de infecção pelo *P. yoelii* com cepas não-letais mostram que as células NKT do fígado expandem e são

capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias e auxiliar no perfil da resposta imune gerada durante a infecção.

Na fase aguda da infecção com esporozoítas de *P. yoelii* (cepa não letal 265BY) (127), ocorre a expansão das células $CD4^{-}CD8^{-}$ (DN – Duplo Negativo) NKT (DN $TCR\alpha\beta^{+}NK1.1^{+}$) do fígado, com o fenótipo $CD69^{int}$, $CD62L^{low}$, $CD44^{high}$ e $CD122^{low}$ e ao contrário, ocorre uma redução do número de células $CD4^{+}$NKT ($CD4^{+}TCR\alpha\beta^{+}NK1.1^{+}$) (127). As células $TCR\alpha\beta^{+}NK1.1^{+}$ que expressam níveis intermediários de CD3 e utilizam as cadeias Vβ2 e Vβ7 são selecionadas preferencialmente neste período da infecção, em detrimento das células que utilizam as cadeias Vβ8 (127). A população de células $CD3^{int}$ $NK1.1^{+}$ do fígado possui a capacidade de inibir *in vitro* o desenvolvimento do parasita em hepatócitos, de maneira parcialmente dependente de IFN-γ.

Soulard et al. (2007) mostraram que no fígado o número de células $CD4^{+}$ NKT restritas por CD1d e DN NKT restritas ou não por CD1d aumenta na fase aguda da infecção pelo *P. yoelii* (cepa não letal – 265BY), estas células apresentam fenótipo de células ativadas/memória ($CD69^{+}CD44^{high}CD62L^{-}$) antes da infecção e aumentam a expressão de CD69 durante a infecção (125). Neste período, a maior parte das células $CD4^{+}$ NKT do fígado liga-se ao tetrâmero CD1d-α-GalCer (~69%) e 75% são $V\beta8^{+}$ ou $V\beta7^{+}$. As células DN NKT do fígado são capazes de produzir IFN-γ e TNF-α, mas apenas 26% delas reconhecem o tetrâmero (125).

No início da fase crônica da infecção com esporozoítas de *P. yoelii* 17XNL (cepa não letal) ocorre expansão das células $CD8^{+}NK1.1^{+}$ e DN $NK1.1^{+}$ do fígado, período em que o número de células $CD4^{+}NK1.1^{+}$ diminui (128). A maior parte da população de células $CD3^{+}$ que expande no fígado durante o estágio eritrocítico da infecção pelo *P. yoelii* possui o fenótipo $CD3^{int}NK1.1^{-}$, enquanto as células NKT ($CD3^{int}NK1.1^{+}$) apresentam um pequeno aumento em seu número no fígado de camundongos WT infectados (128). Em outro trabalho do mesmo grupo, mostra que ocorre a expansão das células $CD3^{int}$ DN $NK1.1^{+}$ na fase crônica da infecção pelo *P. yoelii 17XNL* no fígado de camundongos $CD1d^{-/-}$, apesar das células $CD3^{int}NK1.1^{+}$ representarem uma pequena parte da população de células $CD3^{int}$, mas não ocorre a expansão das células $CD3^{int}CD4^{+}NK1.1^{+}$ e $CD3^{int}$ $CD8^{+}NK1.1^{+}$, sugerindo que a ausência das células NKT promoveria o

prolongamento da parasitemia nos camundongos CD1d$^{-/-}$ (129). Ainda neste trabalho, sugeriram que as células TCRαβ^{+}NK1.1^{+} estão associadas a proteção ao *P. yoelii* 17XNL, apesar da maior importância das células TCRαβ^{+}NK1.1^{-} e da proeminente expansão da população de células TCR^{int}NK1.1^{-} no fígado dos camundongos CD1d$^{-/-}$ (129). A transferência da população de células TCRαβ^{int} do fígado de camundongos WT, previamente infectados e que já haviam se recuperado da infecção pelo *P. yoelii*, é capaz de conferir proteção ao *P. yoelii*, mas este resultado não esclarece o papel das células NKT na malária, uma vez que esta população de células é composta por células TCRαβ^{int}NK1.1^{+} e TCRαβ^{int}NK1.1^{-} (128).

O trabalho de Tsuji et al. (1994) foi o primeiro a relatar a participação das células T γδ na resposta imune contra a infecção no modelo murino de malária, estudando a resposta destas células no fígado de camundongos infectados por esporozoítas de *P. yoelii* (130). O trabalho de van der Heyde et al. (1995) descreveu a resposta das células Tγδ no baço de camundongos infectados pelo *P. chabaudi adami* 556ka (cepa não-letal), em que a população de células Tγδ do baço expande durante a infecção (131) e expressa marcadores de ativação CD25, CD44, CD71 e B220 (132). Neste modelo, a eliminação das células Tγδ em camundongos WT (C57BL/6) não altera a expansão das células CD4^{+} e CD8^{+} do baço após 16 dias de infecção, mas não há o controle da parasitemia (131). As células Tγδ precisam das células T CD4^{+} para auxiliar no controle da parasitemia (131). No entanto, a ativação das células Tγδ ocorre de maneira independente das células B e dos anticorpos, pois há a expansão dessa população no baço na fase aguda e crônica da infecção nos camundongos deficientes do segmento gênico J_H (J_HD) (não possuem Igs e são deficientes em células B) (131), além disso, as células Tγδ possuem RNAm para as citocinas IFN-γ, TNF, linfotoxina e IL-10 na fase crônica da infecção (133).

Na infecção pelo *P. chabaudi* AS, a população de células Tγδ expande e produz IFN-γ, em detrimento da produção de IL-4, mas ainda assim, estas células não são capazes de controlar a parasitemia, pois os níveis de parasitemia observados nos camundongos deficientes nas células Tγδ e nos camundongos WT tratados com anticorpos anti-TCRγδ comparados aos camundongos WT são

semelhantes. Durante a infecção em camundongos com células B deficientes (μ-MT) (mutação no exon da cadeia μ da porção transmembrana da IgM) o número de células Tγδ produtoras de IFN-γ é maior que nos camundongos WT infectados, mas quando os camundongos μ-MT não apresentam células Tγδ ocorre um aumento nos níveis de parasitemia na fase crônica da infecção em relação aos camundongos μ-MT (134). Através de mecanismos mediados pelo IFN-γ, as células T γδ poderiam regular as respostas das células Th1 e Th2 e o isótipo dos anticorpos produzidos durante a resposta ao *Plasmodium*. O IFN-γ poderia regular o desenvolvimento das células Th1 e Th2 através da inibição da produção da citocina IL-4 ou aumento da produção de IL-12, que favoreceria a resposta do tipo Th1 e promoveria o aumento na produção de IFN-γ (135, 136).

A população de células T γδ do baço aumenta em 3 vezes na fase crônica da infecção pelo *P. chabaudi adami* 556KA (cepa não-letal) em camundongos deficientes das moléculas de classe II do MHC, sendo que o aumento do número de células T γδ do baço ocorre de maneira semelhante ao observado nos camundongos WT infectados (137). Neste trabalho, as células T não-convencionais não foram capazes de auxiliar as células B a reconhecerem os antígenos do parasita e produzirem os anticorpos IgM e IgG em resposta a infecção

As células B estão inclusas entre as populações celulares do baço que respondem ao parasita. Estas células são ativadas, proliferam e produzem anticorpos durante o início da infecção pelo *P. chabaudi* (61). A interação das células B com células T $CD4^+$ convencionais contribui para a geração de células B de memória após infecção com *P. chabaudi* (138). No entanto, existe pouca informação na literatura sobre o papel dos linfócitos T convencionais e não-convencionais nas modificações das diferentes subpopulações de células B no baço, como as células B da zona marginal (ZM) e as células B foliculares (FO), durante a malária.

As células B ZM residem na porção externa da polpa branca do baço entre a zona marginal e a polpa vermelha e estas células expressam altos níveis de CD21 ($CD21^{high}$), IgM (IgM^{high}) e CD1d ($CD1d^{high}$) e baixos níveis de CD23 ($CD23^{low}$) e IgD (IgD^{low}) e respondem prontamente aos patógenos carregados pelo sangue (139-141). A população de células B ZM é ativada (95) e expande durante os 6

primeiros dias da infecção pelo *P. chabaudi (93, 95)*. No dia 7 de infecção há uma redução no número destas células (93, 95), que correlaciona com a diferenciação das células B em células plasmáticas (95). Sabe-se que as células B ZM têm a capacidade de gerar células plasmáticas secretoras de anticorpos de maneira mais rápida que as células B FO. Esta resposta pode ocorrer de maneira T-independente para vários antígenos carregados pelo sangue (142, 143). Após este período da infecção pelo *P. chabaudi*, as células B ZM recuperam seu número no baço, podendo alcançar níveis significativos na fase crônica da doença (93, 95).

Uma vez que as células B ZM expressam níveis altos de CD21 (receptor de complemento - CR2), a sua ativação na fase inicial da malária poderia facilitar o transporte dos imunocomplexos da circulação para os folículos linfóides, onde estas moléculas podem ser capturadas pelas células dendríticas folículares (FDCs, no inglês *Follicular Dendritic Cell*) e assim os antígenos seriam apresentados para as células B FO (144, 145). As moléculas de CD21 expressas nas células B também interagem com as moléculas CD23 de outras células B e FDCs (146, 147), interligando uma resposta rápida das células B ZM a uma resposta mais tardia que auxiliaria o início da resposta das células B dependente de células T convencionais.

A molécula CD21 auxilia na ativação e proliferação de células B através de sinais transmitidos pelo complexo CD21-CD19 (148), na endocitose de antígenos ligados ao complexo complemento-imunocomplexo que serão processados e apresentados para células T durante a formação e recrutamento destas células para o centro germinativo e seleção das células B específicas aos antígenos durante uma resposta a antígenos dependente de células T e resistência a apoptose (149). Camundongos deficientes para molécula CD21 apresentam níveis menores de anticorpos das subclasses IgG2a e IgG2b, sugerindo a influência desta molécula para a produção de IgG.

A população de células B FO é ativada (95) e expande alcançando um pico máximo entre os dias 4 a 5 de infecção pelo *P. chabaudi* (93, 95, 150) e de maneira diferente das células B ZM, as células B FO não reduzem seu número com o curso da infecção (93, 150). As células B FO, que expressam altos níveis de CD23 ($CD23^{high}$) e baixos níveis de CD21 ($CD21^{low}$), residem principalmente nos folículos dos órgãos linfóides secundários e também recirculam. Estas celulas são

conhecidas por participar de respostas imunes a antígenos protéicos de maneira dependente de células T. Entretanto, as células B FO também ocupam um nicho secundário, recirculando até a medula óssea onde se posicionam em um agregado organizado ao redor dos sinusóides e também podem responder de maneira T-independente aos patógenos carregados pelo sangue (151, 152).

2 OBJETIVOS

Objetivo geral: Avaliar o papel das células T $CD4^+$ convencionais (restritas pelo MHC de classe II) e não-convencionais (restritas pela molécula CD1d, Qa-1 e H2-M3), das células $CD8^+$ e células B na geração da resposta imune durante a fase aguda e crônica da infecção pelo *Plasmodium chabaudi* AS.

Objetivos Específicos

I. **Caracterizar as células T $NK1.1^+$ e $NK1.1^-$ do baço durante a fase aguda da infecção pelo estágio eritrocítico do *P. chabaudi* AS;**

II. **Examinar detalhadamente o papel das células T $CD4^+$ convencionais (restritas pelo MHC de classe II) e não-convencionais (restritas por outras moléculas do MHC tais como CD1d, Qa-1 e H2-M3), das células $CD8^+$ e das células B do baço durante a fase aguda e crônica da infecção pelo estágio eritrocítico do *P. chabaudi* AS**.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Camundongos, Parasita e Infecção

Camundongos C57BL/6 (WT – do inglês *Wild Type*) (originalmente da "*The Jackson Laboratory*"), camundongos *knockouts* para o gene que codifica as moléculas CD1d ($CD1d^{-/-}$) (153) e de classe II do MHC ($I\text{-}A^{b-/-}$) (ABBN12) (154), fornecidos pelo Biotério do Departamento de Imunologia da USP, com 6 a 8 semanas de idade e mantidos em condição "specific pathogen-free". Os camundongos $CD1d^{-/-}$ (155) e $I\text{-}A^{b-/-}$ (154) foram utilizados após nove cruzamentos com camundongos background C57BL/6. *P. chabaudi* AS foi mantido como descrito previamente (78). Os camundongos foram inoculados via intraperitoneal (i.p.) com 10^6 eritrócitos parasitados (EP) por *P. chabaudi* AS. Os camundongos aos dias 30 de infecção foram desafiados com 10^8 EP. As parasitemias foram monitoradas através de esfregaços sanguíneos corados por Giemsa.

3.2 Obtenção e Cultura de Esplenócitos

Os esplenócitos foram obtidos de camundongos controles e infectados, sendo os baços macerados em 5 mL de meio RPMI 1640 (Gibco) com 3% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco). A suspensão de células foi decantada e recuperada em 3 mL de células que foram lavadas por centrifugação (5 minutos, 300 g). A seguir, o sobrenadante foi descartado, os eritrócitos lisados com tampão de hemólise (tampão de lise NH_4Cl) e as células lavadas novamente e ressuspendidas em meio RPMI 1640 com 3% de SFB. Os números de células por baço foram contados em camara de Neubauer (Sigma-Aldrich), a partir dos quais realizamos os experimentos.

Os esplenócitos foram mantidos em cultura em meio RPMI 1640 suplementado com penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), 2-mercaptoetanol (50 µM), L-glutamina (2 mM), piruvato de sódio (1 mM) e 3-10% de SFB inativado (obtidos da Gibco), em estufa a 37 ºC e 5% de CO_2.

3.3 Análise Fenotípica das Células por Citometria de Fluxo

Esplenócitos dos camundongos WT, CD1d$^{-/-}$ e I-A$^{b-/-}$ foram lavados com tampão de marcação (PBS 1X (tampão fosfato, 1% SBF, 0,05% Azida) e incubados com os anticorpos monoclonais (mAb) anti-CD4 (H129.19), CD8 (53-6.7), CD45R–B220 (RA3-6B2), CD161/NK1.1 (PK 136), TCRβ (H57-597)(cadeia β do TCR), CD45R–B220 (RA3-6B2), CD69 (H1.2F3)(antígeno de ativação precoce), CD62L (LECAM-1)(L-selectina), CD45RB (16A), CD44 (Ly24), CD122 (TM-β1) (cadeia β do receptor de IL-2), ,Fas/CD95 (Jo2), FasL/CD95L (MFL3), PD-1/CD279 (J43), PD-L1/CD274 (B7-H1/MIH1), TCRVβ7 (TR310), TCRVβ8 (F23.1), CD21 (7G6), CD23 (B3B4) e CD1d (1B1), conjugados ao isotiocianato fluoresceína (FITC, fluorescein-isothiocyanate), ficoeritrina (PE, phycoerythrin), PE-Cy5 (Cy, cychrome), proteína peridina-clorofil (PerCP, peridin-clorophyll-protein) ou aloficocianina (APC, allophycocyanin) obtidos da PharMingen (San Diego, CA) e com o tetrâmero CD1d-α-GalCer conjugado a fluoresceína PE (La Jolla Institute for Allergy and Immunology, NIH). Logo após a incubação, os esplenócitos foram lavados duas vezes e ressuspendidos em 400 µL de tampão de marcação e analisados por citometria de fluxo usando FACSCalibur-Becton Dickinson e software CellQuest (BD Biosciences).

3.4 Ensaio de Proliferação com CFSE

Esplenócitos (3x10^{7} células) foram incubados com Carboxifluoresceína Diacetato Succinimidil Ester (CFSE – do inglês *Carboxifluorescein Diacetate Succinimidil Este)*) 1 mM (Molecular Probes), como previamente descrito (156), diluído em tampão PBS 1X com 0,1% de BSA, a 37 ºC por 30 minutos. Após a lavagem, os esplenócitos CFSE^{+} (1x10^{6} células) foram colocados em cultura em microplacas de 96 poços (Costar) na presença ou ausência de EP (3 x 10^{6}) ou de anticorpos anti-CD3 aderidos à placa (5 µg/mL), a 37 ºC e 5% CO_2 por 72 horas. Para a proliferação com bloqueio da ligação às moléculas de classe II do MHC foi utilizado mAb anti-I-A^{b} (AF6-120.1) e IgG2a como controle isotípico (G155-178), com concentração de 2,5

µg/mL. Após as 72 horas, foi realizada a marcação extracelular com os anticorpos anti-CD4 (H129.19), CD8 (53-6.7) e CD161/NK1.1 (PK 136) (PharMingen). As amostras foram analisadas em FACS Calibur-Becton Dickinson.

3.5 Detecção Intracelular de Citocinas

Esplenócitos (10^6 células/poço) foram colocados em cultura na presença ou ausência de anticorpos anti-CD3 (5 µg/mL) e anti-CD28 (5 µg/mL) aderidos à placa, overnight em meio contendo Stop Golgi (PharMingen) e mantidos por 12 horas a 37 ºC e 5% de CO_2. Após a estimulação, foi realizada a marcação extracelular com os anticorpos anti-CD4 (H129.19), CD8 (53-6.7) e CD161/NK1.1(PK 136) (PharMingen). A seguir, os esplenócitos foram fixados com tampão Cytofix/Cytoperm (PharMingen) e permeabilizados com PermWash (PharMingen). Os esplenócitos foram marcados internamente com os mAbs anti-IFN-γ (XMG1.2) e TNF-α (MP6-XT22), marcados com fluorocromos (PharMingen). As amostras foram analisadas em FACSCalibur-Becton Dickinson.

3.6 Ensaio de CBA para Análise de Citocinas em Sobrenadantes

IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4 e IL-5 foram quantificados simultaneamente através do Kit "*Cytometric Bead Array"* (CBA; PharMingen) nos sobrenadantes obtidos das culturas do ensaio de proliferação. Esta técnica usa a citometria de fluxo para medir analitos solúveis através de imunoensaio baseado em partículas e foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. O limite mínimo de detecção para todas as citocinas neste ensaio é de 20 pg/mL.

3.7 Purificação da Subpopulações Celulares

Células $CD4^+$ do baço de camundongos $CD1d^{-/-}$ não-infectados foram purificadas através de seleção magnética positiva utilizando *MACS microBeads,* conforme instrução do fabricante. Em resumo, $2x10^8$ esplenócitos foram incubados com mAb anti-CD4 PE (H129.19) em tampão PBS 1X 0,5% BSA 2 mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA – do inglês *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*) (Invitrogen Life Technologies), por 30 minutos a 4 ºC, lavadas, e incubadas com MicroBeads anti-PE, por 15 minutos a 4 ºC, e após lavagem, as células foram selecionadas através do sistema de colunas *MACS,* coluna *LS* (*Midi MACs*, Miltenyi Biotec). A pureza da fração positiva foi verificada por citometria de fluxo e alcançou entre 85 e 90% de células $CD4^+$.

Para obter células do baço desprovidas de células dendríticas (DCs), esplenócitos de camundongos WT, no dia 4 de infecção e não-infectados, foram purificados através de seleção magnética negativa utilizando *MACS microBeads,* conforme instrução do fabricante. Em resumo, $2x10^8$ esplenócitos foram incubados com microbeads anti-Pan DCS em tampão PBS 1X 0,5% BSA 2mM EDTA, por 30 minutos a 4 ºC, lavadas, e após lavagem, as células foram selecionadas através do sistema de colunas *MACS,* coluna *LS* (*Midi MACs*, Miltenyi Biotec). A pureza da fração negativa foi avaliada por citometria de fluxo e apresentou <0,05% de DCs ($CD11c^+I\text{-}A^{b-/-}$).

3.8 Transferência Adoptiva de Células CD4+ Convencionais

Camundongos WT e $I\text{-}A^{b-/-}$ foram injetados i.p. com células $CD4^+CFSE^+$ ($4x10^6$) obtidas de camundongos $CD1d^{-/-}$. Estes camundongos foram inoculados i.p com 10^6 EP por *P. chabaudi* AS, no mesmo dia da transferência das células. Camundongos não infectados foram utilizados como controles. As células $CD4^+$ restritas por moléculas IA^b que proliferaram *in vivo* ($CD4^+CFSE^{low}$) foram determinadas utilizando-se uma janela de células $CD4^+$. As amostras foram analisadas em FACScalibur-Becton Dickinson.

3.9 Preparação do Extrato de *P. chabaudi* AS

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

3.10 ELISA para Detecção de IgG Parasita-específico

Anticorpos anti-*P. chabaudi* foram quantificados por ELISA (do inglês Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), como descrito previamente em detalhes (101)**.** Em resumo, microplacas de 96 poços (Costar) foram incubadas overnight (4 °C) com extrato total de *P. chabaudi* (8 µg/mL). As placas foram bloqueadas com PBS 1X 1% BSA por 1h. Após a lavagem, foram adicionados 100 µL das amostras de soro (diluídas 1/20 à 1/280) e as placas foram mantidas a temperatura ambiente por 90 minutos. Um soro positivo (soro hiperimune) foi incluído nas placas, diluído da mesma maneira que as amostras. O ensaio foi desenvolvido adicionando anticorpos de cabra anti-IgM, IgG2a e IgG1 de camundongo conjugados à peroxidase (Southern Biotechnology Associates) por 1 hora. Após a lavagem, 100 µL de 3,3',5,5'-TetraMetilBenzidina (TMB) (Zymed) foram adicionados em cada poço. A reação enzimática ocorreu por 15 minutos e foi bloqueada com ácido hidroclórico (1N). Os valores das

absorbâncias foram quantificados em espectrofotômetro Spectra Max 190 (Molecular Devices) com o comprimento de onda 650nm.

3.11 ELISPOT para Células Secretoras de Ig

O ensaio de ELISPOT (ELISA SPOT assay) foi realizado como descrito previamente (61). Foram utilzadas microplacas de 96 poços (Costar), com o anticorpo de ovelha anti-Ig total (10 µg/mL) adsorvido overnight (4 °C). As placas foram bloqueadas com gelatina 1% (Merck) diluída em PBS 1X, por 120 minutos. As células do baço em diluições seriadas (10^6 até 5 x 10^2 células/poço) foram cultivadas em meio RPMI 1640 com 1% SFB, por 6 horas, 37 °C em 5% CO_2. Os “spots” foram revelados adicionando os anticorpos de ovelha anti-IgM, IgG2a ou IgG1 biotinilados e, posteriormente, adicionando a estreptoavidina conjugada à fosfatase alcalina (todos os anticorpos e conjugados são Southern Biotechnology Associates). Foi utilizado como substrato 5-Bromo-Cloro-3-Indolil Fosfato (BCIP – do inglês *5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl phosphate*) (Sigma-Aldrich) diluído em tampão 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP) (Merck). E, a partir das diluições (número de células plaqueadas vs “spots”) e o total do número de esplenócitos plaqueados, o número de células secretoras de Ig por baço foi calculado.

3.12 Análise Estatística

A analise estatística foi realizada utilizando o Mann-Whitney U test e “Tukey’s multiple comparison tests”, através do software GraphPadPRISM 4. As diferenças entre os grupos analisados foram considerados significantes quando $p<0,05$ (5%).

4 RESULTADOS

PARTE I:

4.1 A População de Células T TCRαβ$^+$ NK1.1$^+$ Expande no Baço durante a Fase Aguda da Infecção pelo *P. chabaudi*

Para analisar a resposta das células T na resposta imune frente ao *P. chabaudi* caracterizamos as células T que expressam a molécula NK1.1 no baço de camundongos WT e CD1d$^{-/-}$, controles (dia 0) e infectados (dias 4 e 7) com *P. chabaudi*. Realizamos a marcação externa destas células com os anticorpos anti-CD4, CD8, TCRβ e NK1.1 e analisamos a intensidade de fluorescência destes marcadores.

No dia 7 de infecção, a população de células TCRαβ$^+$NK1.1$^+$ nos camundongos WT é composta por 63% de células CD4$^+$, 33% de células CD8$^+$ e 4% de células CD4$^-$CD8$^-$. O número de células TCRαβ$^+$CD4$^+$NK1.1$^+$ e TCRαβ$^+$CD8$^+$NK1.1$^+$ por baço aumenta no dia 7 de infecção, em relação ao controle, nos camundongos WT e CD1d$^{-/-}$ **(Figura 4)**. No entanto, os camundongos CD1d$^{-/-}$ apresentam valores 2 a 3 vezes inferiores aos dos camundongos WT nos dias 4 e 7 de infecção. No dia 7 de infecção, o número de células TCRαβ$^+$DN NK1.1$^+$ é semelhante ao dos controles nos camundongos WT, mas apresentam valores inferiores nos camundongos CD1d$^{-/-}$

Nos camundongos WT, o número de células TCRαβ$^+$CD4$^+$NK1.1$^-$ e CD8$^+$NK1.1$^-$ aumenta nos dias 4 e 7 de infecção, em relação aos controles. Valores inferiores aos observados nos camundongos WT são encontrados nos camundongos CD1d$^{-/-}$ no dia 4 de infecção. No dia 7 de infecção, nos camundongos CD1d$^{-/-}$, o número de células TCRαβ$^+$CD4$^+$NK1.1$^-$ aumenta, alcançando valores semelhantes ao dos camundongos WT **(Figura 4)**.

A análise comparativa das células T que expressam NK1.1$^+$ em camundongos WT e CD1d$^{-/-}$ sugere um papel importante das moléculas CD1d na expansão das populações de células TCRαβ$^+$CD4$^+$NK1.1$^+$ e TCRαβ$^+$CD8$^+$NK1.1$^+$ durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*.

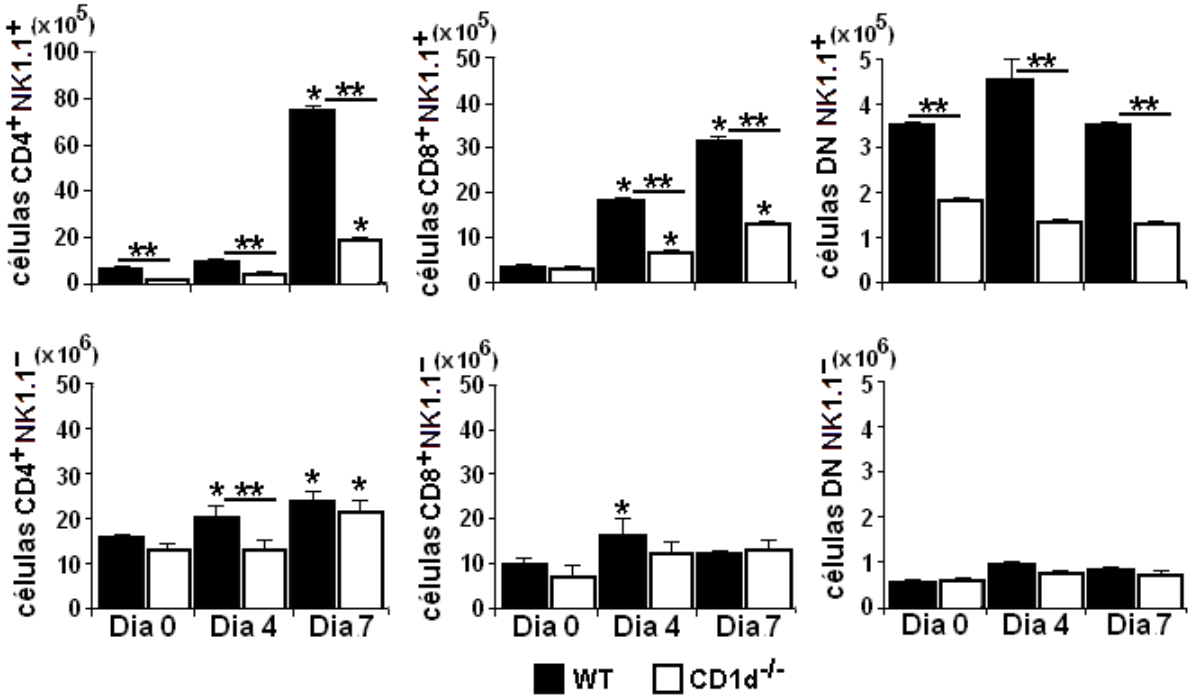

Figura 4: Subpopulações de células T NK1.1$^+$TCRαβ$^+$ e NK1.1$^-$TCRαβ$^+$ no baço de camundongos WT e CD1d$^{-/-}$ infectados pelo *P. chabaudi*. Número de células CD4$^+$TCRαβ$^+$, CD8$^+$TCRαβ$^+$ e CD4$^-$CD8$^-$TCRαβ$^+$ (DN - duplo negativas) por baço que expressam a molécula NK1.1 em camundongos WT e CD1d$^{-/-}$ nos dias 0, 4 e 7 de infecção. As barras representam as médias ± desvio padrão (n = 8).*, p<0,05, camundongos infectados comparados aos camundongos não-infectados. **, p < 0,05, camundongos CD1d$^{-/-}$ comparados aos camundongos WT. Camundongos não-infectados foram usados como controles (dia 0). Os dados são representativos de 4 experimentos realizados separadamente.

4.2 As Células TCRαβ$^+$NK1.1$^+$ do Baço de Camundongos Infectados pelo *P. chabaudi* Não São Predominantemente Células iNKT

Para verificar se a população de células T NK1.1$^+$ geradas durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi* é composta por células NKT invariantes (*i*NKT), analisamos as células T do baço que reconhecem o tetrâmero CD1d-α-GalCer e que expressam as cadeias TCR Vβ7 e Vβ8 em camundongos WT e CD1d$^{-/-}$ controles e no dia 7 de infecção.

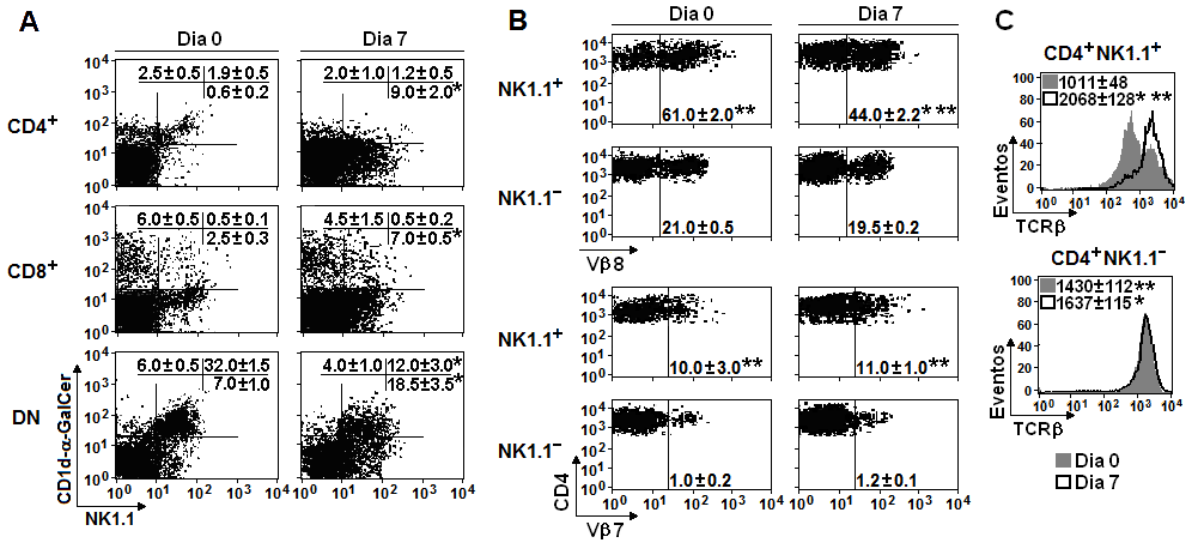

Figura 5. Reconhecimento do tetrâmero CD1d-α-GalCer e expressão das cadeias TCR Vβ7 e Vβ8 pelas células T NK1.1$^+$ e NK1.1$^-$ do baço de camundongos WT infectados pelo *P. chabaudi*. (A) Os *dot plots* mostram as células CD4$^+$TCRαβ$^+$, CD8$^+$TCRαβ$^+$ e CD4$^-$CD8$^-$ TCRαβ$^+$ (DN) que reconhecem o tetrâmero CD1d-α-GalCer e expressam a molécula NK1.1 nos dias 0 e 7 de infecção. Os números nos *dot plots* representam as médias ± desvio padrão (n = 4-6) das porcentagens destas subpopulações. *, p<0,05, camundongos infectados comparados aos camundongos não-infectados. (B) Os *dot plots* mostram as células CD4$^+$NK1.1$^+$TCRαβ$^+$ e CD4$^+$NK1.1$^-$TCRαβ$^+$ que usam as cadeias TCR Vβ7 e Vβ8 nos dias 0 e 7 de infecção. Os números nos *dot plots* representam as médias ± desvio padrão (n = 6-8) das porcentagens de células positivas. *, p<0,05, camundongos infectados comparados aos camundongos não-infectados. **, p<0,05, células NK1.1$^+$ comparadas com as células NK1.1$^-$. (C) Os histogramas mostram a expressão de TCRβ nas células CD4$^+$NK1.1$^+$ e CD4$^+$NK1.1$^-$ dos mesmos grupos de camundongos. Os números nos histogramas representam as médias ± desvio padrão (n = 6-8) da média da intensidade da fluorescência (MFI) na janela das células CD4$^+$NK1.1$^+$ e CD4$^+$NK1.1$^-$. *, p<0,05, células de camundongos infectados comparadas as células dos camundongos não-infectados; **, p<0.05, células NK1.1$^+$ comparadas com as células NK1.1$^-$. Camundongos não-infectados foram usados como controles (dia 0). Os dados são representativos de 3-4 experimentos realizados separadamente.

Nos camundongos WT controles, a maioria das células CD4$^+$NK1.1$^+$TCRαβ$^+$ e CD4$^-$CD8$^-$NK1.1$^+$TCRαβ$^+$ é positiva para o tetrâmero CD1d-α-GalCer, enquanto as células CD8$^+$NK1.1$^+$TCRαβ$^+$ são negativas **(Figura 5A)**. No dia 7 de infecção, foi observado um aumento nas porcentagens de células NK1.1$^+$ que são negativas para o tetrâmero CD1d-α-GalCer para todas as subpopulações de células T, ao mesmo tempo, as frequências de células tetrâmero$^+$ está reduzida. Para as subpopulações de células TCRαβ$^+$NK1.1$^-$, apenas uma pequena fração destas células é positiva para o tetrâmero CD1d-α-GalCer nos camundongos WT controles e no dia 7 de infecção **(Figura 5A)**.

Nós observamos porcentagens altas de células Vβ8$^+$ e Vβ7$^+$ entre as células CD4$^+$NK1.1$^+$ comparadas com as células CD4$^+$NK1.1$^-$ **(Figura 5B)**. No entanto, ocorreu um decréscimo nas frequências de células Vβ8$^+$ entre as células CD4$^+$NK1.1$^+$ e CD4$^+$NK1.1$^-$ após a infecção, contudo, não houve alteração nas frequências das células Vβ7$^+$.

Para avaliar a possibilidade de que a ativação das células *i*NKT promoveria a diminuição da expressão de seus TCR invariantes, nós comparamos a expressão das cadeias TCRβ nas células CD4$^+$NK1.1$^+$ e CD4$^+$NK1.1$^-$. Verificamos que, no dia 7 de infecção, a expressão do TCRβ nas células CD4$^+$NK1.1$^+$ é maior quando comparada a das células CD4$^+$NK1.1$^-$ **(Figura 5C)**. E também, no dia 7 de infecção, a média da intensidade da fluorescência (MFI) da expressão das cadeias TCRβ nas células CD4$^+$NK1.1$^+$ é duas vezes maior comparada com a das células dos camundongos controles. Nossos resultados sugerem que a maioria das céluas TCRαβ$^+$NK1.1$^+$ geradas durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi* não é composta por células *i*NKT.

4.3 A Maioria das Células T NK1.1$^+$ e Parte das Células T NK1.1$^-$ do Baço de Camundongos WT Infectados pelo *P. chabaudi* possuem o Fenótipo de Células Experimentadas/Ativadas

Para caracterizar as células T NK1.1$^+$ e T NK1.1$^-$ de camundongos WT controles e no dia 7 de infecção pelo *P. chabaudi*, as células CD4$^+$ e CD8$^+$ foram avaliadas quanto à expressão de marcadores de superfície altamente expressos em células experimentadas (CD44) ou ativadas (CD69 e CD122).

Nossos resultados mostram que as células T NK1.1$^+$ dos camundongos WT controles e infectados possuem fenótipos similares, caracterizados pela expressão de níveis altos de CD44 e CD69 nas células CD4$^+$NK1.1$^+$ e CD8$^+$NK1.1$^+$ e de CD122 nas células NK1.1$^+$CD8$^+$ **(Figura 6)**. Por outro lado, por volta de 30% das células CD4$^+$NK1.1$^-$ e CD8$^+$NK1.1$^-$ apresentam altos níveis de CD44 e CD69, contudo a molécula CD122 é expressa principalmente nas células CD8$^+$NK1.1$^-$.

Nossos dados sugerem que a maioria das células T NK1.1^{+} e uma parte das células T NK1.1^{-} do baço possuem o fenótipo de células experimentadas/ativadas durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*.

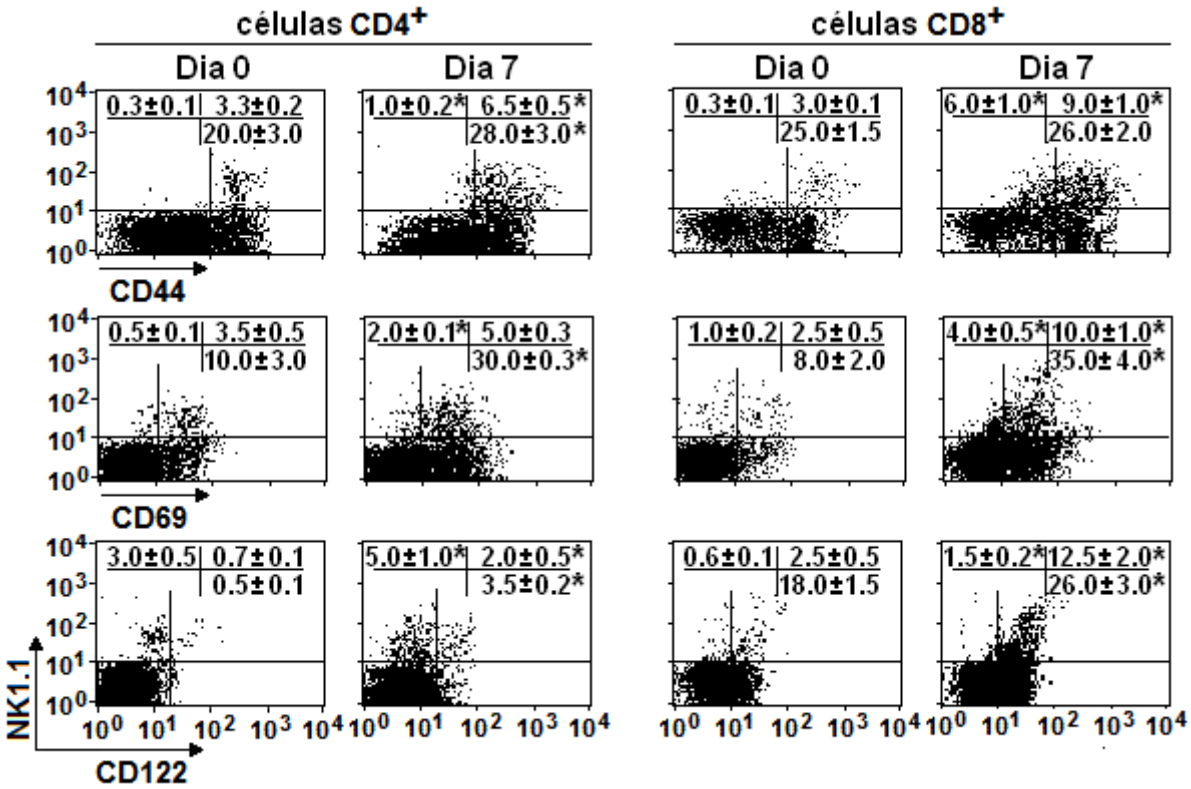

Figura 6: Expressão de CD44, CD69, CD122 e NK1.1 nas células T CD4^{+} e CD8^{+} do baço de camundongos WT infectados pelo *P. chabaudi*. Os camundongos foram analisados nos dias 0 e 7 de infecção. Camundongos não-infectados foram usados como controles (dia 0). Os números nos *dot plots* representam as médias ± desvio padrão (n = 6-8) das porcentagens destas subpopulações na janela das células CD4^{+} e CD8^{+}. *, p<0,05, camundongos infectados comparados aos camundongos não-infectados. Os dados são representativos de 3-4 experimentos realizados separadamente.

4.4 As Células T NK1.1^{+} do Baço de Camundongos WT Infectados pelo *P. chabaudi* Apresentam Baixa Capacidade Proliferativa Comparadas às Células T NK1.1^{-}

Para avaliar a proliferação das células CD4^{+} e CD8^{+} que expressam o marcador NK1.1 no baço de camundongos WT controles e nos dias 4 e 7 de infecção pelo *P. chabaudi*, os esplenócitos foram incubados com CFSE e mantidos em cultura por 72 horas na ausência (proliferação espontânea) ou presença de anticorpos anti-CD3 aderidos à placa (proliferação estimulada). Após a estimulação,

foi realizada a marcação extracelular destas células com os anticorpos anti-CD4, CD8 e NK1.1.

Ao avaliar as porcentagens das células $CD4^{+}CFSE^{low}$, observamos uma consistente proliferação espontânea das células $CD4^{+}NK1.1^{-}$ obtidas no dia 4 de infecção comparadas às células $CD4^{+}NK1.1^{+}$ e aos respectivos controles, após 72 horas em cultura **(Figura 7)**. A estimulação *in vitro* com anticorpos anti-CD3 aderidos à placa resultou no aumento nos valores da proliferação das células $CD4^{+}NK1.1^{-}$ e $CD4^{+}NK1.1^{+}$ nos camundongos controles e no dia 4 de infecção. As células $CD4^{+}NK1.1^{-}$ e $CD4^{+}NK1.1^{+}$ obtidas no dia 7 de infecção não proliferam espontaneamente, e também não recuperam sua capacidade de proliferar quando estimuladas *in vitro* com anticorpos anti-CD3 aderidos à placa **(Figura 7)**.

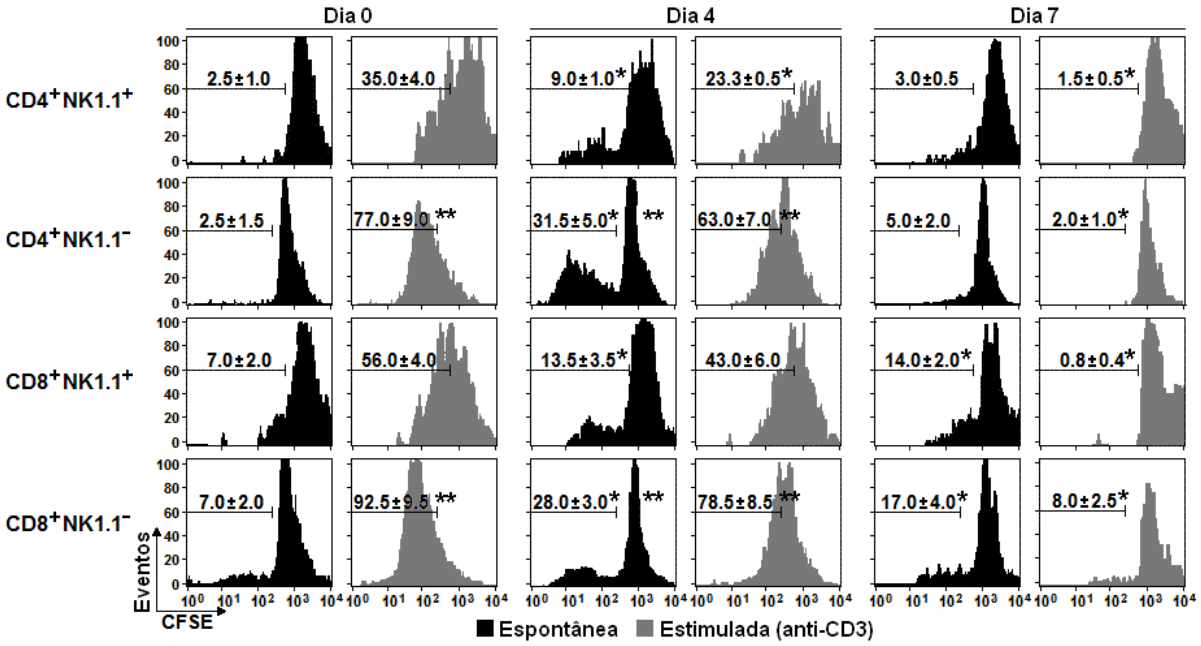

Figura 7: Proliferação das células T $NK1.1^{+}$ e $NK1.1^{-}$ do baço de camundongos WT infectados pelo *P. chabaudi*. Os histogramas mostram a proliferação *in vitro* das células do baço marcadas com CFSE nos dias 0, 4 e 7 de infecção. As células foram mantidas em cultura por 72 horas sem estímulo (proliferação espontânea) ou estimuladas com anticorpos anti-CD3 aderidos a placa (proliferação estimulada). Os números nos histogramas representam as médias ± desvio padrão (n = 8) das frequências das células que proliferaram ($CFSE^{low}$) com janela nas células $CD4^{+}NK1.1^{+}$, $CD4^{+}NK1.1^{-}$, $CD8^{+}NK1.1^{+}$ e $CD8^{+}NK1.1^{-}$. Camundongos não-infectados foram usados como controles (dia 0). *, $p<0,05$, células de camundongos infectados comparadas as células de camundongos não-infectados; **, $p<0,05$, células $NK1.1^{+}$ comparadas com as células $NK1.1^{-}$. Os dados são representativos de 3 experimentos realizados separadamente.

Ao avaliar as porcentagens das células $CD8^+CFSE^{low}$ também observamos uma consistente proliferação espontânea das células $CD8^+NK1.1^-$ obtidas no dia 4 de infecção, após 72h em cultura, e uma proliferação espontânea menor das células $CD8^+NK1.1^+$ **(Figura 7)**. A estimulação das células $CD8^+NK1.1^-$ e $CD8^+NK1.1^+$ *in vitro* com anticorpos anti-CD3 promoveu o aumento nos valores da proliferação nos camundongos WT controles e no dia 4 de infecção. As células $CD8^+NK1.1^+$ obtidas no dia 7 de infecção mantiveram sua capacidade proliferativa espontânea mas quando estimuladas *in vitro* com anticorpos anti-CD3 observa-se uma redução destes valores **(Figura 7)**.

A comparação da resposta proliferativa das células T $NK1.1^+$ e $NK1.1^-$ mostra que em camundongos controles a maioria das células T $NK1.1^-$ apresenta apenas um ciclo de divisão celular espontânea nas condições utilizadas para a cultura, enquanto as células $NK1.1^+$ não apresentam divisão celular espontânea. Para as células do dia 4 de infecção, por volta de 30% das células T $NK1.1^-$ apresentaram a capacidade de realizar ciclos adicionais de proliferação espontânea, enquanto a maioria das células $NK1.1^+$ não apresentaram ou tiveram apenas uma divisão celular. No dia 7 de infecção, a proliferação espontânea mostra-se semelhante aos controles, com exceção das células $CD8^+NK1.1^+$ que exibem dois picos distintos apresentando entre 0-1 ou 1-2 ciclos de divisão. Quando estimulamos com anticorpos anti-CD3, uma intensa resposta proliferativa é observada no dia 0 e esta progressivamente decai após uma semana de infecção, sendo que as células T $NK1.1^+$ sempre apresentam baixos níveis de proliferação comparadas com as células T $NK1.1^-$ **(Figura 7)**.

Nossos dados mostram que as células T $NK1.1^+$ do baço geradas durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi* possuem baixa capacidade proliferativa comparadas com as células T $NK1.1^-$. E também indicam que a proliferação das células T é cuidadosamente regulada após uma semana de infecção quando a população de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ possuem uma resposta reduzida à estimulação via TCR.

4.5 As Células T NK1.1$^+$ de Camundongos WT Infectados pelo *P. chabaudi* Expressam Níveis Altos das Moléculas Fas, Fas-L, PD-1 e PD-L1 Comparadas com às Células T NK1.1$^-$

A sinalização pelas moléculas Fas/Fas-L (CD95-CD95L) e *Programmed Death-1* (PD-1)/ *Programmed Death Ligand -1* (PD-L1) podem diminuir a proliferação das células T através da morte celular induzida pela ativação (AICD - do inglês - *activation-induced cell death*) ou pela desfosforilação do TCR associada à sinalização pelas quinases, respectivamente (157, 158).

Para avaliar o possível papel destas vias de sinalização envolvidas na regulação da proliferação das células T durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*, determinamos a expressão das moléculas Fas, Fas-L, PD-1 e PD-L1 nas células T NK1.1$^+$ e NK1.1$^-$ do baço dos camundongos WT controles e no dia 7 de infecção.

Nós verificamos níveis mais elevados destas moléculas nas células CD4$^+$NK1.1$^+$ e CD8$^+$NK1.1$^+$ comparadas aos subtipos de células T NK1.1$^-$ nos camundongos controles, com exceção da expressão de Fas nas células CD4$^+$NK1.1$^+$ **(Figura 8)**. Após a infecção, observamos um aumento na expressão de Fas e PD-L1 nas células CD4$^+$NK1.1$^-$ e CD8$^+$NK1.1$^-$, no entanto, não observamos diferença na expressão de Fas-L e PD-1. As células T NK1.1$^+$ dos camundongos WT do dia 7 de infecção apresentam níveis mais altos destas moléculas, com excessão das moléculas PD-L1 nas células CD8$^+$.

De maneira geral, nossos dados mostram que as moléculas Fas, Fas-L, PD-1 e PD-L1 são mais expressas nas subpopulações de células T NK1.1$^+$ do baço. Além disso, as moléculas Fas e PD-L1 são expressas em níveis altos na maioria das células T no dia 7 de infecção.

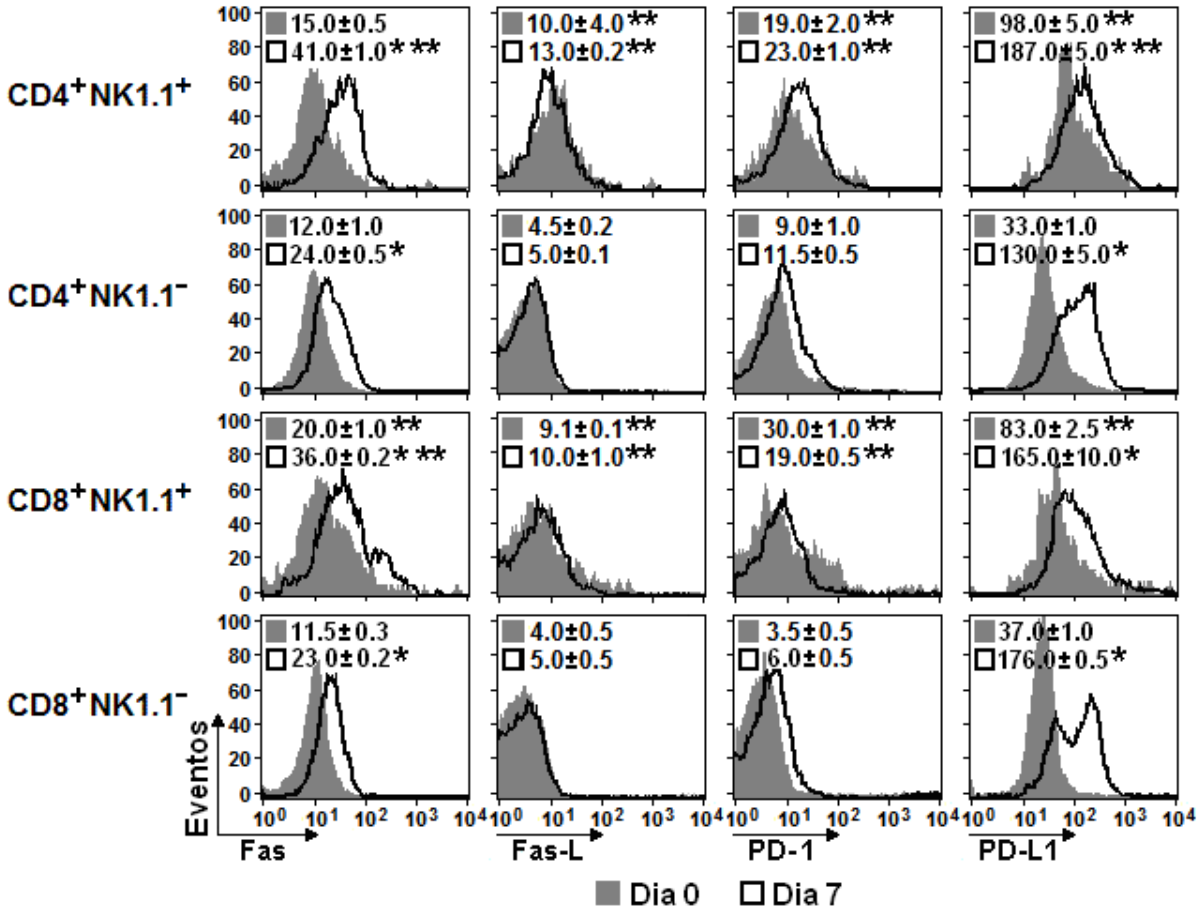

Figura 8: Expressão de Fas, FasL, PD-1 e PD-L1 em células T NK1.1$^+$ e NK1.1$^-$ do baço de camundongos WT infectados pelo *P. chabaudi*. Os histogramas mostram as células T do baço nos dias 0 e 7 de infecção. Os números nos histogramas representam as médias ± desvio padrão (n = 4-6) das médias da intensidade de fluorescência na janela das células CD4$^+$NK1.1$^+$, CD4$^+$NK1.1$^-$, CD8$^+$NK1.1$^+$ e CD8$^+$NK1.1$^-$. Camundongos não-infectados foram usados como controles (dia 0). *, p<0,05, células de camundongos infectados comparadas as células camundongos não-infectados. **, p<0,05, células NK1.1$^+$ comparadas com as células NK1.1$^-$. Os dados são representativos de 3 experimentos realizados separadamente.

4.6 As Células T NK1.1$^+$ e NK1.1$^-$ nos Camundongos WT Infectados pelo *P. chabaudi* Produzem IFN-γ com Cinéticas Diferentes

Para caracterizar o fenótipo das células T NK1.1$^+$ e NK1.1$^-$ geradas durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*, avaliamos a produção de IFN-γ nos camundongos WT controles e nos dias 3, 4 e 5 de infecção e a produção de perforina nos dias 0 (controle) e 7 de infecção, através da marcação externa destas

células com os mAbs anti-CD4, CD8 e NK1.1 e a marcação intracelular com mAbs anti-IFN-γ e perforina.

A análise comparativa da cinética da produção de IFN-γ espontânea e estimulada pelos anticorpos anti-CD3, nas células $CD4^+NK1.1^+$ e $CD4^+NK1.1^-$, mostra um aumento significante no dia 3 de infecção para as células $CD4^+NK1.1^+$ que foram estimuladas comparadas aos controles **(Figura 9A)**. No dia 4 de infecção, a produção espontânea de IFN-γ aumentou de maneira significante nas células $CD4^+NK1.1^+$, considerando que a estimulação com anticorpos anti-CD3 promoveu a produção IFN-γ em uma porção das células $CD4^+NK1.1^+$ e $CD4^+NK1.1^-$. Notavelmente, neste período da infecção, a porcentagens de células IFN-γ^+ são sempre mais altas para as células $CD4^+NK1.1^+$ comparadas com as células $CD4^+NK1.1^-$. No dia 5 de infecção, as porcentagens de células IFN-γ^+ diminuem para as células $CD4^+NK1.1^+$ e aumentam para as células $CD4^+NK1.1^-$ **(Figura 9A)**.

Quando consideramos o número de células $CD4^+$ por baço, nós observamos um aumento em 10 vezes na população de células $CD4^+NK1.1^+$IFN-γ^+ (produção espontânea) no dia 4 de infecção comparadas com as células do controle, número que é mantido em níveis similares no dia 5 de infecção **(Figura 9B)**. Contudo, a população de células $CD4^+NK1.1^-$IFN-γ^+ aumenta em 10 e 25 vezes nos dias 4 e 5 de infecção, respectivamente **(Figura 9B)**. Devido a cinética diferente de produção de IFN-γ, por volta de 30% das células $CD4^+$IFN-γ^+ expressam NK1.1 no dia 4 de infecção, quando esta proporção caiu para quase 15% no dia 5 de infecção.

Para a marcação intracelular de perforina, a porcentagem de células positivas foi significantemente mais alta no dia 7 de infecção, com valores 2 vezes maiores para as células $CD8^+NK1.1^+$ comparadas com as células $CD8^+NK1.1^-$, representando 38% das células $CD8^+$perforina$^+$ **(Figura 9C).** Nossos resultados indicaram uma cinética diferente na produção de IFN-γ pelas células T $NK1.1^+$ e $NK1.1^-$ do baço durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*. Estas subpopulações de células T também diferem na produção de perforina.

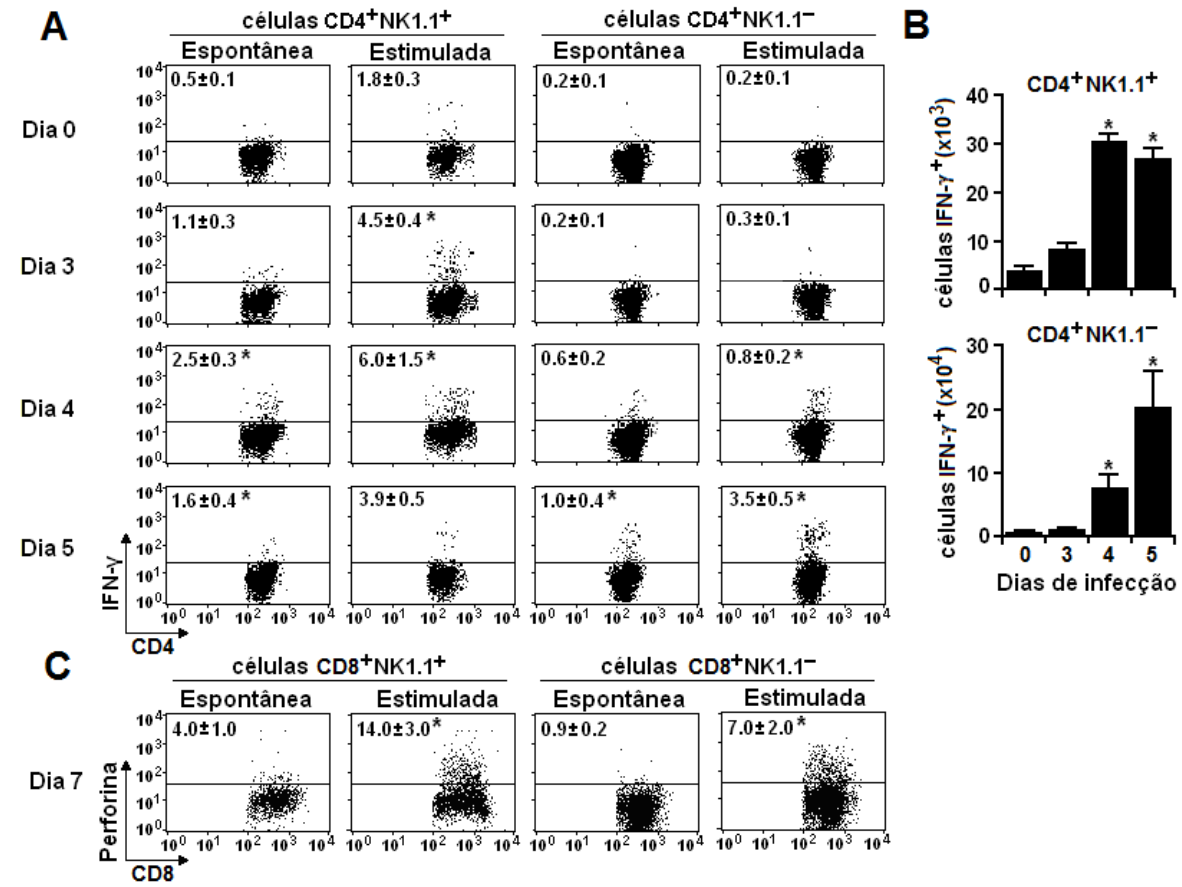

Figura 9: Produção de IFN-γ e perforina pelas células T do baço de camundongos WT infectados pelo *P. chabaudi*. (A) Os *dot plots* mostram as células $CD4^+NK1.1^+$ e $CD4^+NK1.1^-$ marcadas para IFN-γ intracelular em camundongos WT nos dias 0, 3, 4 e 5 de infecção. Os números nos *dot plots* representam as médias ± desvio padrão (n = 4-5) das porcentagens de células IFN-γ. *, $p<0,05$, camundongos infectados comparados aos camundongos não-infectados. (B) Os números de células $CD4^+NK1.1^+IFN\text{-}\gamma^+$ e $CD4^+NK1.1^-IFN\text{-}\gamma^+$ por baço. As barras representam as médias ± desvio padrão (n = 4-5) do número de células $IFN\text{-}\gamma^+$ por baço. *, $p<0,05$, camundongos infectados comparados aos camundongos não-infectados. (C) Os *dot plots* mostram as células $CD8^+NK1.1^+$ e $CD8^+NK1.1^-$ marcadas para perforina intracelular no dia 7 de infecção. Os números nos *dot plots* representam as médias ± desvio padrão (n = 4-5) da porcentagem de células $perforina^+$. *, $p<0,05$, células de camundongos infectados comparadas as células camundongos não-infectados. Em A-C, as células foram mantidas em cultura por 10 h sem estímulo (produção espontânea) ou estimuladas com anticorpos anti-CD3 aderidos à placa (produção estimulada). Camundongos não-infectados foram usados como controles. Os dados são representativos de 3-4 experimentos realizados separadamente.

PARTE II:

4.7 As Células T Restritas por I-A^b são Necessárias para o Controle da Parasitemia durante a Fase Aguda e Crônica da Infecção pelo *P. chabaudi*

Para avaliar o papel das células T restritas por CD1d e I-A^b no controle da infecção pelo *P. chabaudi* AS, foram realizadas análises das parasitemias através do monitoramento de esfregaços sanguíneos de camundongos WT, CD1d$^{-/-}$ e I-Ab$^{-/-}$ infectados com 10^6 EP (**Figura 10**).

Os camundongos WT infectados por *P. chabaudi* apresentaram dois picos de parasitemia, o primeiro pico alcançou valores próximos de 55% de parasitemia no dia 7 de infecção e houve a formação do segundo pico, com valores próximos de 3% de parasitemia nos dias 17 e 18, caindo novamente para valores inferiores a 1% no dia 20, que se mantiveram (**Figura 10**).

Os camundongos CD1d$^{-/-}$ infectados por *P. chabaudi* também apresentaram dois picos, alcançando valores inferiores a 40% de parasitemia no dia 6, com início precoce do segundo pico (entre os dias 13 e 15) quando comparado aos camundongos WT, apresentando parasitemias com valores variando entre 5-12%, os quais diminuíram e se mantiveram em níveis baixos até o dia 30 **(Figura 10)**. Apesar dessas diferenças, os camundongos destes dois grupos controlaram eficientemente a parasitemia e sobreviveram à infecção. Entretanto, os camundongos I-A$^{b-/-}$ apresentaram um aumento significativo no primeiro pico de parasitemia no dia 7 de infecção, além de desenvolver picos recrudescentes de parasitemia, com valores muito altos quando comparados aos camundongos WT. Consequentemente, os camundongos I-A$^{b-/-}$ mostraram-se ineficientes no controle da infecção pelo *P. chabaudi* e apresentaram 50% de morte no período de 30 dias.

Com base nesses resultados, concluímos que o controle da parasitemia durante a fase aguda e crônica da infecção pelo *P. chabaudi* é dependente das células T restritas por I-A^b, e que a contribuição das células T restritas por CD1d é menos importante e restrita ao segundo pico de parasitemia.

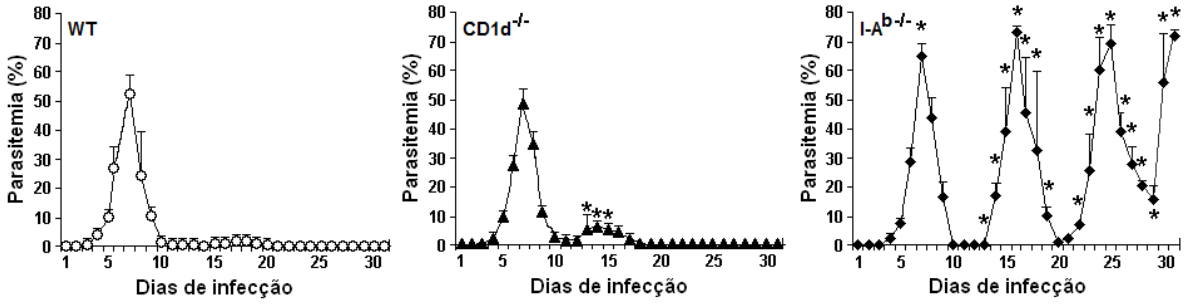

Figura 10: Curva de parasitemia dos camundongos WT, CD1d$^{-/-}$ e I-A$^{b-/-}$ infectados pelo *P. chabaudi*. Os camundongos foram infectados com 1 × 10^6 EP. As curvas correspondem às médias ± desvio padrão (n = 5-10). *, p < 0,05, camundongos CD1d$^{-/-}$ ou I-A$^{b-/-}$ comparados aos camundongos WT. Os dados são representativos de 3 experimentos realizados separadamente.

4.8 A Maioria das Células T CD4$^+$ Ativadas durante a Fase Aguda da Infecção pelo *P. chabaudi* é Restrita pelas Moléculas de Classe II do MHC

Como nossos dados sugerem um papel protetor das células T restritas por I-A^b na fase precoce da infecção pelo *P. chabaudi*, a seguir avaliamos a cinética da resposta das células T CD4$^+$ do baço de camundongos WT, CD1d$^{-/-}$ e I-A$^{b-/-}$ controles (dia 0) e nos dias 4 e 7 de infecção. A grande maioria das células T CD4$^+$ geradas nos camundongos CD1d$^{-/-}$ é restrita pelas moléculas I-A^b (células T CD4$^+$ convencionais), enquanto os camundongos I-A$^{b-/-}$ têm em sua maioria células T CD4$^+$ restritas pelas moléculas CD1d, entre outras moléculas do MHC, como Qa-1 e H2-M3 (células T CD4$^+$ não-convencionais).

O número de linfócitos T CD4$^+$ no baço de camundongos WT aumenta em 1,5 vezes no dia 4 e aumenta em 2 vezes no dia 7 de infecção. Já a ausência das moléculas CD1d promoveu um número total de células T CD4$^+$ menor em camundongos infectados e não infectados **(Figura 11A)**. A população de células CD4$^+$ geradas na ausência de I-A^b também expandiu no dia 7 de infecção, ainda que atingindo valores notavelmente mais baixos quando comparados aos encontrados nos camundongos WT.

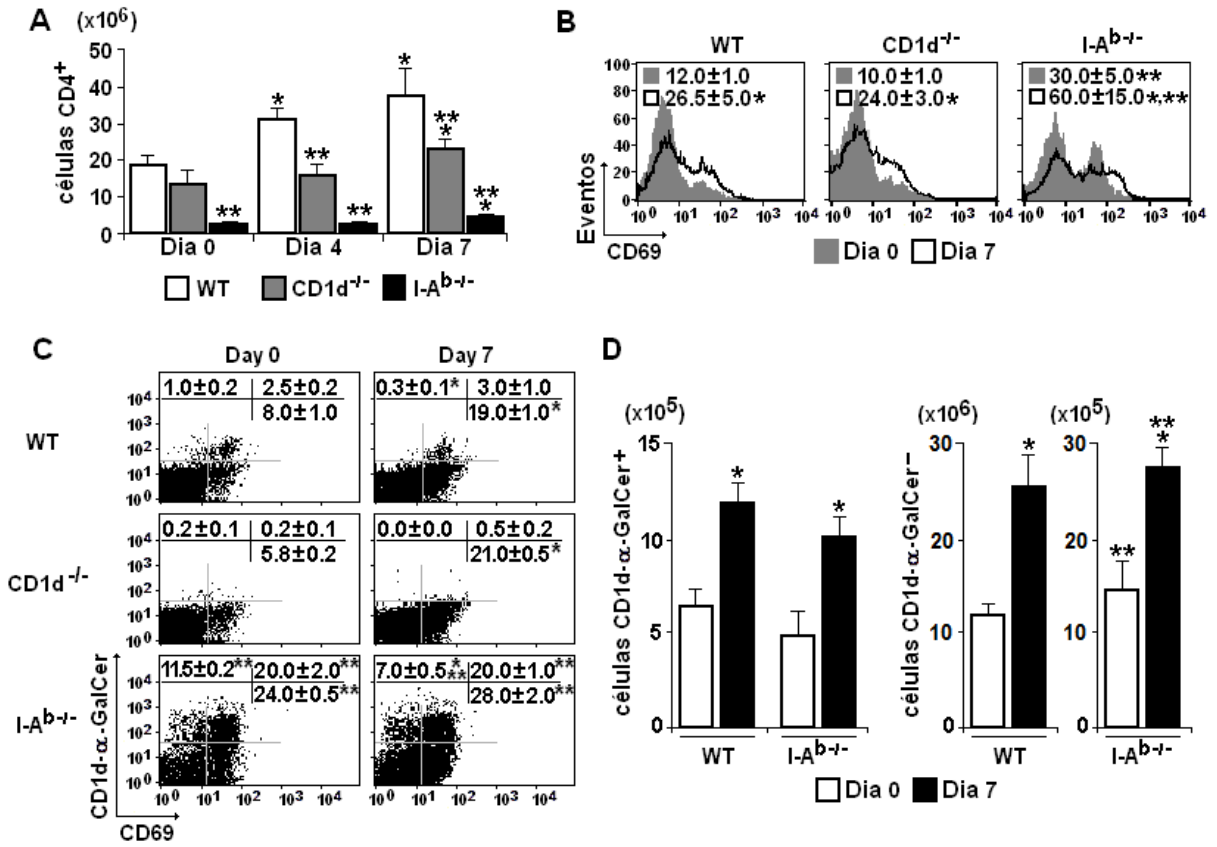

Figura 11: Ativação das células CD4$^+$ do baço de camundongos WT, CD1d$^{-/-}$ e I-A$^{b-/-}$infectados pelo *P. chabaudi*. (A) Número de células CD4$^+$ por baço nos dias 0, 4 e 7 de infecção. As barras representam as médias ± desvio padrão (n = 6-9). (B) Os histogramas mostram a expressão de CD69 na janela das células CD4$^+$ nos dias 0 e 7 de infecção. Os números nos histogramas representam as médias ± desvio padrão (n = 4-6) dos valores das médias da intensidade de fluorescência (MFI). (C) Os *dot plots* mostram as células CD4$^+$ que reconhecem o tetrâmero CD1d-α-GalCer e expressam CD69 nos dias 0 e 7 de infecção. Os números nos dot plots representam as médias ± desvio padrão (n = 4-6) das porcentagens de cada subpopulação. (D) Número das células CD1d-α-GalCer$^+$CD4$^+$ e CD1d-α-GalCer$^-$CD4$^+$ por baço nos dias 0 e 7 de infecção. As barras representam as médias ± desvio padrão (n = 6). Camundongos não-infectados foram usados como controles (dia 0). Em A-D, *, p < 0,05, camundongos infectados comparados com os camundongos não-infectados; **, p < 0,05, camundongos CD1d$^{-/-}$ ou I-A$^{b-/-}$ comparados aos camundongos WT. Os dados são representativos de 3-4 experimentos realizados separadamente.

Para avaliar se as moléculas CD1d e I-A^b são necessárias para as etapas iniciais de ativação das células CD4$^+$, a expressão de CD69 foi analisada no baço de camundongos WT, CD1d$^{-/-}$ e I-A$^{b-/-}$ infectados pelo *P. chabaudi*. As médias de intensidade de fluorescência são significantemente mais altas para as células CD4$^+$ de todos os grupos de camundongos infectados analisados comparados aos controles **(Figura 11B)**. As células CD4$^+$ geradas nos camundongos I-A$^{b-/-}$

apresentam níveis 2 vezes maiores de expressão de CD69 comparados aos de camundongos WT controles, uma característica conhecida das células NKT, estes níveis de expressão aumentam ainda mas com a infecção **(Figura 11B)**.

Realizamos experimentos para caracterizar as células T $CD4^+$ restritas por CD1d ou $I\text{-}A^b$, que reconhecem o tetrâmero CD1d-α-GalCer durante o início da infecção pelo *P. chabaudi*. Verificamos que as células $CD4^+$ que reconhecem o tetrâmero CD1d-α-GalCer nos camundongos WT representam 3,5% e esta porcentagem não é modificada no dia 7 de infecção, $p<0,05$ **(Figura 11C)**. Como esperado, as células $CD4^+$ restritas pelo tetrâmero CD1d-α-GalCer estão ausentes nos camundongos $CD1d^{-/-}$ controles e infectados. Nos camundongos $I\text{-}A^{b-/-}$ a frequência das células $CD4^+$ restritas pelo tetrâmero CD1d-α-GalCer representa 31,5%, confirmando a noção de que a maioria das células geradas nestes camundongos é restrita por CD1d, porém essa frequência não é alterada durante a infecção **(Figura 11C)**. Quando avaliamos o número total de células $CD4^+$ por baço no dia 7 de infecção, observamos um aumento em duas vezes na população de células CD1d-α-$GalCer^+$ e CD1d-α-$GalCer^-$ nos camundongos WT e $I\text{-}A^{b-/-}$, mas observamos um aumento absoluto dez vezes maior no número de células CD1d-α-$GalCer^-$. **(Figura 11D)**.

Nossos dados indicam que as células T $CD4^+$ não-convencionais e convencionais respondem prontamente à infecção pelo *P. chabaudi*, mas a maioria das células T $CD4^+$ ativadas durante a fase aguda da infecção é restrita pelas moléculas de classe II do MHC.

4.9 As Células T $CD4^+$ Restritas por $I\text{-}A^b$ Proliferam Vigorosamente durante a Fase Aguda da Infecção pelo *P. chabaudi*

Como nossos resultados mostram que as populações de células T $CD4^+$ não-convencionais e convencionais do baço aumentam com cinéticas semelhantes durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*, realizamos experimentos para avaliar a resposta proliferativa *in vitro*. Assim, as células T $CD4^+$ do baço de camundongos WT, $CD1d^{-/-}$ e $I\text{-}A^{b-/-}$ controles e infectados com *P.*

chabaudi foram marcadas com CFSE e mantidas em cultura na presença ou ausência de EP por 72 horas.

Ao avaliar as porcentagens das células $CD4^{+}CFSE^{low}$, observamos uma consistente proliferação espontânea das células $CD4^{+}$ obtidas no dia 4 de infecção dos camundongos WT e $CD1d^{-/-}$, que alcançaram respectivamente 8,0% e 15% das células após 72 horas em cultura **(Figura 12A)**. A estimulação *in vitro* com EP resultou no aumento da resposta proliferativa das células dos camundongos WT e $CD1d^{-/-}$, alcançando 35%, que foi significante quando comparado à proliferação espontânea. Uma fração das células $CD4^{+}$ dos camundongos $I\text{-}A^{b\text{-}/\text{-}}$ no dia 4 de infecção também prolifera após o estímulo *in vitro* com EP. Ainda assim, a proliferação espontânea e estimulada é menor que nos camundongos WT e $CD1d^{-/-}$, e não difere dos controles não infectados. As células T $CD4^{+}$ obtidas no dia 7 de infecção dos camundongos WT e $CD1d^{-/-}$ apresentam uma proliferação espontânea e estimulada *in vitro* com EP semelhante à das células dos camundongos não-infectados (controles) destes mesmos grupos **(Figura 12A)**. Estes resultados mostram que as células $CD4^{+}$ convencionais obtidas durante os primeiros dias da infecção são capazes de proliferar vigorosamente em resposta aos eritrócitos infectados, enquanto as células $CD4^{+}$ não-convencionais proliferam em menor grau não diferindo dos controles não infectados.

Para investigar se a intensa resposta proliferativa das células T $CD4^{+}$ do baço do dia 4 de infecção de camundongos WT e $CD1d^{-/-}$ requer a interação com as DCs e com as moléculas de classe II do MHC ($I\text{-}A^{b}$), os esplenócitos totais (controles) e desprovidos de DCs (DCS-depletadas) ou esplenócitos totais e tratados ou não com mAb anti-$I\text{-}A^{b}$ foram marcados com CFSE e mantidos em cultura na presença ou ausência de EP por 72 horas **(Figura 12B)**. Nós observamos uma queda acentuada na proliferação espontânea e estimulada por EP *in vitro* das células $CD4^{+}$ desprovidas de DCs ou tratadas com mAb anti-$I\text{-}A^{b}$ comparadas à proliferação na presença de esplenócitos totais (controles). Estes resultados mostram que a resposta proliferativa espontânea e estimulada *in vitro* das células $CD4^{+}$ durante o início da infecção dependente da interação com as DCs e com as moléculas de classe II do MHC.

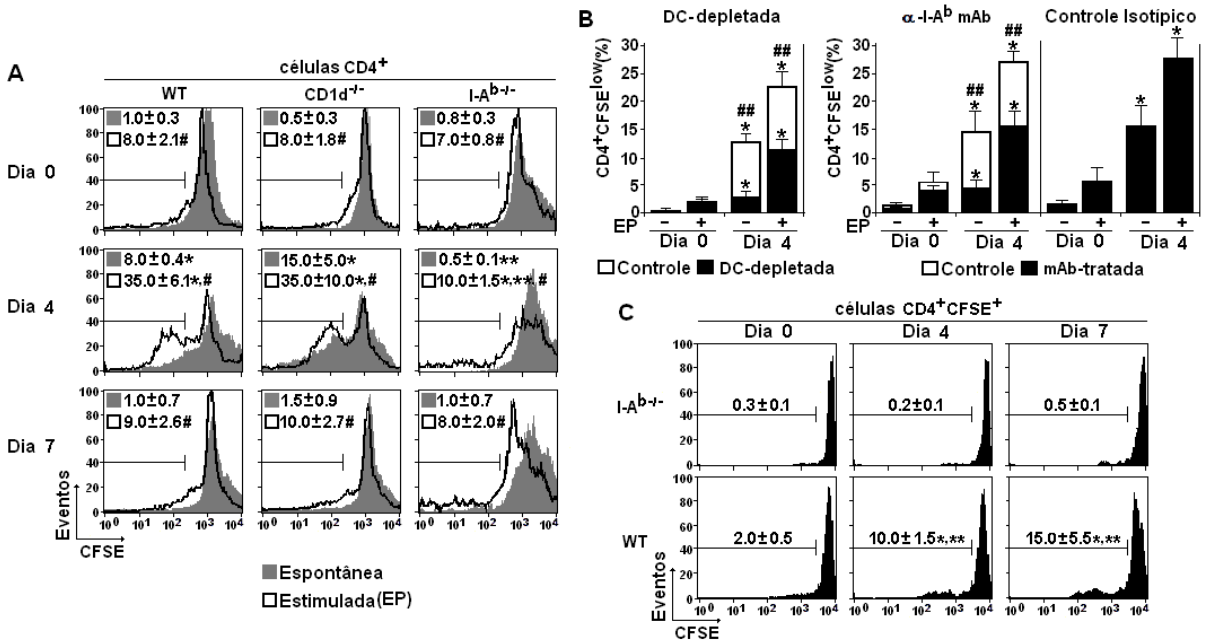

Figura 12: Resposta proliferativa das células CD4$^+$ do baço de camundongos WT, CD1d$^{-/-}$ e I-A$^{b-/-}$ infectados pelo *P. chabaudi*. (A) Os histogramas mostram a proliferação espontânea e estimulada por EP *in vitro* na janela das células CD4$^+$ nos dias 0, 4 e 7 de infecção. Os números nos histogramas representam as médias ± desvio padrão (n = 6-8) das porcentagens das células que proliferaram (CFSE^{low}) (B) Efeito da eliminação das DCs e do tratamento com mAb anti-I-A^b na proliferação *in vitro* na janela das células CD4$^+$ de camundongos WT nos dias 0 e 4 de infecção. As barras representam as médias ± desvio padrão (n = 6) das porcentagens das células que proliferaram (CFSE^{low}). (C) Proliferação *in vivo* das células CD4$^+$ marcadas com CFSE obtidas do baço de camundongos CD1d$^{-/-}$ e transferidas adotivamente em camundongos I-A$^{b-/-}$ e WT nos dias 0, 4 e 7 de infecção. Os números nos histogramas representam as médias ± desvio padrão (n = 6) das células que proliferaram (CFSE^{low}). Camundongos não-infectados foram usados como controles (dia 0). Em A-C, *, $p < 0,05$, camundongos infectados comparados com camundongos não-infectados. Em A e C, **, $p < 0,05$, camundongos CD1d$^{-/-}$ ou I-A$^{b-/-}$ comparados aos camundongos WT. Em A, #, $p < 0,05$, proliferação espontânea comparada com a proliferação estimulada com EP. Em B, ##, $p < 0,05$, cultura de células DCs-depletadas ou mAb-tratadas comparadas com a cultura de células controle. Os dados são representativos de 3-4 experimentos realizados separadamente.

Para ampliar esta análise para o modelo *in vivo* avaliamos como as células CD4$^+$ convencionais proliferam durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*, células CD4$^+$ do baço de camundongos CD1d$^{-/-}$ (que são em sua maioria restritas pelo I-A^b) foram transferidas adotivamente para camundongos WT e I-A$^{b-/-}$ e a proliferação das células CD4$^+$ convencionais (CD4$^+$CD1d$^-$) marcadas com CFSE (CD4$^+$CFSE$^+$) foi analisada nos dias 4 e 7 de infecção pelo *P. chabaudi*. Verificamos que as células CD4$^+$ convencionais proliferam *in vivo* nos camundongos WT infectados, alcançando valores de 10% e 15% das células CD4$^+$ transferidas após 4 e 7 dias de infecção, respectivamente **(Figura 12C)**. No entanto, as células CD4$^+$

convencionais não proliferam nos camundongos I-$A^{b-/-}$ nos dias 4 e 7 após a infecção. As células $CD4^+$ transferidas para os camundongos controles não proliferaram.

Nossos resultados mostram que as células $CD4^+$ convencionais não proliferam *in vivo* na ausência das interações mediadas por moléculas de classe II do MHC durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi.*

4.10 As Células T $CD4^+$ Restritas por I-A^b são a Maior Fonte de Produção de IFN-γ no Baço durante A Fase Aguda da Infecção pelo *P. chabaudi*

Para determinar o grau de colaboração das células T $CD4^+$ não-convencionais e convencionais na produção de citocinas proinflamatórias no baço de camundongos WT, $CD1d^{-/-}$ e I-$A^{b-/-}$ controles e infectados com *P. chabaudi* nos dias 0, 4 e 7, realizamos a marcação externa destas células com os mAbs anti-CD4 e a marcação intracelular de com mAbs IFN-γ e TNF-α. Além disso, analisamos estas citocinas no sobrenadante das culturas de esplenócitos totais após 72 horas.

Para o ensaio de produção *ex vivo* de IFN-γ intracelular, observamos que a máxima produção de IFN-γ ocorre no dia 7 de infecção em todos os grupos de animais, tanto para a produção espontânea quanto para a produção estimulada pelos anticorpos anti-CD3.

No dia 7 de infecção, a porcentagem de células $CD4^+$ produtoras de IFN-γ é 3 vezes maior nos camundongos WT e $CD1d^{-/-}$ comparada com os camundongos I-$A^{b-/-}$ **(Figura 13A)**. Considerando o número total de células por baço no dia 7 de infecção, a quantidade de células $CD4^+$ que produzem IFN-γ espontaneamente são 30 a 15 vezes maiores nos camundongos WT e $CD1d^{-/-}$, respectivamente, comparadas com as células dos camundongos I-$A^{b-/-}$ mice **(Figura 13B)**. No dia 4 de infecção dos camundongos I-$A^{b-/-}$ não se observou aumento na porcentagem de células $CD4^+$ produtoras de IFN-γ (produção espontânea) comparada com as células dos camundongos I-$A^{b-/-}$ não-infectados (controles). Nossos dados indicam que as células T $CD4^+$ não-convencionais contribuem para a

produção de IFN-γ durante o início da infecção pelo *P. chabaudi*, mas as células T $CD4^+$ convencionais são as maiores produtoras desta citocina.

Levando em consideração a proliferação espontânea e promovida por EP *in vitro* avaliamos quais as citocinas estariam sendo produzidas, assim os sobrenadantes das culturas utilizadas para avaliar a proliferação foram testados quanto à presença das citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-4, IL-5 e IL-2.

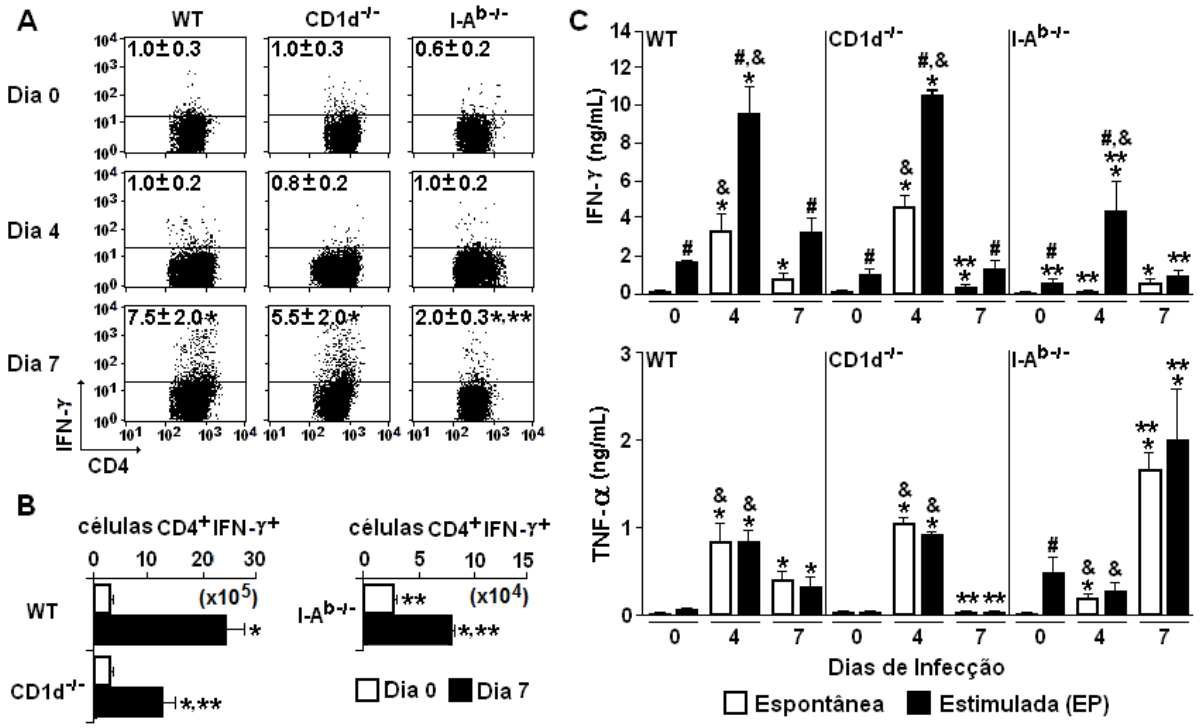

Figura 13: Produção de IFN-γ e TNF-α pelas células do baço de camundongos WT, $CD1d^{-/-}$ e I-$A^{b-/-}$ infectados pelo *P. chabaudi*. (A) Os *dot plots* mostram a marcação intracelular de IFN-γ na janela das células $CD4^+$ nos dias 0, 4 e 7 de infecção. Os números nos *dot plots* representam as médias ± desvio padrão (n = 4-6) das porcentagens das células IFN-$γ^+$. (B) O número de células $CD4^+$IFN-$γ^+$ por baço nos dias 0 e 7 de infecção. As barras representam as médias ± desvio padrão (n = 4-6). (C) Produção de IFN-γ e TNF-α espontânea e estimulada por EP nos sobrenadantes das células do baço cultivadas por 72 horas nos dias 0, 4 e 7 de infecção. As barras representam as médias ± desvio padrão (n = 6-8). Camundongos não-infectados foram usados como controles (dia 0). Em A-C, *, $p < 0,05$, camundongos infectados comparados aos camundongos não-infectados; **, $p < 0,05$, camundongos $CD1d^{-/-}$ ou I-$A^{b-/-}$ comparados aos camundongos WT. Em C, #, $p < 0,05$, produção espontânea comparadas com a produção estimulada com EP; &, $p < 0.05$, células dos camundongos no dia 4 de infecção comparados as células dos camundongos no dia 7 de infecção. Os dados são representativos de 3 experimentos realizados separadamente.

Os camundongos WT e $CD1d^{-/-}$ apresentam níveis altos de produção de IFN-γ e TNF-α espontânea e estimulada por EP no dia 4 de infecção, que decai logo após **(Figura 13C)**. Em contraste, o pico de produção de TNF-α na cultura das

células do baço dos camundongos I-$A^{b-/-}$ ocorre no dia 7 de infecção. No entanto, nos camundongos I-$A^{b-/-}$, a produção de IFN-γ foi detectada somente quando as células do dia 4 de infecção foram estimuladas por EP, ainda assim, os níveis são 2 vezes menores comparadas com as células dos camundongos WT e $CD1d^{-/-}$ do mesmo dia de infecção.

A produção de IFN-γ detectada nos sobrenadantes das células do dia 4 de infecção nos camundongos I-$A^{b-/-}$ pode ser oriunda principalmente das células $CD8^+$, por ser uma importante fonte desta citocina como observado na produção intracelular, mostrada logo a seguir. As citocinas IL-2, IL-4 e IL-5 também foram quantificadas nos mesmos sobrenadantes, mas seus valores estavam abaixo do nível de detecção do método utilizado. Em resumo, na fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*, a produção de IFN-γ e TNF-α pelas células do baço é intensa, ocorre em um curto período de tempo e depende das células T $CD4^+$ convencionais. As células T $CD4^+$ convencionais são a maior fonte IFN-γ e possuem uma cinética de produção desta citocina semelhante à produção de IFN-γ pelas células T $CD4^+$ não-convencionais.

4.11 As Células T $CD4^+$ Convencionais são Necessárias para a Ativação de Células B da Zona Marginal e Foliculares durante a Fase Aguda da Infecção pelo *P. chabaudi*

Para avaliar se as células T $CD4^+$ não-convencionais e convencionais são necessárias para as etapas iniciais de ativação das células B ZM ($CD21^{high}CD23^{low}B220^+$) e FO ($CD21^{low}CD23^{high}B220^+$), a expressão de CD21, CD23, CD69 e CD1d foi analisada nas células B do baço de camundongos WT, $CD1d^{-/-}$ e I-$A^{b-/-}$ infectados pelo *P. chabaudi*.

Nossos dados mostram que a população de células B ($B220^+$) expande menos nos camundongos $CD1d^{-/-}$ e I-$A^{b-/-}$ **(Figura 14A)**. No dia 4 de infecção, há um aumento em 2 vezes no número de células B nos camundongos WT, aumento que não foi observado nos camundongos $CD1d^{-/-}$ e I-$A^{b-/-}$. No dia 7 de infecção, o crescimento no número de linfócitos B é evidenciado nos camundongos $CD1d^{-/-}$ e I-$A^{b-/-}$, mas esses valores ainda são levemente inferiores quando comparados aos dos

camundongos WT. Nossos resultados mostram que as células T $CD4^+$ não-convencionais contribuem, mas não essencialmente, para a expansão das populações de linfócitos B durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*. Estes dados também indicam que uma fração de linfócitos B é capaz de proliferar sem a cooperação das células T $CD4^+$ convencionais, ainda que com menor eficiência

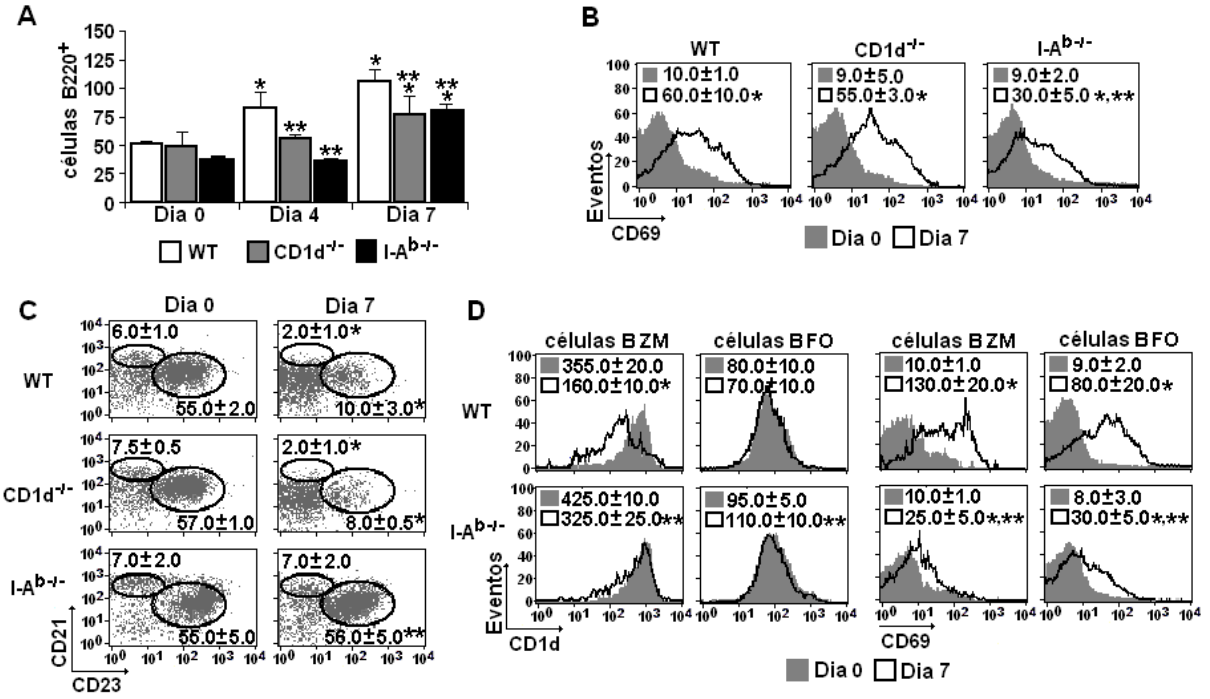

Figura 14: Ativação das células B do baço de camundongos WT, $CD1d^{-/-}$ e $I\text{-}A^{b-/-}$ infectados pelo *P. chabaudi*. (A) Número de células $B220^+$ por baço nos dias 0, 4 e 7 de infecção. As barras representam as médias ± desvio padrão (n = 6-9). (B) Os histogramas mostram a expressão de CD69 na janela de células $B220^+$ nos dias 0 e 7 de infecção. Os números nos histogramas representam as médias ± desvio padrão (n = 4-6) dos valores das médias da intensidade de fluorescência (MFI). (C) Os *dot plots* mostram as células B ZM ($CD21^{high}CD23^{low}B220^+$) e células B FO ($CD21^{low}CD23^{high}B220^+$) nos dias 0 e 7 de infecção. Os números nos *dot plots* representam as médias ± desvio padrão (n = 4-7) das porcentagens de células destas subpopulações. (D) Os histogramas mostram a expressão de CD1d e CD69 na janela de células B ZM e FO nos dias 0 e 7 de infecção. Os números nos histogramas representam as médias ± desvio padrão (n = 4-7) nos valores da MFI. Camundongos não-infectados foram usados como controles (dia 0). Em A-D, *, $p < 0,05$, camundongos infectados comparados aos camundongos não-infectados; **, $p < 0,05$, camundongos $CD1d^{-/-}$ ou $I\text{-}A^{b-/-}$ comparados aos camundongos WT. Os dados são representativos de 3-4 experimentos realizados separadamente.

Esta idéia corrobora a análise da expressão de CD69 nas células B do dia 7 de infecção dos camundongos $I\text{-}A^{b-/-}$, que mostra um baixo, mas significativo aumento nos valores das médias da intensidade da fluorescência (MFI) da

expressão de CD69 comparadas com a das células B do dia 7 de infecção nos camundongos WT e CD1d$^{-/-}$ **(Figura 14B)**.

Avaliamos a expressão de CD69, CD21, CD23 e CD1d das células B ZM e FO do baço em resposta a infecção pelo *P. chabaudi* nos camundongos WT, CD1d$^{-/-}$ e I-A$^{b-/-}$. No dia 7 de infecção, ocorreu uma diminuição na expressão de CD21 nas células B ZM nos camundongos WT e CD1d$^{-/-}$ que resultou em um significante decréscimo no número destas células por baço, fenômeno que não foi observado nos camundongos I-A$^{b-/-}$ **(Figura 14C)**. O mesmo ocorreu para as células B FO, com diminuição da expressão de CD23 e decréscimo do número destas células por baço **(Figura 14C)**.

Nos camundongos WT, uma grande fração das células B FO e MZ expressa altos níveis de CD69 no dia 7 de infecção, mas a expressão de CD69 aumenta com menor intensidade nos camundongos I-A$^{b-/-}$ **(Figura 14D)**. Verificamos que as células B expressam altos níveis de CD1d, sendo mais altos nos camundongos I-A$^{b-/-}$ comparados aos dos camundongos WT **(Figura 11D)**, e que no dia 7 de infecção a expressão de CD1d é reduzida nos camundongos WT mas não nos camundongos I-A$^{b-/-}$. Ao avaliarmos as células B ZM, revelamos níveis superiores de expressão de CD1d nos camundongos I-A$^{b-/-}$, e, também, que ocorre um decréscimo na expressão de CD1d no dia 7 de infecção nos camundongos WT e I-A$^{b-/-}$. Já as células B FO apresentaram níveis inferiores de expressão de CD1d quando comparadas às células B ZM e não apresentaram decréscimo nos níveis de expressão de CD1d durante a infecção para os camundongos WT e I-A$^{b-/-}$ **(Figura 14D)**.

Concluímos que as células T CD4^{+} não-convencionais e convencionais contribuem para a expansão da população de células B do baço durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*, mas as células T CD4^{+} convencionais são essenciais para a ativação completa e modificações fenotípicas das células B FO e MZ.

4.12 A Produção de Ig Policlonal e Específica ao Parasita durante a Fase Aguda e Crônica da Infecção pelo *P. chabaudi* Depende das Células T CD4+ Restritas por I-A^b

Para analisar a participação das células T CD4$^+$ não-convencionais e convencionais na produção de anticorpos policlonais e específicos ao parasita durante a infecção pelo *P. chabaudi*, realizamos o ensaio de ELISPOT para avaliar o número de células produtoras de IgM, IgG2a e IgG1 no baço e o ensaio de ELISA para avaliar os anticorpos séricos IgM, IgG2a e IgG1 em camundongos WT, CD1d$^{-/-}$ e I-A$^{b-/-}$. Nós observamos que no dia 7 de infecção, o número de células produtoras de IgM, IgG2a e IgG1 por baço aumenta de maneira semelhante entre os camundongos WT e CD1d$^{-/-}$, no entanto, nos camundongos I-A$^{b-/-}$ observamos um pequeno aumento no número de células produtoras de IgM **(Figura 15A)**. Neste mesmo período, o nível sérico de anticorpos específicos ao parasita não foi estatisticamente diferente comparados ao dos camundongos não-infectados (dados não mostrados).

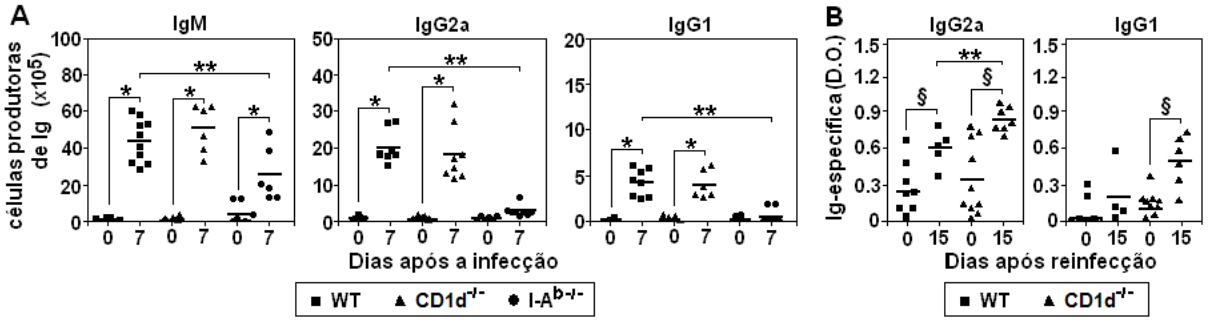

Figura 15: Produção de anticorpos policlonais e específicos ao parasita em resposta a infecção de camundongos WT, CD1d$^{-/-}$ e I-A$^{b-/-}$ pelo *P. chabaudi*. (A) Número de células produtoras de IgM-, IgG1- e IgG2a por baço nos dias 0 e 7 de infecção. Cada ponto corresponde a um camundongo. As linhas horizontais representam as médias dos números de células produtoras de anticorpos por baço (n = 6-8). (B) Camundongos no dia 30 de infecção foram reinfectados com 1 × 10^8 EP e níveis séricos de anticorpos IgG2a e IgG1 específicos ao parasita foram medidos após 15 dias do desafio. Cada ponto corresponde a um camundongo. As linhas horizontais representam as médias dos valores das D.O. na diluição de 1/50 (n = 5-10). Camundongos não-infectados foram usados como controles (dia 0). Em A, *, $p < 0,05$, camundongos infectados comparados aos camundongos não-infectados; Em A and B, **, $p < 0,05$, camundongos CD1d$^{-/-}$ ou I-A$^{b-/-}$ comparados aos camundongos WT. Em B, §, $p < 0,05$, valores antes do desafio comparados aos valores após o desafio. Dado representado no painel B é diferente estatisticamente daquele não-infectado, com exceção dos valores da D.O. para IgG1 antes do desafio (dia 0). Os dados são representativos de 3-4 experimentos realizados separadamente.

Já no soro de camundongos WT e CD1d$^{-/-}$ no dia 30 de infecção verificamos um aumento semelhante no nível sérico de anticorpos IgG2a específicos ao parasita **(Figura 15B)**. Quando estes grupos de camundongos foram reinfectados com 1 × 10^{8} EP, a produção de anticorpos IgG2a e IgG1específicos ao parasita é mais alta nos camundongos que não possuem as células T CD4^{+} restritas pelo CD1d (não-convencionais).

Nossos resultados indicam que as células T CD4^{+} convencionais possuem um papel central na produção tanto de anticorpos policlonais como na produção de anticorpos específicos ao parasita induzidos pela infecção, sendo que não foi observada a contribuição das células T CD4^{+} não-convencionais.

4.13 A Ativação Precoce das Células T CD4^{+} em Resposta à Infecção pelo *P. chabaudi* É Seguida pelo Desenvolvimento da Imunidade Adquirida

Em nosso estudo, uma porção substancial das células T CD4^{+} convencionais do baço proliferam vigorosamente e produzem altos níveis de IFN-γ e auxiliam as células B da ZM e FO a produzirem Ig policlonal. Esta fase precoce da resposta é de curta duração e mostram cinéticas de produção de IFN-γ pelas células T CD4^{+} convencionais similares às das células T CD4^{+} não-convencionais.

Para avaliar as populações de T CD4^{+} do baço nas diferentes fases da infecção pelo *P. chabaudi* em camundongos WT, analisamos a proliferação espontânea e estimulada por EP, produção de IFN-γ durante o primeiro mês de infecção. Mostramos na **Figura 16A**, que no dia 10 de infecção, os números de células CD4^{+} por baço são reduzidos e alcançam um valor menor que a metade do valor observado para as células nos camundongos WT controles. A normalização desta população ocorre concomitantemente com a segunda onda de proliferação das células CD4^{+} no dia 15 de infecção e decresce logo após.

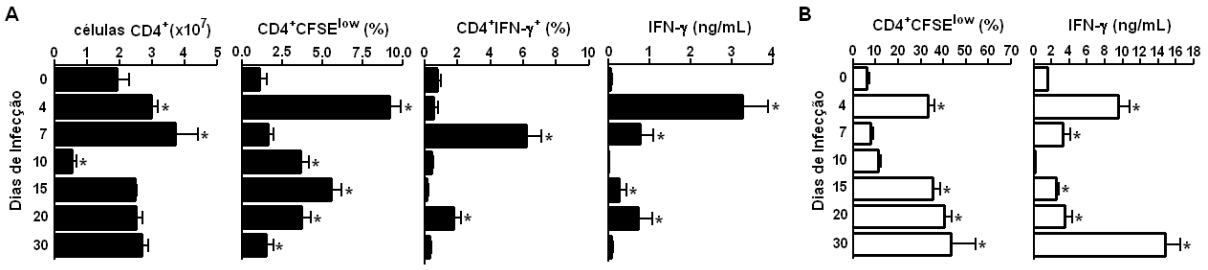

Figura 16: Proliferação espontânea e estimulada por EP das células CD4$^+$ e produção de IFN-γ no baço de camundongos WT durante a fase inicial e tardia da infecção pelo *P. chabaudi*. (A) Número de células CD4$^+$ por baço, proliferação espontânea das células CD4$^+$ e produção de IFN-γ nos dias 0, 4, 7, 10, 15, 20 e 30 de infecção. As barras representam as médias ± desvio padrão (n = 6-10). IFN-γ intracelular e secretado foram quantificados na janela das células CD4$^+$ e nos sobrenadantes das células do baço cultivadas por 72 horas, respectivamente. (B) Proliferação das células CD4$^+$ e produção de IFN-γ estimuladas por EP nos mesmos grupos de camundongos (n = 6-10). A proliferação das células CD4$^+$ foi representada pelas porcentagens de células que proliferaram (CFSE^{low}). Secreção de IFN-γ foi quantificada no sobrenadante das células do baço cultivadas por 72 horas. Camundongos não-infectados foram usados como controles. Em A e B, *, p < 0,05, camundongos infectados comparados aos camundongos não-infectados. Os dados são representativos de 3-4 experimentos realizados separadamente.

A produção espontânea de IFN-γ pelas células totais e também pelas células CD4$^+$ também declina no dia 10 de infecção, embora um pequeno aumento seja observado no dia 20 de infecção concomitantemente com o segundo pico de parasitemia. Quando estimuladas *in vitro* com EP, as células CD4$^+$ mostram uma menor capacidade de proliferar (nos dias 7-10 de infecção) e de produzir IFN-γ (nos dias 7-20 de infecção) **(Figure 16B)**. No entanto, após este período em que as células CD4$^+$ não respondem, uma resposta intensa das células CD4$^+$ foi observada, alcançando seu máximo no dia 30 de infecção.

Nossos dados sugerem que as células T CD4$^+$ respondem ao *P. chabaudi* em duas fases diferentes. A primeira fase ocorre durante a parasitemia aguda, onde rapidamente são gerados altos níveis de células efetoras e que termina abruptamente quando muitas células CD4$^+$ são eliminadas. A segunda fase inicia após a parasitemia aguda ser controlada e origina um grande número de células T CD4$^+$ com capacidade para prontamente proliferar e produzir IFN-γ em resposta ao EP.

PARTE

II - SUPLEMENTAR:

4.14 As Células T CD8$^+$ são Ativadas, Proliferam e Produzem IFN-γ Durante a Fase Aguda da Infecção pelo *P. chabaudi*

O número total de células CD8$^+$ aumenta em duas vezes no baço de camundongos WT no dia 4 de infecção, sendo semelhante no dia 7 de infecção, quando comparado ao dos controles **(Figura 14A)**. As células T CD8$^+$ não necessitam da molécula de I-A^b para aumentar seu número no baço durante a primeira semana da infecção. Mas, assim como para as células T CD4$^+$, a ausência da molécula CD1d prejudica a expansão das células T CD8$^+$ no dia 7 de infecção. E também, observamos o aumento de expressão de CD69 nas células CD8$^+$, ocorrendo uma maior ativação das células CD8$^+$ nos camundongos I-Ab$^{-/-}$ comparados aos WT **(Figura 17B)**.

Ao avaliar a atividade proliferativa das células CD8$^+$CFSE^{low}, também observamos uma consistente proliferação espontânea das células CD8$^+$ obtidas no dia 4 de infecção dos camundongos WT (20%) e CD1d$^{-/-}$ (16%) após 72 horas em cultura, e uma proliferação espontânea menor para as células CD8$^+$ dos camundongos I-A$^{b-/-}$ (4%) **(Figura 17C)**. A estimulação *in vitro* com EP das células CD8$^+$ obtidas no dia 4 de infecção não promoveu o aumento na resposta proliferativa, alcançando 20-25%, nos camundongos WT e CD1d$^{-/-}$, mesmo assim, estes valores foram maiores quando comparados à proliferação nos camundongos I-A$^{b-/-}$. As células CD8$^+$ obtidas no dia 7 de infecção não mantiveram sua capacidade proliferativa mesmo quando estimuladas *in vitro* com EP. Estes resultados mostram que as células CD8$^+$ também são capazes de proliferar em resposta aos EP, mas em menor grau comparadas com as células CD4$^+$ **(Figura 17C)**.

No dia 7 de infecção, a porcentagem de células CD8$^+$IFN-γ$^+$ (8%) nos camundongos WT é significantemente maior que nos camundongos WT controles **(Figura 17D)**. As células CD8$^+$ são capazes de produzir IFN-γ no dia 7 de infecção

nos camundongos WT, CD1d$^{-/-}$ e I-A$^{b-/-}$ de maneira similar **(Figura 17D)**. As células CD8^{+} podem auxiliar na produção de IFN-γ nos sobrenadantes das culturas analisadas no dia 7 de infecção nos camundongos I-A$^{b-/-}$.

Estes resultados mostram que as células CD8^{+} são ativadas, são capazes de proliferar e produzir IFN-γ durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*.

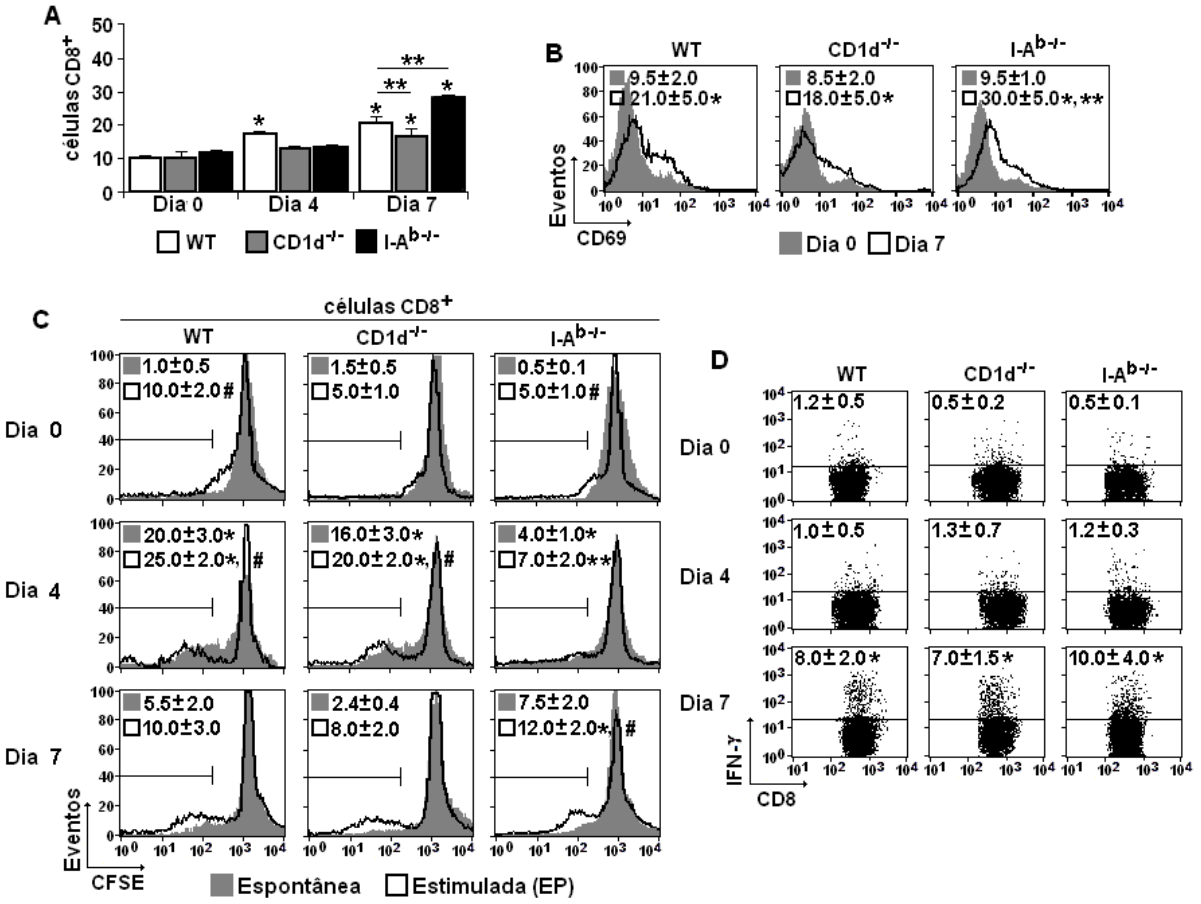

Figura 17: Ativação das células CD8^{+} do baço de camundongos WT, CD1d$^{-/-}$ and I-A$^{b-/-}$ infectados pelo *P. chabaudi*. (A) Número de células CD8^{+} por baço nos dias 0, 4 e 7 de infecção. As barras representam as médias ± desvio padrão (n = 6-9). (B) Os histogramas mostram a expressão de CD69 na janela de células CD8^{+} nos dias 0 e 7 de infecção. Os números nos histogramas representam as médias ± desvio padrão (n = 4-6) dos valores das médias da intensidade de fluorescência(MFI). (C) Os histogramas mostram a proliferação espontânea e estimulada por EP *in vitro* na janela de células CD8^{+} nos dias 0, 4 e 7 de infecção. Os números nos histogramas representam as médias ± desvio padrão (n = 6-8) das porcentagens das células que proliferaram (CFSE^{low}). (D) Os *dot plots* mostram a marcação intracelular de IFN-γ na janela de células CD8^{+} nos dias 0, 4 e 7 de infecção.Os números nos dot plots representam as médias ± desvio padrão (n = 4-6) das porcentagens das células IFN-γ^{+}. *, $p < 0,05$, camundongos infectados comparados com camundongos não-infectados. **, $p < 0,05$, camundongos CD1d$^{-/-}$ ou I-A$^{b-/-}$ comparados aos camundongos WT. #, $p < 0,05$, proliferação espontânea comparada com a proliferação estimulada com EP. Os dados são representativos de 3 experimentos realizados separadamente.

5 DISCUSSÃO

Existem muitos detalhes da resposta imune à malária que são importantes para a compreensão da imunidade protetora, imunopatologia e os requisitos para o desenvolvimento de uma vacinação eficiente. A imunidade protetora ao estágio eritrocítico do *Plasmodium* em modelos murinos e no homem é dependente de células T $CD4^+$, células B e anticorpos. O foco principal deste trabalho é verificar como é o início da resposta das células T $CD4^+$ convencionais e não-convencionais, em comparação com a resposta de memória. Desse modo, nós caracterizamos as células T $NK1.1^+$ e $NK1.1^-$ (Parte I - ANEXO A) e analisamos o papel das células T $CD4^+$ convencionais e T $CD4^+$ não-convencionais e das células B durante a fase aguda da resposta dos linfócitos ao *P. chabaudi*, focando no início da infecção e geração da resposta adquirida. Para tanto utilizamos camundongos $CD1d^{-/-}$, onde uma grande parte das células geradas são restritas pelas moléculas do MHC de classe II, as moléculas $I\text{-}A^b$ (células T $CD4^+$ convencionais) e camundongos $I\text{-}A^{b-/-}$ em que as células T $CD4^+$ geradas são em sua maioria restritas pelas moléculas CD1d (células T $CD4^+$ não-convencionais).

Nosso trabalho sugere dois papéis importantes para as células T $CD4^+$ convencionais durante o estágio eritrocítico do *P. chabaudi*: 1) Iniciam a resposta imune e promovem a ativação de outras células, uma vez que as células T $CD4^+$ convencionais são ativadas precocemente e logo esta ativação se torna intensa com produção de grandes quantidades de IFN-γ e ativação das células B para a produção de anticorpos policlonais, mas ao mesmo tempo, temos a regulação da resposta das células T $CD4^+$ convencionais de maneira muito eficiente; e, 2) Também contribuem para o controle/eliminação do parasita através da geração de células T $CD4^+$ convencionais de memória capazes de promover uma resposta efetora eficiente contra o parasita e auxiliar na produção de anticorpos específicos, como ilustrado na figura 15.

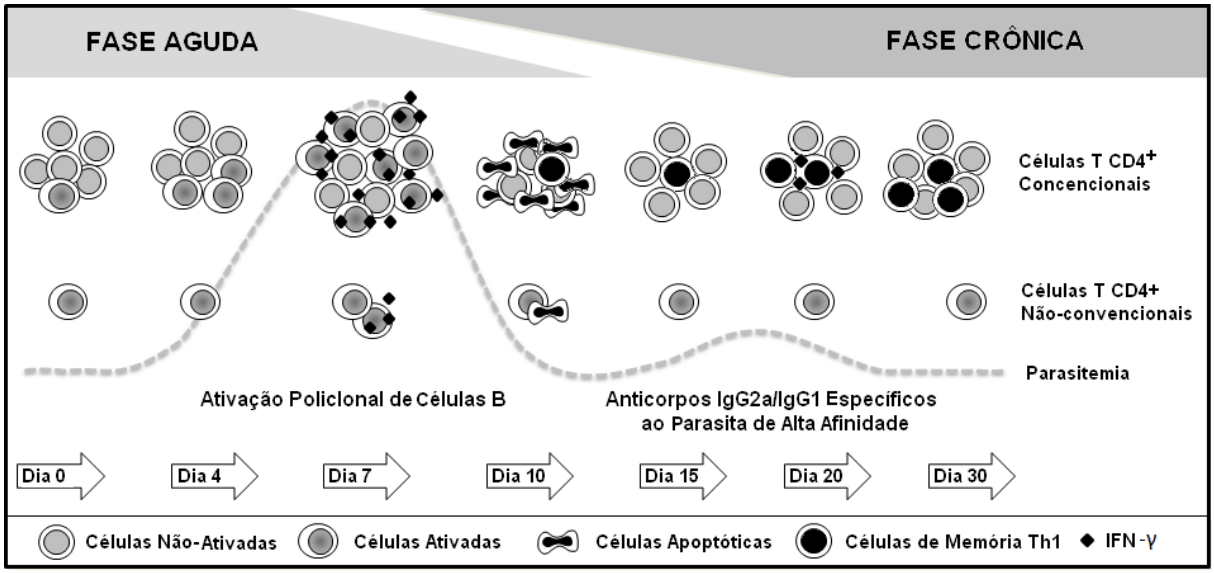

Figura 18: Modelo para a resposta das células T CD4$^+$ do baço durante o estágio eritrocítico da infecção pelo *P. chabaudi*. As células T CD4$^+$ do baço respondem a infecção pelo *P. chabaudi* desenvolvendo duas fases consecutivas concomitantemente com as parasitemias aguda e crônica. A fase precoce da resposta inicia com intensa proliferação de parte das células T CD4$^+$ convencionais, de maneira dependente das DCs e das moléculas de classe II do MHC que resulta na duplicação desta população após uma semana de infecção. A população de células T CD4$^+$ não-convencionais também duplica durante este período, mas sua baixa taxa de proliferação indica que a maioria destas células desenvolve poucos ciclos de divisão celular, ou altenativamente, que elas migrem de outros tecidos. Esta fase da resposta culmina com a alta produção de citocinas proinflamatórias (e também de secreção de Ig policlonais), que em sua maioria depende das células T CD4$^+$ convencionais. A eliminação de parte das T CD4$^+$, juntamente com o período em que estas células tornam-se incapazes de responder a estímulos, dá início ao desenvolvimento da imunidade adquirida durante a fase tardia da resposta. Neste período, parte das T CD4$^+$ são geradas com capacidade para proliferar e produzir IFN-γ prontamente quando estimuladas com EP (e também cooperam com as células B para a produção de anticorpos específicos de alta afinidade pelo parasita). De acordo com este modelo, as células T CD4$^+$ convencionais são as principais protagonistas da resposta no início da infecção, agindo em paralelo com as células T CD4$^+$ não-convencionais e realizando a ligação ente a imunidade inata e adquirida.

Evidenciamos o papel central das células T CD4$^+$ convencionais no controle inicial e tardio da infecção pelo *P. chabaudi* através do fato de que em camundongos que não possuem as moléculas de classe II do MHC, que possuem em sua maioria células T CD4$^+$ não-convencionais, desenvolvem um primeiro pico de parasitemia significantemente mais alto e proeminentes picos recrudescentes quando comparados aos camundongos WT, além de não serem capazes de eliminar o parasita, com uma sobrevida de 50% após 30 dias de infecção.

Resultados semelhantes já haviam sido reportados para infecção pelo *P. chabaudi* e *P. yoelli*, onde camundongos que representam dois modelos diferentes de deficiência de moléculas de classe II do MHC desenvolvem hiperparasitemia (109, 159). Confirmando o papel secundário das células T $CD4^+$ não-convencionais nos camundongos resistentes à infecção pelo *P. chabaudi*, a contribuição das células T $CD4^+$ não-convencionais é modesta e limitada ao segundo pico de parasitemia. Colaborando com estes resultados, na infecção pelo *P. yoelii*, a ausência das células T $CD4^+$ restritas por CD1d promove um aumento na parasitemia na fase crônica da infecção (quarta semana), aumento não visto na fase aguda (129), contudo a aquisição de imunidade protetora não foi afetada (160).

O aumento em duas vezes da população de células T $CD4^+$ convencionais do baço após uma semana de infecção pode resultar da intensa proliferação destas células. Reproduzindo a respostas *in vivo*, uma grande parte das células T $CD4^+$ convencionais no dia 4 de infecção completam muitos ciclos de divisão celular quando estimuladas *in vitro* com EP. A estimulação desta resposta requer a interação com as DCs e moléculas de classe II do MHC. A população de células T $CD4^+$ não-convencionais também duplica durante a primeira semana de infecção, mas representa apenas 10% das células T $CD4^+$ do baço. Como a população de células T $CD4^+$ não-convencionais mostra níveis baixos de proliferação espontânea e estimulada com EP, nós postulamos que a maioria das células T $CD4^+$ não-convencionais desenvolve poucos ciclos de divisão celular. A migração celular de outros tecidos juntamente com os baixos níveis de proliferação pode explicar o aumento da população de células T $CD4^+$ não-convencionais.

Ao mesmo tempo, observamos que uma parte considerável das células T expressam a molécula NK1.1 durante a fase aguda da infecção de camundongos WT pelo *P. chabaudi*, mas camundongos deficientes das moléculas CD1d apresentam um aumento reduzido no número de células T $NK1.1^+$ do baço. A maioria das células T $CD4^+NK1.1^+$ e $CD8^+NK1.1^+$ observadas no baço de camundongos na fase aguda da infecção apresenta um fenótipo característico de células ativadas e experimentadas, expressa níveis altos de CD44, CD69 e CD122, produz IFN-γ e perforina e apresenta fenótipo semelhante ao das células *i*NKT em camundongos não-infectados. Nossos dados sugerem que parte da população das

células T NK1.1^{+} pode ser composta por células NKT restritas por CD1d, mas elas não são células *i*NKT já que não reconhecem o tetrâmero CD1d-α-GalCer e preferencialmente não utilizam as moléculas de TCR Vβ8. De acordo com nossos resultados, Soulard et al. mostraram que a população de células *i*NKT do fígado, mas não do baço, expande na infecção pelo *P. yoelii* (125).

No entanto, as células T CD4^{+}NK1.1^{+} apresentam níveis baixos de proliferação celular, com poucos ciclos de divisão celular, isto sugere que parte da população de células T CD4^{+}NK1.1^{-}, que possui uma alta capacidade proliferativa, expande e e passa a expressar NK1.1. Outra evidência que pode corroborar com esta idéia é que a produção de IL-2 também estaria envolvida no aumento das moléculas NK1.1 expressas nas células T do baço de camundongos infectados pelo *P. chabaudi*, uma vez que a estimulação *in vitro* das células T CD8^{+}NK1.1^{-} pela IL-2 é capaz de aumentar a expressão de NK1.1 na superfície das células (161) e que as células T CD8^{+}NK1.1^{+} induzidas pela IL-2 não são células *i*NKT (161). E também, que a IL-2 é produzida durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi* (107). Como as células T CD8^{+} restritas por CD1d foram descritas em humanos, mas não em camundongos (162), o que nos possibilita explicar o baixo número das células CD8^{+}NK1.1^{+} nos camundongos CD1d$^{-/-}$ como uma consequência da ativação das células NKT, que induziria a diferenciação das células T CD8^{+} convencionais em células efetoras que expressam NK1.1. Por outro lado, a ausência das células NKT (camundongos CD1d$^{-/-}$) promoveria uma menor expansão do número de células T NK1.1^{+} e, como conseqüência, determinaria uma menor produção de IFN-γ no início da infecção pelo *P. chabaudi*, em decorrência de uma menor estimulação destas células ou das células T NK1.1^{-}.

A principal consequência da resposta das células T CD4^{+} do baço na fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi* é a indução rápida de células efetoras que são responsáveis pela secreção intensa, mas transiente de TNF-α e IFN-γ. As células T CD4^{+} convencionais são requeridas para a produção precoce de TNF-α, enquanto as células T CD4^{+} restritas por CD1d são dispensáveis para esta resposta. De maneira interessante, as células T CD4^{+} convencionais são a principal fonte de IFN-γ e produzem esta citocina com cinética similar à das células T CD4^{+} não-convencionais. Estes resultados encontram um paralelo com dados obtidos no

estágio pré-eritrocítico da infecção pelo *P. yoelli*, onde as células NK, NKT, T γδ e T $CD4^+$ do baço secretam IFN-γ simultaneamente, mas as células T $CD4^+$ convencionais são a principal fonte de produção desta citocina (126). A secreção de grandes quantidades de citocinas proinflamatórias durante a fase aguda da infecção pode ser crucial para o controle da parasitemia. Sabe-se que estas citocinas melhoram a capacidade dos macrófagos e DCs para fagocitar e apresentar antígenos para as células T (74, 163, 164). Ainda, a produção de IFN-γ durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi* "prima" o sistema imune e favorece uma hiperresposta aos agonistas de TLRs, fenômeno também obervado em pacientes com malária sintomática (163). Esta ativação inicial do sistema imune induzida pelo IFN-γ pode promover uma resposta ao parasita que conhecidamente ativa a resposta imune inata através de TLRs (76, 165, 166).

As cinéticas diferentes para a produção de IFN-γ entre as células T $CD4^+NK1.1^+$ e $CD4^+NK1.1^-$, juntamente com a resposta precoce das células que expressam NK1.1, corroboram a idéia que de estas células são subtipos distintos de células T. O decréscimo rápido na fração de células $CD4^+NK1.1^+$ produtoras de IFN-γ do dia 4 para o dia 5 de infecção indica que o papel protetor desta população celular está restrita aos primeiros dias de infecção, considerando que a importância das células T $CD4^+NK1.1^-$ aumenta com o tempo de infecção. De acordo com nossos resultados, as células $TCR\beta^+NK1.1^+$ de camundongos infectados pelo *P. yoelii* possuem a capacidade de produzir TNF-α e IFN-γ mas não IL-4 (125). De maneira semelhante aos nossos resultados, as células T $NK1.1^+$ e $NK1.1^-$ estão associadas à resistência ao *P. yoelii* (125, 167, 168), onde a participação das células T $NK1.1^+$ é intensa no dia 5 de infecção e decresce logo após (126). Assim, a principal contribuição das células $CD4^+NK1.1^+$ do baço na infecção pela malária murina está relacionada com sua capacidade de perceber rapidamente a presença da infecção, que pode acelerar a ativação de outras células do sistema imune e garantir a otimização do controle do parasita. Corroborando nossa hipótese, um trabalho recente mostrou que a sinalização entre as DCs e as células NK é de suma importância para a indução eficiente das células T para o perfil Th1 e resolução da infecção pelo *P. chabaudi* (74).

As células T $CD4^+$ convencionais também são necessárias durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi* para auxiliar a ativação policlonal das células B e, consequentemente, induzir a secreção rápida de níveis altos de IgM, IgG2a e IgG1. Camundongos deficientes para as moléculas de classe II do MHC produzem baixos níveis de IgM durante a fase aguda da infecção, indicando que parte desta resposta é independente das células T ou dependente das células T $CD4^+$ não-convencionais. Nesse sentido, algums anticorpos de especificidades particulares, como os que reconhecem moléculas ancoradas a GPI, podem ser produzidos através de interações restritas por CD1d, como foi descrito anteriormente na infecção pelo *P. berghei* (121). No entanto, estes anticorpos parecem representar uma pequena fração da resposta das Ig policlonais na fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*, uma vez que nossos dados mostram que essa resposta não é afetada pela ausência das moléculas CD1d.

O envolvimento das Ig policlonais na resistência dos camundongos à infecção é sugerida pelo efeito protetor dos anticorpos de fase aguda no controle inicial da parasitemia (98). Além disso, células B que produzem anticorpos que reconhecem o parasita estão incluídas entre as células ativadas policlonalmente durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi* (61). A troca de isótipo para IgG2a induzida pelo IFN-γ (60), que de acordo com nossos dados também depende das células T $CD4^+$ convencionais, também pode contribuir para a proteção uma vez que os anticorpos deste isótipo ativam a cascata do sistema complemento e interagem com alta afinidade com receptores Fcγ. De fato, entre os isótipos de IgG, os anticorpos IgG2a específicos ao parasita são os mais efetivos para o controle dos parasitas durante o estágio eritrocítico (101). Assim, embora a ativação policlonal das células B tenha sido considerada uma “estratégia” dos parasitas para desviar a resposta imune para a ativação de linfócitos não-específica e imunossupressão (169), este tipo de resposta também pode representar uma forma primitiva (ou inata) de imunidade (170, 171).

Teoricamente, as células B na ausência do auxílio das células T $CD4^+$ convencionais podem responder de maneira independente das células T $CD4^+$ convencionais ou dependente das células T não-convencionais, hipótese factível uma vez que as células B da ZM expressam altos níveis de CD1d em sua superfície

(172) e são ativadas durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi* (93, 150). Sabe-se que as células B ZM e FO são ativadas nesta fase da infecção doença (93, 95), mas a contribuição relativa destas populações para a secreção de Ig policlonal ainda não está clara. Em princípio, as células B ZM poderiam contribuir para a produção de Ig policlonal uma vez que elas estão em contato direto com o sangue e originam rapidamente células plasmáticas de vida-curta capazes de secretar anticorpos codificados “germ-line”, que podem interagir com determinantes antigênicos conservados no parasita, como descrito para bactérias e vírus, e também com determinantes antigênicos próprios gerados durante a fase aguda da infecção como DNA danificado e lipídios oxidados (172). Células T $CD4^+$ convencionais são necessárias para a ativação completa das células B ZM e FO, ainda que exista algum aumento na expressão de CD69 nas células B de camundongos deficientes para as moléculas de classe II do MHC.

A secreção de Ig policlonal é acompanhada pela diminuição na expressão de CD1d e CD21 nas células B ZM e de CD23 nas células B FO. Os baixos níveis CD1d nas células B ZM podem resultar da quebra da maquinaria de reciclagem da molécula CD1d, como descrito para as DCs de humanos expostas a altos títulos do vírus herpes simples (173). A diminuição da expressão de CD21 e CD23 já havia sido descrita na maioria das células B $sIgG2a^+$ de camundongos C57BL/6 no dia 30 de infecção (95). CD21 é expresso em baixos níveis em vários modelos de infecção crônica, como a infecção pelo vírus da imunodeficência humana (HIV - Human Immunodeficiency Virus), sendo atribuída à contínua exposição das células B a partículas acopladas ao complemento (174). De fato, a molécula CD21 possui um papel central não somente em prover a resposta de anticorpos por auxiliar na captura de partículas acopladas ao complemento, mas também por sinalizar a migração das células B ZM através das áreas de células T e dos centros germinativos no baço, onde ocorreria a clivagem do CD21 e deposição dos antígenos na superfície das DCs e FDCs (172). O CD23 liga-se ao CD21 e também à IgE, e através destas interações regula a síntese deste isótipo de anticorpo (175). Contudo, o fato de todas estas modificações fenotípicas serem coordenadas pelas células T $CD4^+$ convencionais é inesperado, desde que algumas atividades das células B como a captação de partículas acopladas ao complemento

e seu transporte até as DCs e FDCs são considerados processos independentes das células T.

Com o controle da fase aguda da parasitemia, o número das células T $CD4^+$ por baço declina rapidamente, alcançando valores que estão abaixo daqueles encontrados nos camundongos não-infectados. Este fenômeno ocorre primeiramente através da apoptose das células T $CD4^+$ (176, 177), mas outros mecanismos de regulação também podem assegurar o final da fase aguda da resposta uma vez que as células restantes permanecem refratárias quando estimuladas com EP ou anticorpos anti-CD3, como visto para as células T $CD4^+$ convencionais para os dias 7 e 10 de infecção e para as células T $CD4^+NK1.1^-$ no dia 7 de infecção. Os níveis altos de PDL-1 na população de células T $CD4^+$ convencionais no dia 7 de infecção possibilitariam a ativação da via PD-1/PDL-1 e, consequentemente, a desfosforilação do complexo do TCR e dessa maneira contribuiriam para a diminuição da resposta destas células (178).

A via de Fas-Fas-L está envolvida na apoptose de linfócitos no baço durante a infecção aguda pelo *P. chabaudi*, que poderia contribuir para a homeostase do sistema imune (176, 177, 179, 180). Embora ocorra uma intensa apoptose celular induzida pela alta parasitemia na fase aguda da infecção, esta não impede a geração de células B e T de memória (181-185). Por outro lado, a via do PD-1/PD-L1 também poderia minimizar o dano ao hospedeiro mediado pela resposta imune, suprimindo certas funções efetoras após a sinalização via TCR, sem interferir na expansão e sobrevivência das células T mediadas por citocinas (186). Dessa maneira, nós podemos sugerir que a alta expressão de PD-L1 nas células T $NK1.1^+$ e $NK1.1^-$ de camundongos WT no dia 7 de infecção seria um mecanismo molecular potente que estaria envolvido na regulação da sinalização das células T mediada pelo TCR. Isto poderia proteger o camundongo de um efeito deletério da super ativação do sistema imune, permitindo o desenvolvimento das células T de memória através dos sinais de sobrevivência mediados pelas citocinas. A IL-2 produzida durante o início da infecção pelo *P. chabaudi* pode ser responsável pela indução dessas moléculas regulatórias (107), uma vez que a IL-2 participa tanto da AICD via Fas/Fas-L (187) e quanto da regulação de resposta das células T mediada por PD-1/PD-L1 (186).

O final da fase aguda da resposta permite o desenvolvimento de uma grande população de células T $CD4^+$ específicas ao parasita, este processo ocorre em paralelo a uma segunda onda de proliferação. Esta população aumenta com o passar do tempo até o dia 30 de infecção, mas nós mostramos recentemente que após um mês de infecção, quando os parasitas são completamente eliminados, esta população de células declina progressivamente e alcança um nível semelhante a dos camundongos controles (86). Apesar da persistência de níveis baixos de parasitas durante a fase tardia da resposta, somente detectamos a secreção espontânea de IFN-γ pelas células T $CD4^+$ durante o segundo pico de parasitemia, embora estas células sejam capazes de produzir grandes quantidades de IFN-γ quando estimuladas *in vitro* com EP.

Este trabalho gerou informações que colaboram para a compreensão de dados gerados por nosso grupo, além de abrir perspectivas para novos estudos com intuito de desvendar os mecanismos moleculares envolvidos na resposta das células T $CD4^+$ e B na fase aguda e crônica da infecção pelo *Plasmodium* e geração de uma resposta imune eficiente frente ao parasita, mas não deletéria ao indivíduo.

6 CONCLUSÃO

As células T $CD4^+$ convencionais são essenciais para o controle da infecção pelo *P. chabaudi*, enquanto as células T $CD4^+$ não-convencionais contribuem apenas para o controle do segundo pico de parasitemia.

Os linfócitos T $CD4^+$ convencionais são capazes de responder rapidamente ao parasita, sendo ativados, proliferando e produzindo grandes quantidades de IFN-γ.

As células T $CD4^+$ não-convencionais são ativadas, produzem IFN-γ e contribuem para a expansão das populações de células T $CD4^+$ e B induzidas na infecção.

As células T $CD4^+$ convencionais são a principal fonte de IFN-γ e produzem esta citocina com cinética semelhante à das células T $CD4^+$ não-convencionais.

Ainda que a maioria das células $TCR\alpha\beta^+$ $NK1.1^+$ do baço geradas durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi* possa ser restrita por CD1d, estas não são células *i*NKT, uma vez que não reconhecem o tetrâmero CD1d-α-GalCer e não utilizam preferencialmente a cadeia Vβ8 e Vβ7 em seu TCR.

Ainda que as células $TCR\alpha\beta^+CD4^+NK1.1^-$ representem a maior parte das células T $CD4^+$ do baço no início da infecção, a população de células $TCR\alpha\beta^+CD4^+NK1.1^+$ também expande, apresenta o fenótipo de células efetoras e pode auxiliar na regulação das células T, pois expressa quantidades elevadas das moléculas Fas/FasL e PD-1/PD-L1.

Diferente das células T $CD4^+$ não-convencionais, as células T $CD4^+$ convencionais no dia 4 de infecção proliferam vigorosamente *in vitro* em resposta ao

EP. Fato confirmado pela comparação entre as células T $CD4^+NK1.1^+$ e $CD4^+NK1.1^-$, nos camundongos WT e entre as células T $CD4^+$ de camundondos I-$A^{b-/-}$ e $CD1d^{-/-}$.

A resposta proliferativa *in vitro* e *in vivo* das células T $CD4^+$ convencionais depende da interação com moléculas de classe II do MHC.

As células B FO e ZM são capazes de produzir IgM policlonais independente das interações com as células T $CD4^+$ convencionais, mas para a diminuição da expressão de CD21, CD23 e CD1d e produção de IgG2a e IgG1 policlonais e específicas ao parasita é necessário a interação com as células T $CD4^+$ convencionais, mas não com as células T $CD4^+$ não-convencionais.

A resposta das células T $CD4^+$ convencionais durante o estágio eritrocítico do *P. chabaudi* acontece em duas fases com diferentes propriedades: 1) A resposta imune inicia com a ativação precoce das células T $CD4^+$ convencionais e logo ocorre intensa proliferação destas células, com produção de grandes quantidades de IFN-γ e ativação das células B para a produção de anticorpos policlonais, seguida pela regulação da resposta das células T $CD4^+$ convencionais; 2) geração de células T $CD4^+$ convencionais de memória capazes de promover uma resposta efetora eficiente contra o parasita e auxiliar na produção de anticorpos específicos que contribuem para o controle/eliminação do parasita.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS[1]

1. Garcia LS. Malaria. Clin Lab Med. 2010 Mar;30(1):93-129.

2. Bruce-Chwatt LJ. Quinine and the mystery of blackwater fever. Acta Leiden. 1987;55:181-96.

3. Wykes M, Good MF. A case for whole-parasite malaria vaccines. Int J Parasitol. 2007 Jun;37(7):705-12.

4. Lou J, Lucas R, Grau GE. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. Clin Microbiol Rev. 2001 Oct;14(4):810-20, table of contents.

5. WHO. World Health Organization Malaria, other vectorborne and parasitic diseases: Regional trend in cases and deaths. 2007. Available from: http://www.wpro.who.int/sites/mvp/data/ [2009 jun 10].

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

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

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

9. Hay SI, Okiro EA, Gething PW, Patil AP, Tatem AJ, Guerra CA, et al. Estimating the global clinical burden of Plasmodium falciparum Malaria in 2007. PLoS Med. 2010;7(6):e1000290.

10. Marsh K, Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. Parasite Immunol. 2006 Jan-Feb;28(1-2):51-60.

11. Schofield L, Mueller I. Clinical immunity to malaria. Curr Mol Med. 2006 Mar;6(2):205-21.

12. Beale GH, Carter, R., Walliker, D. Genetics In: Killick-Kendrick R, Peters W, editors. Rodent Malaria. London: Academic Press Inc; 1978. p. 213-45.

13. Landau IAB, Y. Life cycles and morphology. In: Killick-Kendrick R, Peters W, editors. Rodent Malaria. London: Academic Press Inc; 1978. p. 53-84.

[1] De acordo com: International Comittee of Medical Jornal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: http://www.icmje.org [2007 May 22].

14. SVS. Secretaria de Vigilância Sanitária. 2008. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder_malaria_2008_final.pdf. [cited 2008 Sep. 16].

15. Saul A. Kinetic constraints on the development of a malaria vaccine. Parasite Immunol. 1987 Jan;9(1):1-9.

16. Trampuz A, Jereb M, Muzlovic I, Prabhu RM. Clinical review: Severe malaria. Crit Care. 2003 Aug;7(4):315-23.

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

18. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. Nature. 2002 Feb 7;415(6872):673-9.

19. Baker DA. Malaria gametocytogenesis. Mol Biochem Parasitol. 2010 Aug;172(2):57-65.

20. Waters AP. Parasitology. Guilty until proven otherwise. Science. 2003 Sep 12;301(5639):1487-8.

21. Greenwood BM, Bradley AK, Greenwood AM, Byass P, Jammeh K, Marsh K, et al. Mortality and morbidity from malaria among children in a rural area of The Gambia, West Africa. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1987;81(3):478-86.

22. Soares IS, da Cunha MG, Silva MN, Souza JM, Del Portillo HA, Rodrigues MM. Longevity of naturally acquired antibody responses to the N- and C-terminal regions of Plasmodium vivax merozoite surface protein 1. Am J Trop Med Hyg. 1999 Mar;60(3):357-63.

23. Soares IS, Oliveira SG, Souza JM, Rodrigues MM. Antibody response to the N and C-terminal regions of the Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of P. vivax malaria in the north of Brazil. Acta Trop. 1999 Jan 15;72(1):13-24.

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

25. Jelinek T, Schulte C, Behrens R, Grobusch MP, Coulaud JP, Bisoffi Z, et al. Imported Falciparum malaria in Europe: sentinel surveillance data from the European network on surveillance of imported infectious diseases. Clin Infect Dis. 2002 Mar 1;34(5):572-6.

26. D'Acremont V, Landry P, Mueller I, Pecoud A, Genton B. Clinical and laboratory predictors of imported malaria in an outpatient setting: an aid to medical decision making in returning travelers with fever. Am J Trop Med Hyg. 2002 May;66(5):481-6.

27. Murphy GS, Oldfield EC, 3rd. Falciparum malaria. Infect Dis Clin North Am. 1996 Dec;10(4):747-75.

28. Genton B, Al-Yaman F, Anders R, Saul A, Brown G, Pye D, et al. Safety and immunogenicity of a three-component blood-stage malaria vaccine in adults living in an endemic area of Papua New Guinea. Vaccine. 2000 May 22;18(23):2504-11.

29. 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.

30. Clark IA. Does endotoxin cause both the disease and parasite death in acute malaria and babesiosis? Lancet. 1978 Jul 8;2(8080):75-7.

31. Taverne J, Tavernier J, Fiers W, Playfair JH. Recombinant tumour necrosis factor inhibits malaria parasites in vivo but not in vitro. Clin Exp Immunol. 1987 Jan;67(1):1-4.

32. Kwiatkowski D. Tumour necrosis factor, fever and fatality in falciparum malaria. Immunol Lett. 1990 Aug;25(1-3):213-6.

33. Lyke KE, Burges R, Cissoko Y, Sangare L, Dao M, Diarra I, et al. Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe Plasmodium falciparum malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. Infect Immun. 2004 Oct;72(10):5630-7.

34. Ochiel DO, Awandare GA, Keller CC, Hittner JB, Kremsner PG, Weinberg JB, et al. Differential regulation of beta-chemokines in children with Plasmodium falciparum malaria. Infect Immun. 2005 Jul;73(7):4190-7.

35. Prakash D, Fesel C, Jain R, Cazenave PA, Mishra GC, Pied S. Clusters of cytokines determine malaria severity in Plasmodium falciparum-infected patients from endemic areas of Central India. J Infect Dis. 2006 Jul 15;194(2):198-207.

36. Kurtzhals JA, Adabayeri V, Goka BQ, Akanmori BD, Oliver-Commey JO, Nkrumah FK, et al. Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. Lancet. 1998 Jun 13;351(9118):1768-72.

37. Awandare GA, Goka B, Boeuf P, Tetteh JK, Kurtzhals JA, Behr C, et al. Increased levels of inflammatory mediators in children with severe Plasmodium falciparum malaria with respiratory distress. J Infect Dis. 2006 Nov 15;194(10):1438-46.

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

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

40. Hafalla JC, Cockburn IA, Zavala F. Protective and pathogenic roles of CD8+ T cells during malaria infection. Parasite Immunol. 2006 Jan-Feb;28(1-2):15-24.

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

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

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

44. Klotz FW, Scheller LF, Seguin MC, Kumar N, Marletta MA, Green SJ, Azad AF. Co-localization of inducible nitric oxide synthase and Plasmodium berghei in hepatocytes from rats immunized with irradiated sporozoites. J Immunol. 1995;154:339-5.

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

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

47. Pombo DJ, Lawrence G, Hirunpetcharat C, Rzepczyk C, Bryden M, Cloonan N, et al. Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with Plasmodium falciparum. Lancet. 2002 Aug 24;360(9333):610-7.

48. Artavanis-Tsakonas K, Eleme K, McQueen KL, Cheng NW, Parham P, Davis DM, et al. Activation of a subset of human NK cells upon contact with Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. J Immunol. 2003 Nov 15;171(10):5396-405.

49. Artavanis-Tsakonas K, Riley EM. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. J Immunol. 2002 Sep 15;169(6):2956-63.

50. Newman KC, Korbel DS, Hafalla JC, Riley EM. Cross-talk with myeloid accessory cells regulates human natural killer cell interferon-gamma responses to malaria. PLoS Pathog. 2006 Dec;2(12):e118.

51. Bull PC, Lowe BS, Kortok M, Molyneux CS, Newbold CI, Marsh K. Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. Nat Med. 1998 Mar;4(3):358-60.

52. Bouharoun-Tayoun H, Oeuvray C, Lunel F, Druilhe P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of Plasmodium falciparum asexual blood stages. J Exp Med. 1995 Aug 1;182(2):409-18.

53. Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. J Exp Med. 1990 Jul 1;172(1):379-82.

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

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

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

57. Taylor LH, Walliker D, Read AF. Mixed-genotype infections of malaria parasites: within-host dynamics and transmission success of competing clones. Proc Biol Sci. 1997 Jun 22;264(1383):927-35.

58. Long GH, Chan BH, Allen JE, Read AF, Graham AL. Parasite genetic diversity does not influence TNF-mediated effects on the virulence of primary rodent malaria infections. Parasitology. 2006 Dec;133(Pt 6):673-84.

59. 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;17:599-603.

60. D'Império Lima MR, Bandeira A, Falanga P, Freitas A A,Kipnis T L ,Pereira da Silva L, Coutinho A. Clonal analysis of B lymphocyte responses to Plasmodium chabaudi infection of normal and immunoprotected mice. Int Immunol. 1991;3:1207.

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

62. Sardinha LR, D'Império Lima MR, Álvarez JM. Influence of the Polyclonal Activation Induced by Plasmodium chabaudi on Ongoing OVA-Specific B- and T-Cell Responses. Scandinavian Journal of Immunology. 2002;56(4):408-16.

63. 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.

64. Boonpucknavig S, Ekapanyakul G. Autoantibodies in sera of Thai patients with Plasmodium falciparum infection. Clin Exp Immunol. 1984;Oct;58(1):77-82.

65. 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;Aug;49(2):310-6.

66. Greenwood BM. Possible role of B cell mitogen in hypergammaglobulinemia in malaria and trypanosomiasis. Lancet 1974;Mar 16;1(7855)::435-6.

67. 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;Mar;14:191-7.

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;May;44(5):571-7.

69. Daniel-Ribeiro C, de Oliveira-Ferreira J, Banic, DM, Galvão-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;May-Jun;83(3):289-92.

70. 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.

71. Mohan K, Moulin P, Stevenson MM. Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage Plasmodium chabaudi AS infection. J Immunol. 1997;159: 4990-8.

72. De Souza JB, Williamson KH, Otani T, Playfair JH. Early gamma interferon responses in lethal and nonlethal murine blood-stage malaria. Infect Immun. 1997 May;65(5):1593-8.

73. Stevenson MM, Su Z, Sam H, Mohan K. Modulation of host responses to blood-stage malaria by interleukin-12: from therapy to adjuvant activity. Microbes Infect. 2001 Jan;3(1):49-59.

74. Ing R, Stevenson MM. Dendritic cell and NK cell reciprocal cross talk promotes gamma interferon-dependent immunity to blood-stage Plasmodium chabaudi AS infection in mice. Infect Immun. 2009 Feb;77(2):770-82.

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

76. Franklin BS, Rodrigues SO, Antonelli LR, Oliveira RV, Goncalves AM, Sales-Junior PA, et al. MyD88-dependent activation of dendritic cells and CD4(+) T lymphocytes mediates symptoms, but is not required for the immunological control of parasites during rodent malaria. Microbes Infect. 2007 Jun;9(7):881-90.

77. Su Z, Tam MF, Jankovic D, Stevenson MM. Vaccination with novel immunostimulatory adjuvants against blood-stage malaria in mice. Infect Immun. 2003 Sep;71(9):5178-87.

78. Podoba JE, Stevenson MM. CD4+ and CD8+ T lymphocytes both contribute to acquired immunity to blood-stage Plasmodium chabaudi AS. Infection and Immunity. 1991;59(1):51-8.

79. Stevenson MM, Tam MF, Belosevic M, van der Veide PH, Podoba JE. Role of endogenous interferon in host response to infection with blood-stage Plasmodium chabaudi AS. Infect Immun. 1990;58:3225.

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

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

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

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

84. Li C, Sanni LA, Omer F, Riley E, Langhorne J. Pathology of Plasmodium chabaudi chabaudi infection and mortality in interleukin-10-deficient mice are ameliorated by anti-tumor necrosis factor alpha and exacerbated by anti-transforming growth factor beta antibodies. Infect Immun. 2003 Sep;71(9):4850-6.

85. Stevenson MM, Tam MF. Differential induction of helper T cell subsets during blood-stage Plasmodium chabaudi AS infection in resistant and susceptible mice. Clin Exp Immunol. 1993 Apr;92(1):77-83.

86. Freitas do Rosario AP, Muxel SM, Rodriguez-Malaga SM, Sardinha LR, Zago CA, Castillo-Mendez SI, et al. Gradual decline in malaria-specific memory T cell responses leads to failure to maintain long-term protective immunity to Plasmodium chabaudi AS despite persistence of B cell memory and circulating antibody. J Immunol. 2008 Dec 15;181(12):8344-55.

87. Helmby H, Kullberg M, Troye-Blomberg M. Altered immune responses in mice with concomitant Schistosoma mansoni and Plasmodium chabaudi infections. Infect Immun. 1998 Nov;66(11):5167-74.

88. Langhorne J, Gillard S, Simon B, Slade S, Eichmann K. Frequencies of CD4+ T cells reactive with Plasmodium chabaudi chabaudi: distinct response kinetics for cells with Th1 and Th2 characteristics during infection. Int Immunol. 1989;1(4):416-24.

89. Taylor-Robinson AW, Phillips RS, Severn A, Moncada S, Liew FY. The role of TH1 and TH2 cells in a rodent malaria infection. Science. 1993 Jun 25;260(5116):1931-4.

90. Su Z, Stevenson MM. IL-12 is required for antibody-mediated protective immunity against blood-stage Plasmodium chabaudi AS malaria infection in mice. J Immunol. 2002 Feb 1;168(3):1348-55.

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

92. Meding SJ, Langhorne J. CD4+ T cells and B cells are necessary for the transfer of protective immunity to Plasmodium chabaudi chabaudi. Eur J Immunol. 1991 Jun;21(6):1433-8.

93. 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;17:599-603.

94. Achtman AHK, MacLennan IC M, Langhorne J. Plasmodium chabaudi chabaudi Infection in Mice Induces Strong B Cell Responses and Striking But Temporary Changes in Splenic Cell Distribution. The Journal of Immunology. 2003;171:317–24.

95. Castillo-Mendez SI, Zago CA, Sardinha LR, Freitas do Rosario AP, Alvarez JM, D'Imperio Lima MR. Characterization of the spleen B-cell compartment at the early and late blood-stage Plasmodium chabaudi malaria. Scand J Immunol. 2007 Aug-Sep;66(2-3):309-19.

96. Langhorne J, Evans CB, Asofsky R, Taylor DW. Immunoglobulin isotype distribution of malaria-specific antibodies produced during infection with Plasmodium chabaudi adami and Plasmodium yoelii. Cell Immunol. 1984;87(2):452-61.

97. Langhorne J. The role of CD4+ T-cells in the immune response to Plasmodium chabaudi. Parasitol Today. 1989;Nov;5(11):362-4.

98. 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;66:4080.

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

100. Elias RM, Sardinha LR, Bastos KRB, Zago CA, Freitas do Rosário AP, Alvare JM, D'Império Lima MR. Role of CD28 in polyclonal and specific T and B cell responses required for protection against blood stage malaria. J Immunol. 2005;174:790-9.

101. Cavinato RA, Bastos KRB, Sardinha LR, Elias RM, Alvarez JM, D'Império 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 Immunology. 2001;23: 587-97.

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

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

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

105. Taylor-Robinson AW, Phillips RS, Severn A, Moncada S, Liew FY. The role of TH1 and TH2 cells in a rodent malaria infection Science. 1993;260(5116):1931-4.

106. Elliott SR, Kuns RD, Good MF. Heterologous Immunity in the Absence of Variant-Specific Antibodies after Exposure to Subpatent Infection with Blood-Stage Malaria. Infection and Immunity. 2005; Apr. 2005:2478–85.

107. Zago CA, Bortoluci KR, Sardinha LR, Pretel FD, Castillo-Méndez SI, Freitas do Rosário AP, et al. IL-2 Does Not Significantly Contribute for CD4+ T Cell Proliferation and Effector Th1 Cell Differentiation During the Early Plasmodium chabaudi Malaria but Leads Memory Th1 Cells to IL-2 Dependency. Plos One. 2010. In press.

108. 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 Feb;38(2):229-38.

109. Cigel F, Batchelder J, Burns Jr, Yan˜ez D, van der Heyd, H, Manning DD, Weidanz W P. Immunity to blood-stage murine malarial parasites is MHC class II dependent. Immunol Letter. 2003;89:243-49.

110. Gumperz B. CD1-specific T cells in microbial immunity. Curr Opin Immunol. 2001;13:471-78.

111. Kronenberg G. The unconventional lifestyle of NKT cells. Nat Rev Immunol. 2002;2:557-68.

112. Assarsson E, Kambayashi T, Sandberg JK, Hong S, Taniguchi M, Van Kaer L, Ljunggren HG, Chambers BJ. CD8+ T cells rapidly acquire NK1.1 and NK cell-associated molecules upon stimulation in vitro and in vivo. J Immunol. 2000;165:3673-79.

113. Slifka MK, Pagarigan RR, Whitton JL. NK markers are expressed on a high percentage of virus-specific CD8+ and CD4+ T cells. J Immunol. 2000;164:2009-15.

114. Chen H, Huang H, Paul WE. NK1.1+ CD4+ T cells lose NK1.1 expression upon in vitro activation. J Immunol 1997;158:5112-9.

115. Wilson MT, Johansson C, Olivares-Villagómez D, Singh AK, Stanic AK, Wang CR, Joyce S, Wick MJ, Van Kaer L. The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:10913-18.

116. Koseki H, Imai K, Nakayama F, Sado T, Moriwaki K, Taniguchi M. Homogenous junctional sequence of the V14+ T-cell antigen receptor alpha chain expanded in unprimed mice. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:5248-52.

117. Lantz O, Bendelac A. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. J Exp Med 1994;180:1097-106.

118. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van kaer L. NKT cells: what's in a name? Nat Rev Immunol. 2004;4:231-7.

119. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, Ueno H, Nakagawa R, Sato H, Kondo E, Koseki H, Taniguchi M . CD1d-restricted and TCR-mediated activation of Valpha14 NKT cells by glycosylceramides. Science. 1997;278:1626-29.

120. Schofield L, McConville MJ, Hansen D, Campbell AS, Fraser-Reid B, Grusby MJ, Tachado SD. CD1d-Restricted Immunoglobulin G Formation to GPI-Anchored Antigens Mediated by NKT Cells. Science. 1999;283:225-9.

121. Hansen DS, Siomos M, de Koning-Ward T, Buckingham L,Crabb BS, Schofield L. CD1d-restricted NKT cells contribute to malarial splenomegaly and enhance parasite-specific antibody responses. Eur J Immunol. 2003;33:2588–98.

122. Molano A, Park SH, Chiu YH, Nosseir S, Bendelac A, Tsuji M. Cutting edge: the IgG response to the circumsporozoite protein is MHC class II-dependent and CD1d-independent: exploring the role of GPIs in NK T cell activation and antimalarial responses. J Immunol 2000;May 15;164(10):5005-9.

123. Romero JF, Eberl G, Macdonald HR and Corradin G. CD1d-restricted NK T cells are dispensable for specific antibody responses and protective immunity against liver stage malaria infection in mice. Parasite Immunology. 2001;23:267-9.

124. Hansen DS, Siomos M, de Koning-Ward T, Buckingham L, Crabb BS and Schofield L. CD1d-restricted NKT cells contribute to malarial splenomegaly and enhance parasite-specific antibody responses. Eur J Immunol. 2003;33:2588-98.

125. Soulard V, Roland J, Sellier C, Gruner AC, Leite-de-Moraes M, Franetich JF, et al. Primary infection of C57BL/6 mice with Plasmodium yoelii induces a heterogeneous response of NKT cells. Infect Immun. 2007 May;75(5):2511-22.

126. Soulard V, Roland J, Gorgette O, Barbier E, Cazenave PA, Pied S. An early burst of IFN-gamma induced by the pre-erythrocytic stage favours Plasmodium yoelii parasitaemia in B6 mice. Malaria journal. 2009;8:128.

127. Pied S, Roland J, Louise A,Voegtle D, Soulard V, Mazier D and Cazenave PA. Liver CD4-CD8-NK1.1+TCRαβ intermediante cells increase during experimental malaria infection and ar able to exhibit inhibitory activity against the parasite liver stage in vitro. The Journal of Immunology. 2000;164:1463-69.

128. Weerasinghe A, Sekikawa H, Watanabe H, Mannoor K, Morshed SR, Halder RC, et al. Association of intermediate T cell receptor cells, mainly their NK1.1(-) subset, with protection from malaria. Cell Immunol. 2001 Jan 10;207(1):28-35.

129. Mannoor MK, Weerasinghe A, Halder RC, Reza S, Morshed M, Ariyasinghe A, Watanabe H, Sekikawa H, Abo T. Resistance to malarial infection is achieved by the cooperation of NK1.1(+) and NK1.1(-) subsets of intermediate TCR cells which are constituents of innate immunity. Cell Immunol. 2001;Aug 1;211(2) 96-104.

130. Tsuji M, Mombaerts P, Lefrancois L, Nussenzweig RS, Zavala F, Tonegawa S. Gamma delta T cells contribute to immunity against the liver stages of malaria in alpha beta T-cell-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Jan 4;91(1):345-9.

131. van der Heyde HC, Elloso MM, Chang WL, Kaplan M, Manning DD, Weidanz WP. Gamma delta T cells function in cell-mediated immunity to acute blood-stage Plasmodium chabaudi adami malaria. J Immunol. 1995 Apr 15;154(8):3985-90.

132. van der Heyde HC, Elloso MM, Chang WL, Pepper BJ, Batchelder J, Weidanz WP. Expansion of the gammadelta T cell subset in vivo during bloodstage malaria in B cell-deficient mice. J Leukoc Biol. 1996 Aug;60(2):221-9.

133. van der Heyde HC, Batchelder JM, Sandor M, Weidanz WP. Splenic gammadelta T cells regulated by CD4+ T cells are required to control chronic Plasmodium chabaudi malaria in the B-cell-deficient mouse. Infect Immun. 2006 May;74(5):2717-25.

134. Seixas EM, Langhorne J. gammadelta T cells contribute to control of chronic parasitemia in Plasmodium chabaudi infections in mice. J Immunol. 1999 Mar 1;162(5):2837-41.

135. O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. Immunity. 1998 Mar;8(3):275-83.

136. Coffman RL, Varkila K, Scott P, Chatelain R. Role of cytokines in the differentiation of CD4+ T-cell subsets in vivo. Immunol Rev. 1991 Oct;123:189-207.

137. Cigel F, Batchelder J, Burns JM, Jr., Yanez D, van der Heyde H, Manning DD, et al. Immunity to blood-stage murine malarial parasites is MHC class II dependent. Immunol Lett. 2003 Oct 31;89(2-3):243-9.

138. Stephens R, Ndungu FM, Langhorne J. Germinal centre and marginal zone B cells expand quickly in a second Plasmodium chabaudi malaria infection producing mature plasma cells. Parasite Immunol. 2009 Jan;31(1):20-31.

139. Balazs M, Martin F, Zhou T, Kearney J. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. Immunity. 2002 Sep;17(3):341-52.

140. Martin F, Kearney JF. Marginal-zone B cells. Nat Rev Immunol. 2002 May;2(5):323-35.

141. Pillai S, Cariappa A, Moran ST. Marginal zone B cells. Annu Rev Immunol. 2005;23:161-96.

142. Oliver AM, Martin F, Kearney JF. IgMhighCD21high lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. J Immunol. 1999 Jun 15;162(12):7198-207.

143. Martin F, Oliver AM, Kearney JF. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. Immunity. 2001 May;14(5):617-29.

144. Guinamard R, Okigaki M, Schlessinger J, Ravetch JV. Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response. Nat Immunol. 2000 Jul;1(1):31-6.

145. Cinamon G, Zachariah MA, Lam OM, Foss FWJr, Cyster JG. Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. Nat Immunol. 2008 Jan;9(1):54-62.

146. Aubry JP, Pochon S, Gauchat JF, Nueda-Marin A, Holers VM, Graber P, et al. CD23 interacts with a new functional extracytoplasmic domain involving N-linked oligosaccharides on CD21. J Immunol. 1994 Jun 15;152(12):5806-13.

147. Aubry JP, Pochon S, Graber P, Jansen KU, Bonnefoy JY. CD21 is a ligand for CD23 and regulates IgE production. Nature. 1992 Aug 6;358(6386):505-7.

148. Matsumoto AK, Kopicky-Burd J, Carter RH, Tuveson DA, Tedder TF, Fearon DT. Intersection of the complement and immune systems: a signal transduction complex of the B lymphocyte-containing complement receptor type 2 and CD19. J Exp Med. 1991 Jan 1;173(1):55-64.

149. Croix DA, Ahearn JM, Rosengard AM, Han S, Kelsoe G, Ma M, et al. Antibody response to a T-dependent antigen requires B cell expression of complement receptors. J Exp Med. 1996 Apr 1;183(4):1857-64.

150. Castillo-Méndez SI, Zago C A, Sardinha LR, Freitas do Rosário AP, Álvarez JM, D'Império Lima MR. Characterization of the Spleen B-Cell Compartment at the Early and Late Blood-Stage Plasmodium chabaudi Malaria. Scandinavian Journal of Immunology. 2007;66:309–19.

151. Cariappa A, Mazo IB, Chase C, Shi HN, Liu H, Li Q, et al. Perisinusoidal B cells in the bone marrow participate in T-independent responses to blood-borne microbes. Immunity. 2005 Oct;23(4):397-407.

152. Cariappa A, Chase C, Liu H, Russell P, Pillai S. Naive recirculating B cells mature simultaneously in the spleen and bone marrow. Blood. 2007 Mar 15;109(6):2339-45.

153. Chen YH, Wang B, Chun T, Zhao L, Cardell S, Behar SM, et al. Expression of CD1d2 on thymocytes is not sufficient for the development of NK T cells in CD1d1-deficient mice. J Immunol. 1999 Apr 15;162(8):4560-6.

154. Grusby MJ, Johnson RS, Papaioannou VE, Glimcher LH. Depletion of CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. Science. 1991 Sep 20;253(5026):1417-20.

155. Molano A, Park SH, Chiu YH, Nosseir S, Bendelac A, Tsuji M. Cutting edge: the IgG response to the circumsporozoite protein is MHC class II-dependent and CD1d-independent: exploring the role of GPIs in NK T cell activation and antimalarial responses. J immunol. 2000;May 15;164(10):5005-9.

156. Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. J Immunol Methods 1994;171:131-37.

157. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. Nat Rev Immunol. 2002 Feb;2(2):116-26.

158. Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. Immunity. 2009 Feb 20;30(2):180-92.

159. Langhorne J, Mombaerts P, Tonegawa S. Alpha beta and gamma delta T cells in the immune response to the erythrocytic stages of malaria in mice. Int Immunol. 1995;Jun;7(6):1005-11.

160. Taniguchi T, Tachikawa S, Kanda Y, Kawamura T, Tomiyama-Miyaji C, Li C, Watanabe H, Sekikawa H, Abo T. Malaria protection in β2-microglobulin-deficient mice lacking major histocompatibility complex class I antigens: essential role of innate immunity, including γδT cells. Immunology. 2007;122(4):514-21.

161. Assarsson E, Kambayashi T, Sandberg JK, Hong S, Taniguchi M, Van Kaer L, et al. CD8+ T cells rapidly acquire NK1.1 and NK cell-associated molecules upon stimulation in vitro and in vivo. J Immunol. 2000 Oct 1;165(7):3673-9.

162. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? Nat Rev Immunol. 2004 Mar;4(3):231-7.

163. Franklin BS, Parroche P, Ataide MA, Lauw F, Ropert C, de Oliveira RB, et al. Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of toll-like receptor expression and function. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Apr 7;106(14):5789-94.

164. Bastos KR, Barboza R, Elias RM, Sardinha LR, Grisotto MG, Marinho CR, et al. Impaired macrophage responses may contribute to exacerbation of blood-stage Plasmodium chabaudi chabaudi malaria in interleukin-12-deficient mice. J Interferon Cytokine Res. 2002 Dec;22(12):1191-9.

165. Seixas E, Moura Nunes JF, Matos I, Coutinho A. The interaction between DC and Plasmodium berghei/chabaudi-infected erythrocytes in mice involves direct cell-to-cell contact, internalization and TLR. Eur J Immunol. 2009 Jul;39(7):1850-63.

166. Ropert C, Franklin BS, Gazzinelli RT. Role of TLRs/MyD88 in host resistance and pathogenesis during protozoan infection: lessons from malaria. Semin Immunopathol. 2008 Feb;30(1):41-51.

167. Pied S, Roland J, Louise A, Voegtle D, Soulard V, Mazier D, et al. Liver CD4-CD8- NK1.1+ TCR alpha beta intermediate cells increase during experimental malaria infection and are able to exhibit inhibitory activity against the parasite liver stage in vitro. J Immunol. 2000 Feb 1;164(3):1463-9.

168. Mannoor MK, Weerasinghe A, Halder RC, Reza S, Morshed M, Ariyasinghe A, et al. Resistance to malarial infection is achieved by the cooperation of NK1.1(+) and NK1.1(-) subsets of intermediate TCR cells which are constituents of innate immunity. Cell Immunol. 2001 Aug 1;211(2):96-104.

169. Reina-San-Martin B, Cosson A, Minoprio P. Lymphocyte polyclonal activation: a pitfall for vaccine design against infectious agents. Parasitol Today. 2000 Feb;16(2):62-7.

170. Clagett JA, Engel D. Polyclonal activation: a form of primitive immunity and its possible role in pathogenesis of inflammatory diseases. Dev Comp Immunol. 1978 Apr;2(2):235-41.

171. Montes CL, Acosta-Rodriguez EV, Merino MC, Bermejo DA, Gruppi A. Polyclonal B cell activation in infections: infectious agents' devilry or defense mechanism of the host? J Leukoc Biol. 2007 Nov;82(5):1027-32.

172. Lopes-Carvalho T, Foote J, Kearney JF. Marginal zone B cells in lymphocyte activation and regulation. Curr Opin Immunol. 2005 Jun;17(3):244-50.

173. Donovan MJ, Jayakumar A, McDowell MA. Inhibition of groups 1 and 2 CD1 molecules on human dendritic cells by Leishmania species. Parasite Immunol. 2007 Oct;29(10):515-24.

174. Moir S, Malaspina A, Li Y, Chun TW, Lowe T, Adelsberger J, et al. B cells of HIV-1-infected patients bind virions through CD21-complement interactions and transmit infectious virus to activated T cells. J Exp Med. 2000 Sep 4;192(5):637-46.

175. Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. Nat Rev Immunol. 2008 Mar;8(3):205-17.

176. 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 Mar;68(3):1485-90.

177. 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 Dec;23(12):617-26.

178. Muxel SM, Freitas do Rosario AP, Sardinha LR, Castillo-Mendez SI, Zago CA, Rodriguez-Malaga SM, et al. Comparative Analysis of Activation Phenotype, Proliferation, and IFN-gamma Production by Spleen NK1.1(+) and NK1.1(-) T Cells During Plasmodium chabaudi AS Malaria. J Interferon Cytokine Res. 2010 Feb;30(6):417-26.

179. Elias RM, Sardinha LR, Bastos KR, Zago CA, da Silva AP, Alvarez JM, et al. Role of CD28 in polyclonal and specific T and B cell responses required for protection against blood stage malaria. J Immunol. 2005 Jan 15;174(2):790-9.

180. Xu H, Wipasa J, Yan H, Zeng M, Makobongo MO, Finkelman FD, et al. The mechanism and significance of deletion of parasite-specific CD4(+) T cells in malaria infection. J Exp Med. 2002 Apr 1;195(7):881-92.

181. Elliott SR, Kuns RD, Good MF. Heterologous Immunity in the Absence of Variant-Specific Antibodies after Exposure to Subpatent Infection with Blood-Stage Malaria. Infect and Immun. 2005 Apr.:2478–85.

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

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

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

185. Freitas do Rosário AP, Muxel SM , Rodriguez SM, Sardinha LR, Zago CA, Castillo-Méndez SI, Alvarez JM, D'Império Lima MR. T cells and not antibodies are responsible for the loss of full-protective immunity to blood-stage Plasmodium chabaudi AS malaria. J Immunol. 2008 Dec 15;181(12):8344-55.

186. Kinter AL, Godbout EJ, McNally JP, Sereti I, Roby GA, O'Shea MA, et al. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. J Immunol. 2008 Nov 15;181(10):6738-46.

187. Hoyer KK, Dooms H, Barron L, Abbas AK. Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease. Immunol Rev. 2008 Dec;226:19-28.

ANEXO A

Comparative Analysis of Activation Phenotype, Proliferation, and IFN-γ Production by Spleen NK1.1^{+} and NK1.1^{-} T cells During *Plasmodium chabaudi* AS Malaria

JOURNAL OF INTERFERON & CYTOKINE RESEARCH
Volume 30, Number 6, 2010
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/jir.2009.0095

Comparative Analysis of Activation Phenotype, Proliferation, and IFN-γ Production by Spleen NK1.1⁺ and NK1.1⁻ T Cells During *Plasmodium chabaudi* AS Malaria

Sandra Marcia Muxel, Ana Paula Freitas do Rosário, Luiz Roberto Sardinha, Sheyla Inés Castillo-Méndez, Cláudia Augusta Zago, Sérgio Marcelo Rodriguez-Málaga, José Maria Álvarez Mosig, and Maria Regina D'Império Lima

The NK1.1 molecule participates in NK, NKT, and T-cell activation, contributing to IFN-γ production and cytotoxicity. To characterize the early immune response to *Plasmodium chabaudi* AS, spleen NK1.1⁺ and NK1.1⁻ T cells were compared in acutely infected C57BL/6 mice. The first parasitemia peak in C57BL/6 mice correlated with increase in CD4⁺NK1.1⁺TCR-αβ⁺, CD8⁺NK1.1⁺TCR-αβ⁺, and CD4⁺NK1.1⁻TCR-αβ⁺ cell numbers per spleen, where a higher increment was observed for NK1.1⁺ T cells compared to NK1.1⁻ T cells. According to the ability to recognize the CD1d-α-GalCer tetramer, CD4⁺NK1.1⁺ cells in 7-day infected mice were not predominantly invariant NKT cells. At that time, nearly all NK1.1⁺ T cells and around 30% of NK1.1⁻ T cells showed an experienced/activated ($CD44^{HI}CD69^{HI}CD122^{HI}$) cell phenotype, with high expression of Fas and PD-L1 correlating with their low proliferative capacity. Moreover, whereas IFN-γ production by CD4⁺NK1.1⁺ cells peaked at day 4 p.i., the IFN-γ response of CD4⁺NK1.1⁻ cells continued to increase at day 5 of infection. We also observed, at day 7 p.i., 2-fold higher percentages of perforin⁺ cells in CD8⁺NK1.1⁺ cells compared to CD8⁺NK1.1⁻ cells. These results indicate that spleen NK1.1⁺ and NK1.1⁻ T cells respond to acute *P. chabaudi* malaria with different kinetics in terms of activation, proliferation, and IFN-γ production.

Introduction

The asexual blood-stage of the *Plasmodium* spp. is responsible for the pathology and morbidity caused by malaria, an infectious disease that remains the most devastating illness afflicting tropical countries. There are an estimated 350 to 500 million clinical malaria cases every year resulting in >1 million deaths, mostly children under 5 years of age (WHO 2007). The immune response to malaria involves the orchestration of a complex network of innate and adaptive immune cells that can result in both protection and disease. This complexity is exemplified by the fact that proinflammatory cytokines required for parasite control are also involved in malaria syndromes, such as cerebral malaria and anemia (Schofield and Grau 2005; Clark and others 2006). However, the immunological mechanisms responsible for these different outcomes are not yet fully understood, and the relative contribution of T-cell subpopulations remains unclear.

The acute phase of blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria, a suitable model for the human disease caused by *Plasmodium falciparum* (Cox and others 1987), is accompanied by intense lymphocyte activation with strong proliferation of splenic T and B cells and production of type 1 effector molecules, such as interferon-γ (IFN-γ), tumor necrosis factor-α (TNF-α), and IgG2a (Falanga and others 1987; Langhorne and others 1989; D'Imperio Lima and others 1996). The involvement of this response in mice resistance is suggested by the fact that IFN-γ (Stevenson and others 1990) and acute-phase antibodies (Mota and others 1998) have been implicated in the initial control of parasitemia. Moreover, parasite-reactive B cells are included among those cells polyclonally activated during acute infection (Lima and others 1991). The swiftness and magnitude of lymphocyte responses to *P. chabaudi* infection indicate the participation of cells from the innate immune system.

CD161 molecules comprise a family of C-type lectin receptors that includes NKRP1C (also known as CD161c), which is recognized by NK1.1 antibodies in C57BL/6 and C57BL/10 mouse strains (Huntington and others 2007). CD161/NK1.1

Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

molecule associates with the ITAM-containing FcεRIγ adapter and its cross-linking with anti-NK1.1 mAb induces NK-cell-mediated cytotoxicity and cytokine production (Arase and others 1996, 1997). NK1.1 molecule is expressed by all NK cells of C57BL/6 mice and in a heterogeneous subset of T cells (including $CD4^-CD8^-$, $CD4^+$, and $CD8^+$ T cells) commonly referred to as NKT cells, some of which recognize CD1d antigens (Bendelac and others 1995; Godfrey and others 2000). Thus, although NK1.1 expression is a feature of CD1d-restricted NKT cells, a proportion of $NK1.1^+$ T cells are restricted by MHC I and II molecules (Godfrey and others 2004). Moreover, after activation, NK1.1 expression can be suppressed in CD1d-restricted NKT cells (Chen and others 1997) and induced in conventional T cells (Slifka and others 2000). Among the CD1d-restricted NKT cells, the invariant NKT (iNKT) cells can be specifically activated by CD1d tetramers loaded with α-galactosylceramide (α-GalCer), a specific but artificial ligand for these cells (Kawano and others 1997). A considerable fraction of CD1d-restricted NKT cells uses the invariant Vα14Jα18 TCR-α chain, which is preferentially associated with TCR-β chains coded by *Vβ8*, *Vβ7*, and *Vβ2* gene segments (Godfrey and others 2004).

Because a considerable proportion of spleen T cells express the NK1.1 molecule during the acute phase of *P. chabaudi* malaria, we set out to compare the relative contribution of $NK1.1^+$ and $NK1.1^-$ T cells to the intense T-cell response against this parasite. CD1d-unrestricted $NK1.1^+$ T cells have been shown to play a protective role against liver stages of *Plasmodium yoelii* (Pied and others 2000). In addition, CD1d-restricted $NK1.1^+$ T cells contribute to the early immune response induced by *Plasmodium berghei* (Schmieg and others 2003) and *P. yoelii* (Mannoor and others 2001; Soulard and others 2007). Thus, characterizing spleen $NK1.1^+$ and $NK1.1^-$ T cells during the early stages of *P. chabaudi* infection could help toward understanding the role of lymphocyte subpopulations in malaria, elucidating the cellular and molecular pathways underlying the development of both protective and pathogenic immune responses.

Materials and Methods

Mice, parasites, and infection

Six- to 8-week-old C57BL/6 (originally from The Jackson Laboratory) male mice were bred under specific pathogen-free conditions at the Isogenic Mice Facility (Department of Immunology/University of São Paulo, Brazil). *P. chabaudi* AS was maintained as described elsewhere (Stevenson and others 1990). Mice were inoculated intraperitoneally with 10^6 infected red blood cells (iRBC). Parasitemias were monitored by microscopic examination of Giemsa-stained thin tail blood smears.

Spleen cell suspension

Spleen cells were washed and maintained in cold RPMI 1640, supplemented with penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 μg/mL), 2-mercaptoethanol (50 μM), L-glutamine (2 mM), sodium pyruvate (1 mM), and 3% heat-inactivated FCS. All supplements were purchased from Invitrogen Life Technologies. The numbers of cells per spleen were counted using a Neubauer chamber (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Phenotypic analysis of spleen cells

Spleen cells (10^6) were stained with APC-, PercP-, FITC-, PE-, or CyChrome (Cy)-labeled mAbs to CD4 (H129.19), CD8 (53-6.7), CD161/NK1.1 (PK 136), TCR-β chain (H57-597), CD44 (KM-201), CD69 (H1.2F3), CD122 (IL-2R chain β, TM-β1), Fas/CD95 (Jo2), Fas-L/CD95L (MFL3), PD-1/CD279 (J43), PD-L1/CD274 (B7-H1/MIH1), TCR-*Vβ7* (TR310), TCR-*Vβ8* (F23.1) from BD Pharmingen (San Diego, CA) and with PE-labeled CD1d-α-GalCer tetramer (La Jolla Institute for Allergy and Immunology, La Jolla, CA; NIH). Stained cells were analyzed by flow cytometry using a FACSCalibur device with CellQuest software (BD Biosciences, San Jose, CA).

IFN-γ and perforin intracellular detection

Concerning IFN-γ and perforin intracellular detection, spleen cells (10^6) were cultured with GolgiStop, according to the manufacturer's instructions, in the presence of 5 μg/mL plate-bound anti-CD3 mAb (145-2C11) or medium alone, for 10 h at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere. After washing, cells were surface-stained with FITC- and APC-labeled mAb to CD4 and CD8. Cells were then fixed with Cytofix/Cytoperm buffer and stained with APC- and PE-labeled mAb to IFN-γ (XMG-1.2) and perforin, diluted in Perm/Wash buffer, and analyzed by flow cytometry. All reagents were purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA).

CFSE proliferation assay

T-cell proliferation was measured as described elsewhere (Elias and others 2005). In brief, spleen cells (3×10^7) were incubated with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE; Molecular Probes, Eugene, OR), at a final concentration of 5 μM, diluted in PBS with 0.1% BSA, for 30 min at 37°C. Cells (10^6) were then cultured in 96-well plates (Costar, Cambridge, MA) with 5 μg/mL plate-bound anti-CD3 mAb or medium alone, for 72 h, at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere. After incubation, cells were stained with PE-, PercP-, and APC-labeled mAb to NK1.1, CD4, and CD8 from BD Pharmingen and analyzed by flow cytometry.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with Mann–Whitney *U*-test. The IFN-γ kinetics was compared with Tukey's multiple comparison tests. GraphPad Prism 4 software was used, where differences between groups were considered significant when $P < 0.05$ (5%).

Results

P. chabaudi *parasitemia peak correlates with high numbers of $NK1.1^+TCR\text{-}\alpha\beta^+$ and $NK1.1^-TCR\text{-}\alpha\beta^+$ cells per spleen*

To evaluate the kinetics of $NK1.1^+$ and $NK1.1^-$ T-cell populations in *P. chabaudi* malaria, C57BL/6 mice were infected with 10^6 iRBC. According to parasitemia curves, C57BL/6 mice developed a first peak at day 7 p.i. and recrudescent second peak at day 17 p.i. (Fig. 1A). The numbers of $CD4^+NK1.1^+TCR\text{-}\alpha\beta^+$, $CD8^+NK1.1^+TCR\text{-}\alpha\beta^+$, and $CD4^+NK1.1^-TCR\text{-}\alpha\beta^+$ cells per spleen progressively rose until

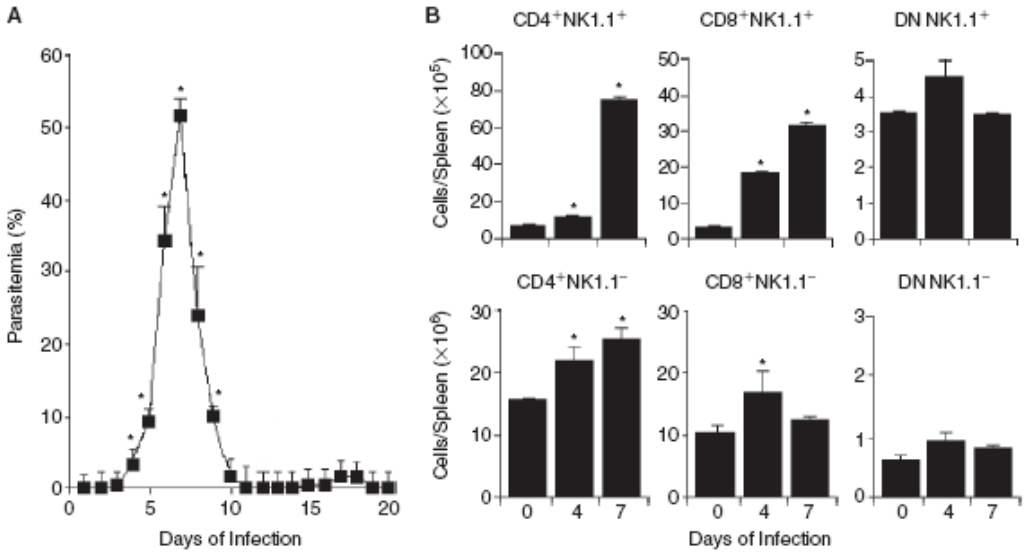

FIG. 1. Parasitemias and numbers of spleen NK1.1⁺TCR-αβ⁺ and NK1.1⁻TCR-αβ⁺ T cells in *P. chabaudi*-infected C57BL/6 mice. (**A**) Parasitemia curves in C57BL/6 mice infected with 10^6 infected red blood cell (iRBC). Each curve corresponds to the means ± SD ($n = 10$). $^*P < 0.05$, infected mice compared with noninfected mice. (**B**) Numbers per spleen of CD4⁺TCR-αβ⁺, CD8⁺TCR-αβ⁺, and CD4⁻CD8⁻TCR-αβ⁺ (DN, double negative) cells expressing NK1.1 molecule in C57BL/6 mice at days 4 and 7 p.i. with 10^6 iRBC. Noninfected mice were used as controls. Data represent the means ± SD ($n = 8$). $^*P < 0.05$, infected mice compared with noninfected mice. Data are representative of 3 repeat experiments.

day 7 p.i., with a higher increase for NK1.1⁺ T cells compared to NK1.1⁻ T cells (Fig. 1B). The differences in CD4⁻CD8⁻ T-cell subpopulations were not statistically significant. Among NK1.1⁺ T cells from 7-day infected mice, CD4⁺, CD8⁺, and CD4⁻CD8⁻ cells represented 63%, 33%, and 4%, respectively. On the other hand, at day 7 p.i., 19% of CD4⁺, 13% of CD8⁺, and 75% of CD4⁻CD8⁻ T cells expressed NK1.1 molecules. This analysis showed that CD4⁺NK1.1⁺TCR-αβ⁺ and CD8⁺NK1.1⁺TCR-αβ⁺ T-cell populations are largely increased in the spleen during the acute *P. chabaudi* malaria, even though CD4⁺NK1.1⁻TCR-αβ⁺ cells still represent the major T-cell population at the early infection.

Spleen NK1.1⁺TCR-αβ⁺ cells from P. chabaudi-*infected mice are not predominantly iNKT cells*

To verify if iNKT cells were included among the NK1.1⁺ T-cell population generated during acute *P. chabaudi* malaria, spleen cells recognizing CD1d-α-GalCer tetramer and expressing TCR-*Vβ7* and TCR-*Vβ8* chains were analyzed in noninfected mice (controls) and in 7-day infected C57BL/6 mice. In control mice, the majority of CD4⁺NK1.1⁺TCR-αβ⁺ and CD4⁻CD8⁻NK1.1⁺TCR-αβ⁺ cells were positive for CD1d-α-GalCer tetramer, while CD8⁺NK1.1⁺TCR-αβ⁺ cells were negative (Fig. 2A). At day 7 p.i., a sharp increase in percentages of NK1.1⁺ cells that were negative for CD1d-α-GalCer tetramer was observed in all T-cell subpopulations, whereas frequencies of CD1d-α-GalCer tetramer⁺ cells were consistently reduced. For the NK1.1⁻TCR-αβ⁺ cell subpopulation, only a small fraction of cells was positive for CD1d-α-GalCer tetramer in control and 7-day infected mice. As expected, higher percentages of *Vβ8*⁺ and *Vβ7*⁺ cells were observed in CD4⁺NK1.1⁺ cells compared to CD4⁺NK1.1⁻ cells. However, a decrease in *Vβ8*⁺ cell frequencies within the CD4⁺NK1.1⁺ and CD4⁺NK1.1⁻ cells occurred after infection, whereas *Vβ7*⁺ cell frequencies remained unchanged (Fig. 2B). To evaluate the possibility that upon activation iNKT cells have down-regulated the expression of their invariant TCR, we compared the expression of TCR-β chain in CD4⁺NK1.1⁺ and CD4⁺NK1.1⁻ cells. The data presented in Figure 2C show that TCR-β levels in CD4⁺NK1.1⁺ cells from 7-day infected mice were even higher than those levels found in CD4⁺NK1.1⁻ cells from both groups of mice. Moreover, the mean fluorescence intensity (MFI) of these CD4⁺NK1.1⁺ cells were 2-fold increased compared to their counterparts in noninfected mice. Taken together, these results suggested that the majority of spleen NK1.1⁺TCR-αβ⁺ cells generated in acutely *P. chabaudi*-infected mice were not iNKT cells.

The majority of NK1.1⁺ T cells and a considerable proportion of NK1.1⁻ T cells from the spleen of P. chabaudi-*infected mice have an experienced/activated cell phenotype*

To further characterize NK1.1⁺ and NK1.1⁻ T cells in *P. chabaudi*-infected mice, CD4⁺ and CD8⁺ cells from noninfected mice (controls) and 7-day infected C57BL/6 mice were evaluated according to surface markers highly expressed in experienced (CD44) or activated (CD69 and CD122) cells. Our data showed that NK1.1⁺ T cells from both groups of mice had similar phenotypes, which was characterized by high levels of CD44 and CD69 in CD4⁺NK1.1⁺ and CD8⁺NK1.1⁺ cells and of CD122 mostly in CD8⁺NK1.1⁺ cells (Fig. 3). On the other hand, around 30% of CD4⁺NK1.1⁻ and

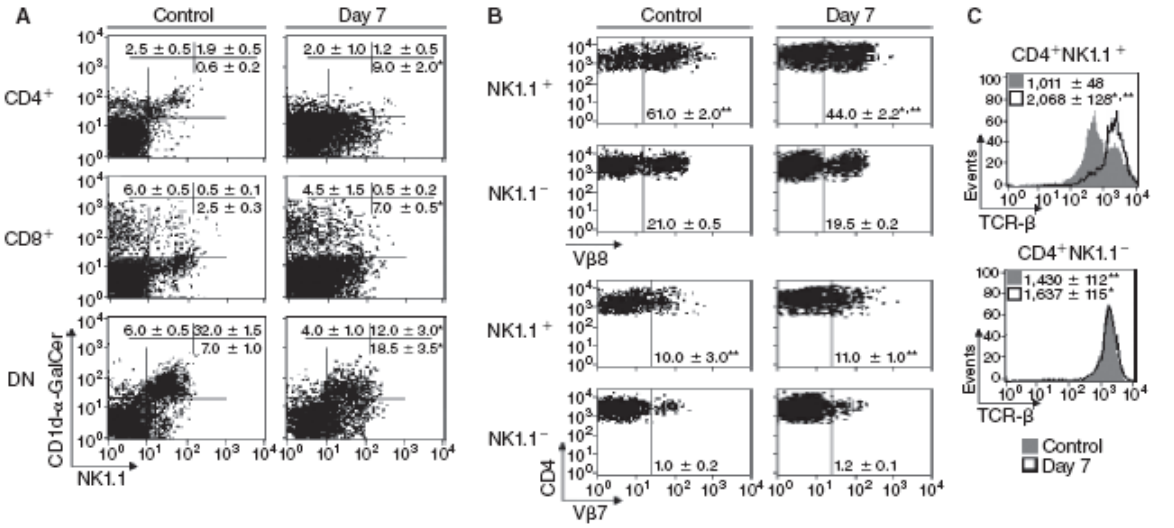

FIG. 2. Recognition of CD1d-α-GalCer tetramer and expression of TCR-*Vβ7* and TCR-*Vβ8* chains by spleen NK1.1+ and NK1.1− T cells from *P. chabaudi*-infected C57BL/6 mice. (**A**) Dot plots showing gated CD4+TCR-αβ+, CD8+TCR-αβ+, and CD4−CD8−TCR-αβ+ (DN, double negative) cells that recognize α-GalCer tetramer and express NK1.1 molecule at day 7 p.i. with 10^6 infected red blood cells (iRBCs). Noninfected mice were used as controls. Numbers in dot plots represent the means ± SD ($n = 4$–6) of the percentages of each subpopulation. $^*P < 0.05$, infected mouse cells compared with noninfected mouse cells. (**B**) Dot plots showing gated CD4+NK1.1+TCR-αβ+ and CD4+NK1.1−TCR-αβ+ cells that use the TCR-*Vβ7* and TCR-*Vβ8* chains at day 7 p.i. with 10^6 iRBC. Noninfected mice were used as controls. Numbers in dot plots represent the means ± SD ($n = 6$–8) of the percentages of positive cells. $^*P < 0.05$, infected mouse cells compared with noninfected mouse cells; $^{**}P < 0.05$, NK1.1+ cells compared with NK1.1− cells. (**C**) Histograms showing TCR-β expression in CD4+NK1.1+ and CD4+NK1.1− cells from the same groups of mice. Numbers in histograms represent the means ± SD ($n = 6$–8) of mean fluorescence intensity in gated CD4+NK1.1+ and CD4+NK1.1− cells. $^*P < 0.05$, infected mouse cells compared with noninfected mouse cells; $^{**}P < 0.05$, NK1.1+ cells compared with NK1.1− cells. Data are representative of 3 repeat experiments.

CD8+NK1.1− cells presented high levels of CD44 and CD69, whereas CD122 was expressed mainly in CD8+NK1.1− cells. The great majority of CD4+NK1.1+ and CD4+NK1.1− T cells from 7-day infected mice also presented increased amounts of CD45RB, a molecule highly expressed in naïve and activated cells but down-regulated in memory cells (data not shown). These results showed that the majority of spleen NK1.1+ T cells and a substantial proportion of spleen NK1.1− T cells had an experienced/activated cell phenotype during acute *P. chabaudi* infection.

Spleen NK1.1+ T cells from P. chabaudi*-infected mice show lower proliferative capacity compared to NK1.1− T cells*

To evaluate the proliferative capacity of NK1.1+ and NK1.1− T cells from *P. chabaudi*-infected C57BL/6 mice, CFSE-labeled spleen cells obtained at days 4 and 7 p.i. were kept in culture for 72 h alone (spontaneous proliferation) or in the presence of plate-bound anti-CD3 mAbs (stimulated proliferation). NK1.1+ T cells were then compared to NK1.1− T cells, for both CD4+ and CD8+ cell subsets. In uninfected animals, it appears that almost all the NK1.1−T cells have undergone one round of spontaneous cell division under the culture conditions used, while their NK1.1+ counterparts have not (Fig. 4). For the cells taken 4 days after infection, ~30% of the NK1.1− T cells have gained the ability to proceed through additional rounds of spontaneous proliferation, while most of their NK1.1+ counterparts appear to have undergone either no or only one cell division. At day 7 p.i., the spontaneous proliferation picture seems to resemble the controls, with the exception that the CD8+NK1.1+ cells exhibit a distinct double peak around the 0–1 or 1–2 division's mark. When stimulated with anti-CD3 mAbs, a strong proliferative response occurred at day 0, progressively decreasing after infection, where NK1.1+ T cells always showed lower scores compared to NK1.1− T cells. It is noteworthy that, at day 7 p.i., the percentages of cells proliferating in response to anti-CD3 mAbs were negligible for both NK1.1+ and NK1.1− T cells. These data showed that spleen NK1.1+ T cells generated during acute *P. chabaudi* malaria had lower proliferative capacity compared to NK1.1− T cells. They also indicated that T-cell proliferation was tightly regulated a week after infection when the whole T-cell population had impaired response to TCR stimulation.

Spleen NK1.1+ T cells from P. chabaudi*-infected mice express higher levels of Fas, Fas-L, PD-1, and PD-L1 molecules compared to NK1.1− T cells*

Fas–Fas-L (CD95–CD95L) and PD-1–PD-L1 signaling has been shown to abrogate T-cell proliferation through induction of *activation-induced cell death* (AICD) and dephosphorylation of TCR-associated signaling kinases, respectively

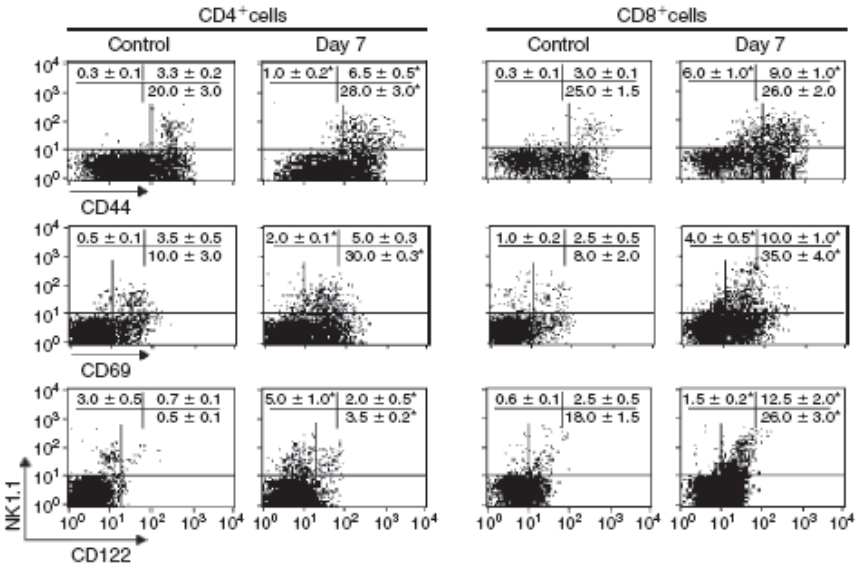

FIG. 3. Expression of CD44, CD69, CD122, and NK1.1 in spleen CD4+ and CD8+ T cells from *P. chabaudi*-infected C57BL/6 mice. Mice were analyzed at day 7 p.i. with 10^6 infected red blood cells (iRBCs). Noninfected mice were used as controls. Numbers in dot plots represent the means ± SD (n = 6–8) of the percentages of each subpopulation in gated CD4+ and CD8+ cells. *$P < 0.05$, infected mouse cells compared with noninfected mouse cells. Data are representative of 4 repeat experiments.

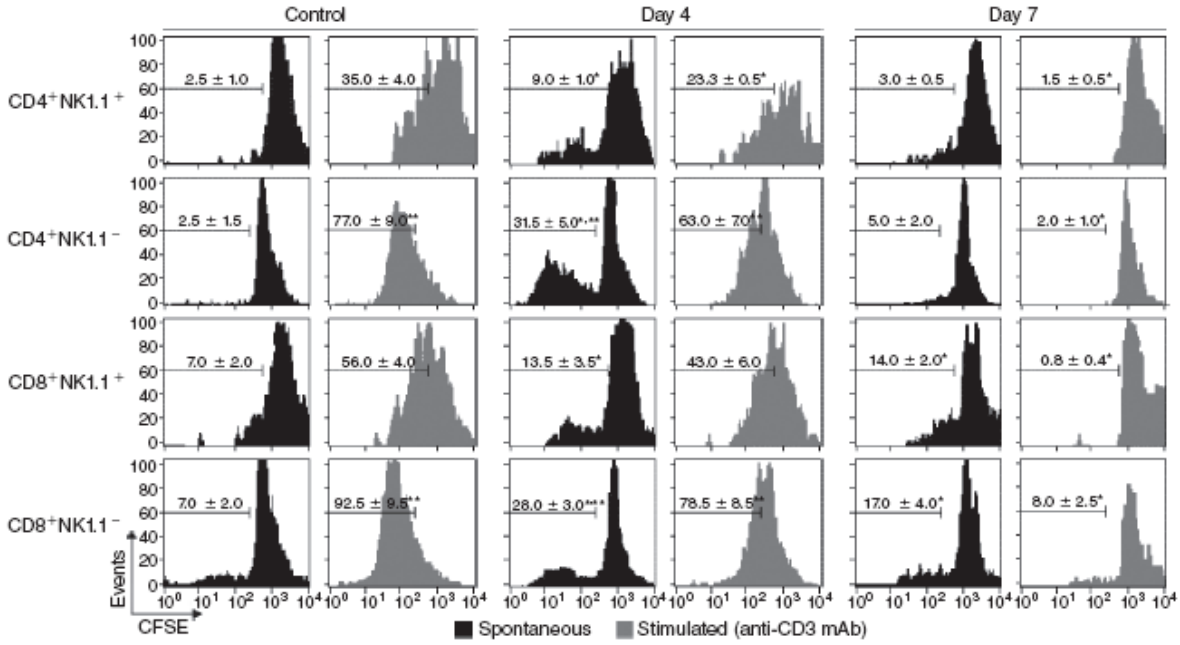

FIG. 4. Spontaneous and anti-CD3 mAb-stimulated proliferation of spleen NK1.1+ and NK1.1− T cells from *P. chabaudi*-infected C57BL/6 mice. Histograms show *in vitro* proliferation of CFSE-labeled spleen cells at days 4 and 7 p.i. with 10^6 infected red blood cells (iRBCs). Noninfected mice were used as controls. Cells were cultured for 72 h alone (spontaneous proliferation) or in the presence of plate-bound anti-CD3 mAbs (stimulated proliferation). Numbers in histograms represent the means ± SD (n = 8) of the percentages of replicating ($CFSE^{low}$) cells in gated CD4+NK1.1+, CD4+NK1.1−, CD8+NK1.1+, and CD8+NK1.1− cells. *$P < 0.05$, infected mouse cells compared with noninfected mouse cells; **$P < 0.05$, NK1.1+ cells compared with NK1.1− cells. Data are representative of 3 repeat experiments.

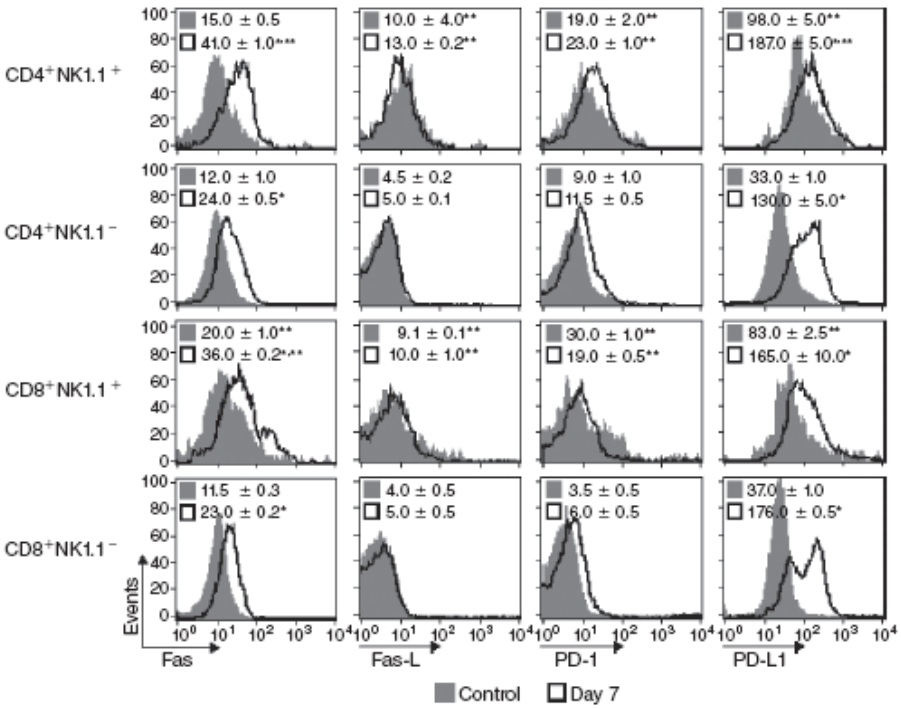

FIG. 5. Expression of Fas, Fas-L, PD-1, and PD-L1 in spleen NK1.1⁺ and NK1.1⁻ T cells from *P. chabaudi*-infected C57BL/6 mice. Histograms show spleen T cells at days 7 p.i. with 10^6 infected red blood cells (iRBCs). Noninfected mice were used as controls. Numbers in histograms represent the means ± SD (n = 4–6) of mean fluorescence intensity in gated CD4⁺NK1.1⁺, CD4⁺NK1.1⁻, CD8⁺NK1.1⁺, and CD8⁺NK1.1⁻ cells. *$P < 0.05$, noninfected mouse cells compared with infected mouse cells. **$P < 0.05$, NK1.1⁺ cells compared with NK1.1⁻ cells. Data are representative of 3 repeat experiments.

(Sharpe and Freeman 2002; Strasser and others 2009). To evaluate the role of these signaling pathways in T-cell proliferation during acute *P. chabaudi* malaria, the expression of Fas, Fas-L, PD-1, and PD-L1 was compared in NK1.1⁺ and NK1.1⁻ T cells from noninfected mice (controls) and 7-day infected C57BL/6 mice. Even before infection, higher levels of all these molecules were detected in CD4⁺NK1.1⁺ and CD8⁺NK1.1⁺ cells compared to the NK1.1⁻ T-cell subsets (Fig. 5). Moreover, after infection, there was a consistent increase in Fas and PD-L1 expression in CD4⁺NK1.1⁻ and CD8⁺NK1.1⁻ cells, whereas differences in Fas-L and PD-1 expression were not statistically significant. It is worth noting that, in most cases, NK1.1⁺ T cells from 7-day infected C57BL/6 mice showed the highest levels of these molecules, with the exception of PD-L1 molecules in CD8⁺ cells. These data showed that Fas, Fas-L, PD-1, and PD-L1 were predominantly expressed in spleen NK1.1⁺ T-cell populations, although Fas and PD-L1 were up-regulated in the majority of T cells at day 7 of infection.

Spleen NK1.1⁺ and NK1.1⁻ T cells from P. chabaudi-*infected mice produce IFN-γ with different kinetics*

To further characterize the phenotype of NK1.1⁺ and NK1.1⁻ T cells generated during acute *P. chabaudi* malaria, IFN-γ and perforin production was evaluated in infected C57BL/6 mice. To compare the kinetics of spontaneous and anti-CD3 mAb-stimulated IFN-γ production by CD4⁺NK1.1⁺ and CD4⁺NK1.1⁻ cells, this analysis was performed at days 3, 4, and 5 of infection. A significant increase in IFN-γ intracellular staining was detected at day 3 p.i., but was only observed in CD4⁺NK1.1⁺ cells that had been stimulated with anti-CD3 mAb (Fig. 6A). At day 4 p.i., spontaneous IFN-γ production was significantly enhanced in CD4⁺NK1.1⁺ cells, whereas under anti-CD3 mAb stimulation a portion of both CD4⁺NK1.1⁺ and CD4⁺NK1.1⁻ cells was positive. Notably, at this time point, the percentages of IFN-γ⁺ cells were always higher for CD4⁺NK1.1⁺ cells compared to CD4⁺NK1.1⁻ cells. At day 5 p.i., while IFN-γ⁺ cell percentages declined within CD4⁺NK1.1⁺ cells, an increase of these values was observed within CD4⁺NK1.1⁻ cells. When CD4⁺ cell number per spleen was considered, we found 10-fold increase in CD4⁺NK1.1⁺IFN-γ⁺ cell population at day 4 p.i. compared to control, which was remained at similar levels at day 5 p.i. (Fig. 6B). In contrast, the CD4⁺NK1.1⁻IFN-γ⁺ cell population increased 10- and 25-fold at days 4 and 5 p.i., respectively. Because of this different kinetics, around 30% of CD4⁺IFN-γ⁺ cells expressed NK1.1 at day 4 p.i., while this proportion fell to nearly 15% at day 5 of infection. For intracellular perforin staining, the percentages of positive cells were significantly higher at day 7 p.i., when 2-fold higher values were detected in CD8⁺NK1.1⁺ cells compared to CD8⁺NK1.1⁻ cells, representing 38% of CD8⁺perforin⁺ cells (Fig. 6C). These results showed a different kinetics of IFN-γ production by spleen NK1.1⁺ and NK1.1⁻ T cells during acute *P. chabaudi* infection. These T-cell subpopulations also differ in perforin production.

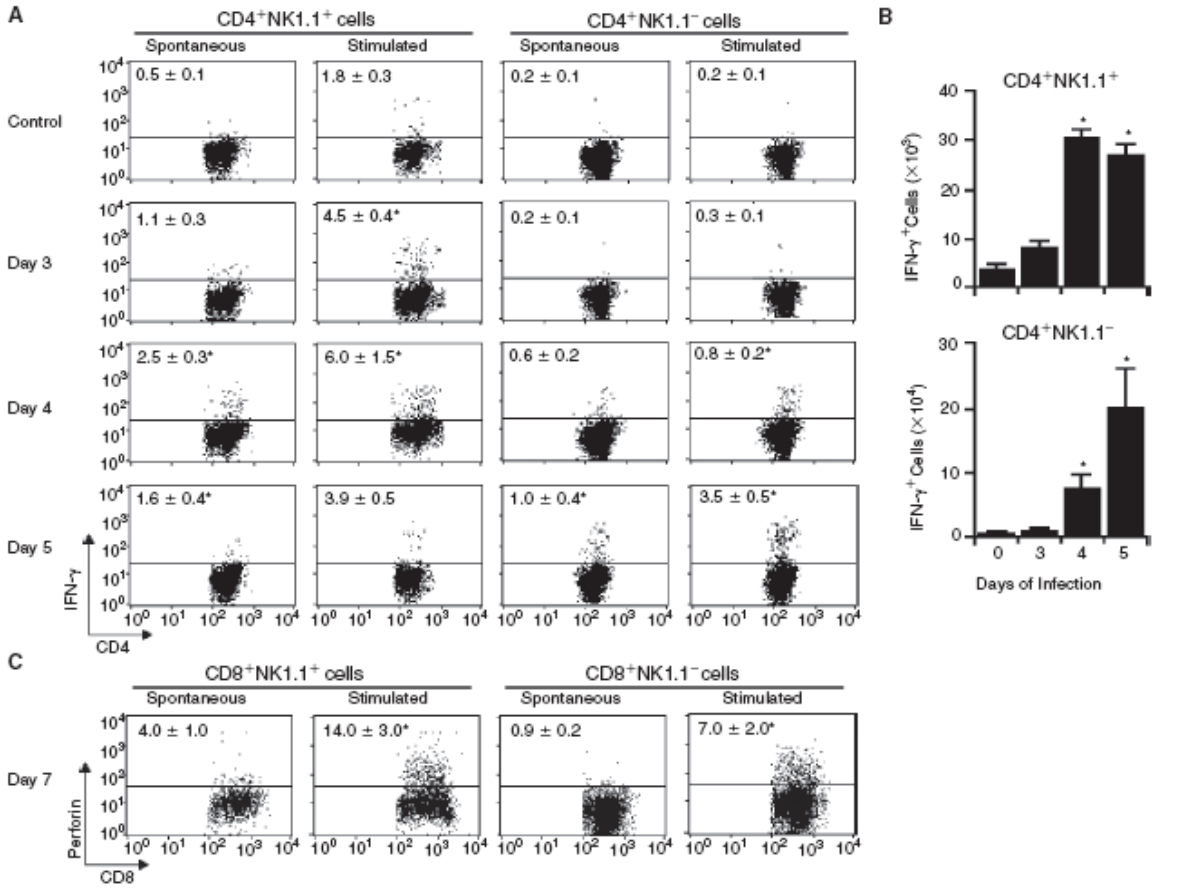

FIG. 6. Production of IFN-γ and perforin by spleen T cells from *P. chabaudi*-infected C57BL/6 mice. (**A**) Dot plots showing gated CD4+NK1.1+ and CD4+NK1.1− cells stained for intracellular interferon-γ (IFN-γ) in WT mice at days 3, 4, and 5 p.i. with 10^6 infected red blood cells (iRBCs). Numbers in dot plots represent the means ± SD (n = 4–5) of IFN-γ+ cell percentages. *$P < 0.05$, infected mouse cells compared with noninfected mouse cells. (**B**) Numbers of CD4+NK1.1+IFN-γ+ and CD4+NK1.1−IFN-γ+ cells per spleen in mice described in (**A**). *$P < 0.05$, infected mice compared with noninfected mice. (**C**) Dot plots showing gated CD8+NK1.1+ and CD8+NK1.1− cells stained for intracellular perforin at day 7 p.i. with 10^6 iRBC. Numbers in dot plots represent the means ± SD (n = 4–5) of perforin+ cell percentages. *$P < 0.05$, infected mouse cells compared with noninfected mouse cells. In (**A–C**), cells were cultured for 10 h alone (spontaneous production) or in the presence of plate-bound anti-CD3 mAbs (stimulated production). Noninfected mice were used as controls. Data are representative of 3 repeat experiments.

Discussion

We have previously observed that a considerable proportion of spleen T cells express the NK1.1 molecule during the acute phase of blood-stage *P. chabaudi* AS infection. To investigate the role of these lymphocyte subpopulations, we have compared spleen NK1.1+ and NK1.1− T-cell responses at the early infection. Our results have shown that these T-cell subpopulations respond to parasites with different kinetics in terms of activation, proliferation, and IFN-γ production.

In our study, most CD4+NK1.1+ and CD8+NK1.1+ T cells observed in the spleen of acutely infected mice present the characteristic phenotype of activated/experienced cells, expressing high levels of CD44, CD69, and CD122 (mainly for CD8+ cells). A similar phenotype has also been described in liver NK1.1+ T cells from *P. yoelii*-infected mice (Pied and others 2000; Soulard and others 2007). Although in our study CD4+NK1.1+ T cells can be restricted by CD1d, they are not iNKT cells since they do not recognize the CD1d-αGalCer tetramer and do not preferentially use the TCR-*V*β8 molecule. The possibility that upon activation iNKT cells have down-regulated the expression of their invariant TCR, making difficult their identification (Wilson and others 2003), is unlikely taking into account the high levels of TCR molecules expressed in spleen CD4+NK1.1+ T cells from the acute infection. In agreement with these findings, Soulard and collaborators showed that the iNKT cell population from the liver, but not the spleen, is expanded in *P. yoelii* infection (Soulard and others 2007). Yet, our data showing that NK1.1+ T cells in *P. chabaudi*-infected mice and iNKT cells in noninfected mice present similar phenotypes suggests that these populations share common effector functions, despite having different specificities. This is an interesting observation since most studies on this subject address type I NKT cells

(iNKT cells) and much less is known about type II NKT cells, which express more diverse TCRs and therefore are difficult to characterize (Godfrey and Berzins 2007).

Another interesting finding of our study is that spleen NK1.1⁻ T cells proliferate vigorously at day 4 p.i. but still respond to further TCR signaling, while at day 7 p.i. both T-cell subsets fail to proliferate even after strong TCR stimulation. Although the molecular mechanism involved in the early T-cell response to *P. chabaudi* is poorly understood, these results indicate that spleen T cells undergo a well-defined cell program that allows intense proliferation at the first day of infection, which is followed by tight regulation of this response at the peak of parasitemia. The expression of regulatory molecules on T cells may be responsible for limiting this proliferative response since they are increased in acutely infected mice. Indeed, NK1.1⁺ T cells seem to be highly regulated regardless if they are taken from noninfected or infected mice. According to our data, these cells show lower spontaneous and TCR-stimulated proliferation compared to NK1.1⁻ T cells, which correlates with higher surface levels of Fas, Fas-L, PD-1, and PD-L1 molecules. At day 7 p.i., the increase in expression of Fas and PD-L1 by NK1.1⁻ T cells is also associated with impaired proliferative response. IL-2, a cytokine produced during the early infection (Zago and others, manuscript in preparation), could be responsible for inducing these regulatory molecules since it participates in both Fas–Fas-L-mediated AICD (Hoyer and others 2008) and PD-1–PD-L1-mediated unresponsiveness (Kinter and others 2008). IL-2 production could also be involved in the increase of NK1.1 molecules in spleen T cells from *P. chabaudi*-infected mice since *in vitro* stimulation of CD8⁺ T cells by IL-2 is able to up-regulate NK1.1 expression on the cell surface and these IL-2-induced CD8⁺NK1.1⁺ T cells are not iNKT cells (Assarsson and others 2000).

The Fas–Fas-L pathway is involved in the apoptosis of spleen lymphocytes during acute *P. chabaudi* infection, which may contribute to homeostasis of the immune system (Helmby and others 2000; Sanchez-Torres and others 2001; Xu and others 2002; Elias and others 2005). Although we have shown that apoptosis induced by high acute-phase parasitemias does not prevent the generation of memory T and B cells (Freitas do Rosario and others 2008), it can certainly hinder the strength of specific immunity to the parasite (Xu and others 2002; Elliott and others 2005). On the other hand, the PD-1–PD-L1 pathway may also minimize immune-mediated damage to the host by suppressing certain effectors functions upon TCR engagement, without interfering with cytokine-driven T-cell expansion/survival (Kinter and others 2008). Because of this, we can envisage that high expression of PD-L1 in both NK1.1⁺ and NK1.1⁻ T cells from 7-day infected mice is a potent molecular mechanism to avoid further TCR-mediated T-cell signaling. This could protect mice from the deleterious effects of over activation of the immune system, allowing the development of memory T cells through cytokine-driven survival signals. To the best of our knowledge, the PD-1 and PD-L1 data presented here are the first descriptions of changes in these molecules during malaria, and experiments using blocking antibodies are currently in progress to determine their role in the regulation of immune response to acute *P. chabaudi* infection.

Spleen NK1.1⁺ T cells induced during early *P. chabaudi* infection present an experienced/activated phenotype, expressing high levels of activation molecules (CD69 and CD122) and producing IFN-γ and perforin. Corroborating our results, spleen NK1.1⁺TCR-β⁺ cells from *P. yoelii*-infected mice are biased toward the capacity to produce TNF-α and IFN-γ but not IL-4 (Soulard and others 2007). Most importantly, our results showing different kinetics of IFN-γ production between spleen CD4⁺NK1.1⁺ and CD4⁺NK1.1⁻ T cells, with an earlier response of cells expressing NK1.1, support the notion that these cells belong to distinct T-cell subsets. Furthermore, the rapid decrease in the proportion of IFN-γ-producing CD4⁺NK1.1⁺ T cells from day 4 to 5 p.i. indicates that the effector role of this population is restricted to the first days of infection, whereas the importance of CD4⁺NK1.1⁻ T cells increases with time. Similarly to these results, both NK1.1⁺ and NK1.1⁻ T cells have been associated with resistance to *P. yoelii* parasites (Pied and others 2000; Mannoor and others 2001; Soulard and others 2007), where the involvement of NK1.1⁺ T cells is larger at day 5 p.i. and decreases thereafter (Soulard and others 2009). Thus, the main contribution of spleen CD4⁺NK1.1⁺ cells in murine malaria appears to be related to their capacity to rapidly sense the infection, which may accelerate the activation of other cells from the immune system, guaranteeing an optimized parasite control. Corroborating this notion, it has been recently shown that the cross talk between dendritic cells and NK cells is of major importance for induction of an efficient Th1 cell priming and resolution of *P. chabaudi* infection (Ing and others 2009).

The involvement of perforin-producing CD8⁺NK1.1⁺ cells in protection against blood stages of *P. chabaudi* seems unlikely given the lack of MHC class I molecules in erythrocytes. Even so, it has been shown that NKT cells can mediate *P. berghei*-induced liver injury by a mechanism that is independent of CD1d- and MHC-restricted interactions (Adachi and others 2004). On the other hand, perforin-mediated CD8⁺ T-cell cytotoxicity is known to participate in *P. berghei* ANKA malaria pathogenesis since mice lacking this molecule are protected from development of cerebral malaria (Nitcheu and others 2003). Likewise, CD8⁺ T cells have been implicated in the immune-mediated pathology of the spleen as a result of *P. chabaudi* infection, by determining the loss of marginal metallophilic macrophages (Beattie and others 2006). The role of perforin-producing CD8⁺NK1.1⁺ cells in these processes remains to be established.

We believe that this analysis will help to further establish the relative contribution of NK1.1⁺ and NK1.1⁻ T cells in mediating the immune response during acute *Plasmodium* infection. This knowledge can help to improve our understanding on the complex network of innate and adaptive immune cells required for both parasite control and development of malaria syndromes. Characterizing the immunological mechanisms responsible for different outcomes of malaria can improve strategies aimed at eliciting protection against disease.

Acknowledgments

We thank Meire Ioshie Hiyane and Rogério Silva Nascimento for technical assistance and Dr. Mitchell Kronenberg and NIH (National Institutes of Health—USA) Tetramer Facility for providing the CD1d-α-GalCer tetramer. This study was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo—Brazil) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—Brazil).

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

Adachi K, Tsutsui H, Seki E, Nakano H, Takeda K, Okumura K, Van Kaer L, Nakanishi K. 2004. Contribution of CD1d-unrestricted hepatic DX5+ NKT cells to liver injury in *Plasmodium berghei*-parasitized erythrocyte-injected mice. Int Immunol 16(6):787–798.

Arase H, Arase N, Saito T. 1996. Interferon gamma production by natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells upon NKR-P1 cross-linking. J Exp Med 183(5):2391–2396.

Arase N, Arase H, Park SY, Ohno H, Ra C, Saito T. 1997. Association with FcRgamma is essential for activation signal through NKR-P1 (CD161) in natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells. J Exp Med 186(12):1957–1963.

Assarsson E, Kambayashi T, Sandberg JK, Hong S, Taniguchi M, Van Kaer L, Ljunggren HG, Chambers BJ. 2000. CD8+ T cells rapidly acquire NK1.1 and NK cell-associated molecules upon stimulation *in vitro* and *in vivo*. J Immunol 165(7):3673–3679.

Beattie L, Engwerda CR, Wykes M, Good MF. 2006. CD8+ T lymphocyte-mediated loss of marginal metallophilic macrophages following infection with *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. J Immunol 177(4):2518–2526.

Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR, Brutkiewicz RR. 1995. CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. Science 268(5212):863–865.

Chen H, Huang H, Paul WE. 1997. NK1.1+ CD4+ T cells lose NK1.1 expression upon *in vitro* activation. J Immunol 158(11):5112–5119.

Clark IA, Budd AC, Alleva LM, Cowden WB. 2006. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. Malar J 5:85.

Cox J, Semoff S, Hommel M. 1987. *Plasmodium chabaudi*: a rodent malaria model for in-vivo and in-vitro cytoadherence of malaria parasites in the absence of knobs. Parasite Immunol 9(5):543–561.

D'Imperio Lima MR, Alvarez JM, Furtado GC, Kipnis TL, Coutinho A, Minoprio P. 1996. 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 43(3):263–270.

Elias RM, Sardinha LR, Bastos KR, Zago CA, da Silva AP, Alvarez JM, Lima MR. 2005. Role of CD28 in polyclonal and specific T and B cell responses required for protection against blood stage malaria. J Immunol 174(2):790–799.

Elliott SR, Kuns RD, Good MF. 2005. Heterologous immunity in the absence of variant-specific antibodies after exposure to subpatent infection with blood-stage malaria. Infect Immun 73(4):2478–2485.

Falanga PB, D'Imperio Lima MR, Coutinho A, Pereira da Silva L. 1987. Isotypic pattern of the polyclonal B cell response during primary infection by *Plasmodium chabaudi* and in immune-protected mice. Eur J Immunol 17(5):599–603.

Freitas do Rosario AP, Muxel SM, Rodriguez-Malaga SM, Sardinha LR, Zago CA, Castillo-Mendez SI, Alvarez JM, D'Imperio Lima MR. 2008. Gradual decline in malaria-specific memory T cell responses leads to failure to maintain long-term protective immunity to *Plasmodium chabaudi* AS despite persistence of B cell memory and circulating antibody. J Immunol 181(12):8344–8355.

Godfrey DI, Berzins SP. 2007. Control points in NKT-cell development. Nat Rev Immunol 7(7):505–518.

Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. 2000. NKT cells: facts, functions and fallacies. Immunol Today 21(11):573–583.

Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. 2004. NKT cells: what's in a name? Nat Rev Immunol 4(3):231–237.

Helmby H, Jonsson G, Troye-Blomberg M. 2000. Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. Infect Immun 68(3):1485–1490.

Hoyer KK, Dooms H, Barron L, Abbas AK. 2008. Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease. Immunol Rev 226:19–28.

Huntington ND, Vosshenrich CA, Di Santo JP. 2007. Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. Nat Rev Immunol 7(9):703–714.

Ing R, Stevenson MM. 2009. Dendritic cell and NK cell reciprocal cross talk promotes gamma interferon-dependent immunity to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection in mice. Infect Immun 77(2):770–782.

Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, Ueno H, Nakagawa R, Sato H, Kondo E, Koseki H, Taniguchi M. 1997. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. Science 278(5343):1626–1629.

Kinter AL, Godbout EJ, McNally JP, Sereti I, Roby GA, O'Shea MA, Fauci AS. 2008. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. J Immunol 181(10):6738–6746.

Langhorne J, Gillard S, Simon B, Slade S, Eichmann K. 1989. Frequencies of CD4+ T cells reactive with *Plasmodium chabaudi chabaudi*: distinct response kinetics for cells with Th1 and Th2 characteristics during infection. Int Immunol 1(4):416–424.

Lima MR, Bandeira A, Falanga P, Freitas AA, Kipnis TL, da Silva LP, Coutinho A. 1991. Clonal analysis of B lymphocyte responses to *Plasmodium chabaudi* infection of normal and immunoprotected mice. Int Immunol 3(12):1207–1216.

Mannoor MK, Weerasinghe A, Halder RC, Reza S, Morshed M, Ariyasinghe A, Watanabe H, Sekikawa H, Abo T. 2001. Resistance to malarial infection is achieved by the cooperation of NK1.1(+) and NK1.1(–) subsets of intermediate TCR cells which are constituents of innate immunity. Cell Immunol 211(2):96–104.

Mota MM, Brown KN, Holder AA, Jarra W. 1998. 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 66(9):4080–4086.

Nitcheu J, Bonduelle O, Combadiere C, Tefit M, Seilhean D, Mazier D, Combadiere B. 2003. Perforin-dependent brain-infiltrating cytotoxic CD8+ T lymphocytes mediate experimental cerebral malaria pathogenesis. J Immunol 170(4):2221–2228.

Pied S, Roland J, Louise A, Voegtle D, Soulard V, Mazier D, Cazenave PA. 2000. Liver CD4-CD8– NK1.1+ TCR alpha beta intermediate cells increase during experimental malaria infection and are able to exhibit inhibitory activity against the parasite liver stage *in vitro*. J Immunol 164(3):1463–1469.

Sanchez-Torres L, Rodriguez-Ropon A, Aguilar-Medina M, Favila-Castillo L. 2001. Mouse splenic CD4+ and CD8+ T cells undergo extensive apoptosis during a *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS infection. Parasite Immunol 23(12):617–626.

Schmieg J, Gonzalez-Aseguinolaza G, Tsuji M. 2003. The role of natural killer T cells and other T cell subsets against infection by the pre-erythrocytic stages of malaria parasites. Microbes Infect 5(6):499–506.

Schofield L, Grau GE. 2005. Immunological processes in malaria pathogenesis. Nat Rev Immunol 5(9):722–735.

Sharpe AH, Freeman GJ. 2002. The B7-CD28 superfamily. Nat Rev Immunol 2(2):116–126.

Slifka MK, Pagarigan RR, Whitton JL. 2000. NK markers are expressed on a high percentage of virus-specific CD8+ and CD4+ T cells. J Immunol 164(4):2009–2015.

Soulard V, Roland J, Gorgette O, Barbier E, Cazenave PA, Pied S. 2009. An early burst of IFN-gamma induced by the pre-erythrocytic stage favours *Plasmodium yoelii* parasitaemia in B6 mice. Malar J 8:128.

Soulard V, Roland J, Sellier C, Gruner AC, Leite-de-Moraes M, Franetich JF, Renia L, Cazenave PA, Pied S. 2007. Primary infection of C57BL/6 mice with *Plasmodium yoelii* induces a heterogeneous response of NKT cells. Infect Immun 75(5):2511–2522.

Stevenson MM, Tam MF, Belosevic M, van der Meide PH, Podoba JE. 1990. Role of endogenous gamma interferon in host response to infection with blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS. Infect Immun 58(10):3225–3232.

Strasser A, Jost PJ, Nagata S. 2009. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. Immunity 30(2):180–192.

WHO. 2007. Malaria, other vectorborne and parasitic diseases: Regional trend in cases and deaths. Available at http://www.wpro.who.int/sites/mvp/data/

Wilson MT, Johansson C, Olivares-Villagomez D, Singh AK, Stanic AK, Wang CR, Joyce S, Wick MJ, Van Kaer L. 2003. The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion. Proc Natl Acad Sci U S A 100(19):10913–10918.

Xu H, Wipasa J, Yan H, Zeng M, Makobongo MO, Finkelman FD, Kelso A, Good MF. 2002. The mechanism and significance of deletion of parasite-specific CD4(+) T cells in malaria infection. J Exp Med 195(7):881–892.

Address correspondence to:
Dr. Sandra Marcia Muxel
Departamento de Imunologia
ICB, Avenue
Prof. Lineu Prestes, 1730
Universidade de São Paulo
São Paulo, SP CEP-05508-000
Brazil

E-mail: sandrammuxel@gmail.com

Received 28 August 2009/Accepted 2 November 2009