### **HENRIQUE BORGES DA SILVA**

# Mecanismos efetores da resposta imune à malária experimental

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

São Paulo 2014

#### **HENRIQUE BORGES DA SILVA**

## Mecanismos efetores da resposta imune à malária experimental

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Regina D'Império Lima

Versão Original

São Paulo 2014 DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Silva, Henrique Borges da.

Mecanismos efetores da resposta imune à malária experimental / Henrique Borges da Silva. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. 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 Doenças Infecciosas.

Versão do título para o inglês: Immune system effector mechanisms against experimental malaria.

1. Plasmodium 2. Malária 3. Imunidade 4. Fagocitose 5. Camundongo 6. Linfócitos I. Lima, Profa. Dra. Maria Regina D'Império II. Universiade de São Paulo. Instituto de Ciência Biomedicas III. Título.

ICB/SBIB040/2014

#### UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Henrique Borges da Silva.				
Título da Tese:	Mecanismos efetores da resposta imune à malária experimental.				
Orientador(a):	Profa. Dra. Maria Regina D'Império Lima.				
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão					
públic	ca 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 Universitària "Armando de Salles Ollveira" Av. Prnf. Lineu. Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone :(55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.osp.bt

COMESÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Deci. CEUA.114./2013.

#### DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 175/CEUA, datado de 14.12.11 e por solicitação da Profa. Dra. Maria Regina D'Império Lima, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do aluno Henrique Borges da Silva ao Projeto de Pesquisa "Avaliação da resposta imme na malária murina causada pelo Plasmedium Chobaudi", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 09 de outubro de 2013.

L'Mund.

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

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Regina D'Império Lima. O presente projeto recebeu auxílio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) - processo número 2011/24038-1 e bolsa de Doutorado Direto - processo número 2009/ 08559-1.

Dedico este trabalho a Deus e minha família

#### AGRADECIMENTOS

Devo agradecer em primeiro lugar a Deus por me dar forças para seguir em frente sempre, e por ter conseguido nos últimos anos crescer e ter um norte moral. Tenho certeza que se eu não acreditasse, minha trajetória teria sido muito mais difícil – e olha que foi difícil!

Devo agradecer também a minha família – meus pais e minha irmã – pelo apoio recebido durante toda a minha vida, até o presente momento.

Obviamente não posso deixar de agradecer a Dr<sup>a</sup> Maria Regina D'Império Lima simplesmente por me dar uma oportunidade quando, confesso, nem eu mesmo acreditava que eu poderia ser algo próximo de um pesquisador. E, claro, não posso esquecer-me da convivência agradável ao longo destes quase 7 anos.

Tenho que agradecer também ao Pepe por anos e anos de dicas, ajudas e conversas agradáveis.

Assim como jamais poderia deixar de agradecer ao Dr<sup>o</sup> Carlos Eduardo Tadokoro (Kadu), por ter sido meu co-orientador *de facto*, e, mais do que isso, praticamente um irmão mais velho enquanto estive em Portugal.

Com relação aos colegas e amigos do laboratório, poxa vida! É uma quantidade imensa de pessoas para agradecer, afinal de contas são 7 anos. Vi pessoas chegarem e irem embora... Então desde já peço desculpas se eu esquecer alguém. Mas obrigatoriamente tenho que agradecer aos colegas e amigos mais próximos que fiz ao longo dos anos: a Meire, o Rogério e o Sergio durante os primeiros anos, depois o Eduardo, a Érika, mais tarde ainda o Rafael, a Bia, e mais por último o Caio, a Rosana, a Maria, a Alexandra. Isso fora os que já estavam aqui antes como o Luizão, o Christian, o Fernandão (que virou técnico do *sorting* depois), a Sandra, a Ana Paula (que voltou), a Claudia... E também os que chegaram depois, como a Mariana, a Áurea, o Ronald, a Priscila. De novo, se eu estiver esquecendo alguém, me desculpe!

E em Portugal, no Laboratório de Imunorregulação, minha segunda casa, jamais me esquecerei das amizades. Kadu, Susana, Isadora, Ivan, Marcia, Flávia, Mariana Silva (desculpe-me, mas Messi ainda é melhor do que Cristiano Ronaldo!), vocês fizeram parte de um período inesquecível da minha trajetória. E tome café para aguentar! Tenho que agradecer também os secretários do Departamento de Imunologia, pela imensa ajuda ao longo dos anos: Eni, Amarildo (*in memoriam*), João, Jotelma, Amanda, muito obrigado!

Meus agradecimentos também aos funcionários do Departamento: Otacílio, Miltão, Moisés, Márcio, muito obrigado também!

Agradeço também a todos os meus colaboradores e amigos de outros laboratórios, em especial devo lembrar-me do Dr<sup>o</sup> Cláudio Marinho e alunos, Dr<sup>a</sup> Silvia Boscardin e alunos, Dr<sup>a</sup> Sabrina Epiphanio e alunos, Dr<sup>a</sup> Eliana Faquim e alunos, Dr<sup>a</sup> Joanne Thompson (Edinburgo), Dr<sup>a</sup> Jean Langhorne (Londres), Dr<sup>a</sup> Maria Mota (Lisboa), Dr<sup>o</sup> David Olivieri (Vigo).

Agradeço também a minha banca de qualificação pelas sugestões, que com certeza aumentaram a qualidade do meu trabalho: Dr<sup>o</sup> Niels Olsen Saraiva Câmara, Dr<sup>o</sup> Alexandre Keller, Dr<sup>o</sup> Marcelo Urbano Ferreira, muito obrigado!

Por fim, e não menos importante, devo agradecer a Raíssa, por ter entrado na minha vida, e ser, mais do que uma ótima amiga, colega de trabalho, minha companheira, meu amor, e agora parte da minha família. Obrigado por me dar a sensação de amar e ser amado!

"Contestar o sentido da vida é a mais verdadeira expressão do estado do ser humano."

Vitor Frankl, médico e sobrevivente do Holocausto (1905-1997)

#### RESUMO

BORGES DA SILVA, H. **Mecanismos efetores da resposta imune à malária experimental.** 2014. (137 f). [Tese (Doutorado em Imunologia)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014

Estima-se que a malária seja responsável por um milhão de mortes anuais, atingindo principalmente crianças. O sistema imune exerce uma contribuição fundamental na proteção contra a infecção pelo plasmódio, o agente causador da malária. Entre os mecanismos envolvidos no controle dos parasitas do sangue destacam-se aqueles mediados por anticorpos. Entretanto, outros mecanismos do sistema imune também parecem exercer papéis fundamentais, e ao mesmo tempo foram pouco estudados. Por exemplo, acredita-se que boa parte da eliminação dos eritrócitos infectados da circulação durante a fase aguda da infecção sanguínea é feita através da fagocitose por células especializadas. Porém, uma descrição mais detalhada da importância relativa de cada tipo de fagócito durante esse processo não existe ainda. Outro importante aspecto da imunidade contra a malária reside na geração de populações de células T CD4<sup>+</sup> de memória. Já é bem estabelecido que a presença de células T CD4<sup>+</sup> de memória efetora em indivíduos infectados ou em modelos de malária experimental é fundamental para a manutenção da imunidade clínica e contra novas infecções, e que tal imunidade desaparece quando indivíduos infectados saem da área endêmica ou eliminam a parasitemia residual pelo uso de antimaláricos. Entretanto, os mecanismos pelos quais tal imunidade é mantida no primeiro caso, e perdida no segundo caso, ainda são desconhecidos - embora já se saiba que populações de células T CD4<sup>+</sup> de memória central são encontradas em indivíduos susceptíveis a novas infeccões. O presente trabalho, desta forma, teve como objetivo descrever alguns dos mecanismos efetores importantes na resposta imune à malária experimental. O projeto subdivide-se em duas partes: a) verificar a relação entre o priming por IFN-y – que já é descrito como crucial para a imunidade durante a primeira fase da infecção sanguínea – e a imunidade ao parasita durante a fase crônica da infecção sanguínea pelo Plasmodium; e b) descrever separadamente o papel de células dendríticas e macrófagos do bsco na fagocitose de eritrócitos infectados durante a infecção em modelo experimental, e o subsequente papel destas células na resposta imune durante esse período. Os resultados obtidos neste projeto deverão contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos na imunidade contra a malária.

**Palavras-chave**: *Plasmodium*. Malária. Imunidade. Fagocitose. Camundongo. Linfócitos.

## ABSTRACT

BORGES DA SILVA, H. Effector mechanisms of the immune responses to experimental malaria. 2014. (137 p). [Thesis (PhD em Immunology)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014

It is estimated that malaria is responsible for nearly one million of deaths per year, affecting especially children. The immune system is considered crucial for the protection against Plasmodium infection. Among the mechanisms involved in the control of blood-stage parasites, the ones mediated by antibodies are widely recognized. However, other mechanisms of immune system can also exert fundamental roles, being less studied. For example, it is believed that most of the elimination of *Plasmodium*-infected red blood cells during acute blood-stage infection occurs through phagocytosis by specialized cells. However, a more detailed description of the relative importance of each phagocytic cell during this infection is still missing. Another important aspect of the immunity to malaria resides in the generation of memory CD4<sup>+</sup> T cells. It is already established that the presence of Plasmodium-specific effector memory CD4<sup>+</sup> T cells in infected individuals or in experimental malaria models is crucial for the maintenance of clinical and protective immunity, which vanishes when those individuals leave the endemic areas or eliminate the residual parasitemia by the use of antimalarials. The mechanisms by which this protective immunity is maintained in the first case and lost in the second, however, are still unknown - although it is already known that *Plasmodium*-specific central memory CD4<sup>+</sup> T cells are found in those susceptible individuals. Considering these aspects, this work had the objective of describing some of the effector mechanisms important in the immune response to blood-stage experimental malaria. This work was subdivided in two main branches: a) to verify the relation between the IFN-y-induced priming (which is already described as crucial for the immunity against the parasite during the acute phase of infection) and the protective immunity to the parasite during the chronic phase of blood-stage infection; and b) to describe separately the role of dendritic cells and splenic macrophages as phagocytic cells during acute *Plasmodium chabaudi* infection, and the subsequent role of these cells in the immune responses during this period. The results obtained in this project may contribute for the comprehension of the mechanisms involved in the immunity against malaria.

Keywords: Plasmodium. Malaria. Immunity. Phagocytosis. Mouse. Lymphocytes.

### LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição da malária no mundo------ 24 Figura 2 – Ciclo de vida do Plasmodium em humanos ------ 24 Figura 3 – Parasitemias e curvas de sobrevivência de camundongos C57BL/6 com infecção primária pelo PcAS, e com infecção secundária nos dias 60 e 200 p.i. com o *Pc*AS ou o *Pc*AJ------ 56 Figura 4 – Anticorpos IgG parasita-específicos, subtipos de células T CD4<sup>+</sup>, respostas de células T CD4<sup>+</sup> à eritrócitos infectados e ao MSP-1<sub>19</sub> em camundongos C57BL/6 crônicos e curados, e influência do IFN-y na parasitemia e temperatura corporal durante a fase crônica da infecção----- 58 Figura 5 – Estratégias de gating utilizadas para definir os subtipos de células T CD4<sup>+</sup>------ 59 Figura 6 - Expressão de genes induzidos por IFN e a resposta de produção de IFN-γ à agonistas de TLR em camundongos C57BL/6 crônicos e curados- 60 **Figura 7 -** Curvas de parasitemia, subtipos de células T CD4<sup>+</sup>, respostas de células T CD4<sup>+</sup> a eritrócitos infectados e à MSP-1<sub>19</sub>, e expressão de genes induzidos pelo IFN em camundongos C57BL/6 e MyD88KO infectados com PcAS ----- 62 Figura 8 - Capacidade de resposta ao TLR, curvas de parasitemia, curvas de sobrevivência e manifestações clínicas da doença em camundongos C57BL/6 curados, tratados ou não com IFN-y e re-infectados com parasitas heterólogos PcAJ ----- 64 **Figura 9 -** Curvas de parasitemia e respostas de células T CD4<sup>+</sup> em camundongos C57BL/6 curados e AMCs, tratados com IFN-y e infectados com parasitas homólogos PcAS----- 65 Figura 10 - Subtipos de células T CD4<sup>+</sup> e respostas de células T CD4<sup>+</sup> a eritrócitos infectados e a MSP-1<sub>19</sub> em camundongos C57BL/6 curados e tratados com IFN-γ ------ 67 Figura 11 - Números de células fagocíticas esplênicas em camundongos C57BL/6 curados e tratados com IFN-γ ----- 68 Figura 12 - Respostas de células T CD4<sup>+</sup> a eritrócitos infectados em

camundongos AMCs tratados com IFN-γ 69
<b>Figura 13 -</b> Os efeitos da depleção de células CD11c⁺ na infecção aguda pelo
<i>Pc</i> 70
Figura 14 - Fagocitose in vivo e ex vivo de eritrócitos infectados, por DCs
subcapsulares da RP rapidamente após a infecção pelo <i>Pc</i> 72
Figura 15 - Expressão de marcadores de ativação em DCs esplênicas durante
a infecção aguda pelo <i>Pc</i> 73
Figura 16 - Fagocitose de eritrócitos infectados, por diferentes subtipos de DCs
durante a infecção aguda pelo <i>Pc</i> 74
<b>Figura 17 -</b> Análise das interações entre DCs esplênicas e células T CD4 <sup>+</sup> após
a infecção pelo <i>Pc</i> 76
Figura 18 - Análise da fagocitose de eritrócitos infectados in vivo e ex vivo por
DCs subcapsulares da RP durante a pré-crise
Figura 19 - Análise da fagocitose de eritrócitos infectados in vivo e ex vivo por
DCs esplênicas durante a crise 81
Figura 20 - Análise das populações de macrófagos esplênicos durante a
infecção aguda pelo <i>Pc</i> 84
Figura 21 - Números totais de DCs e células F4/80 <sup>low</sup> esplênicas durante a
infecção aguda pelo <i>Pc</i> 85
Figura 22 - Expressão de marcadores de ativação e co-estimulação em DCs e
células F4/80 <sup>low</sup> esplênicas durante a infecção aguda pelo <i>Pc</i> 85
Figura 23 - Análise de depleção dos macrófagos esplênicos pela utilização de
lipossomos de clodronato 87
Figura 24 - Importância in vivo de macrófagos da RP e da MZ durante a
infecção aguda pelo <i>Pc</i> 87
Figura 25 - Importância dos macrófagos da RP e da MZ para a ativação
precoce de células T CD4 <sup>+</sup> durante a infecção aguda pelo $Pc$ 89
Figura 26 - Importância de macrófagos da RP e da MZ para o fenótipo de
células Tfhs durante a infecção aguda pelo <i>Pc</i>
Figura 27 - Expressão de ICOS em células T CD4 <sup>+</sup> após 4 dias de infecção
pelo <i>Pc</i> 92
Figura 28 - Importância dos macrófagos da RP e da MZ para a ativação de
células B durante a infecção pelo <i>Pc</i> 94
Figura 29 - Números de plasmócitos ilgG2a <sup>+</sup> nos baços dos camundongos

experimentais infectados com <i>Pc</i>	95	
Figura 30 - Modelo da interação entre a imunidade inata e adquirida dura	nte a	Э
malária experimental crônica	97	

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Análise comparativa das técnicas *in vivo* e *ex vivo* no estudo dasDCs esplênicas durante a infecção aguda pelo *Pc*------ 82

## LISTA DE VÍDEOS

Vídeo 1 – A dinâmica de DCs da região subcapsular do baço em camundongos não-infectados ------ 71 Vídeo 2 - A fagocitose de eritrócitos infectados por DCs imediatamente após a infecção pelo *Pc*----- 71 Vídeo 3 – DCs CD11c<sup>+</sup> da região subcapsular do baço contendo restos de eritrócitos infectados ------ 71 Vídeo 4 - Captura de eritrócitos infectados sem internalização por DCs imediatamente após a infecção pelo Pc ----- 71 Vídeo 5 – As interações entre células T CD4<sup>+</sup> e DCs CD11c<sup>+</sup> no baço de camundongos não-infectados ----- 75 Vídeo 6 – As interações entre células T CD4<sup>+</sup> e DCs CD11c<sup>+</sup> no baço de camundongos infectados pelo Pc ----- 75 Vídeo 7 - A fagocitose de eritrócitos infectados por DCs no período de précrise após a infecção pelo *Pc*----- 77 Vídeo 8 – A fagocitose de eritrócitos infectados por uma DC no período de précrise após a infecção pelo Pc----- 77 Vídeo 9 – DCs CD11c<sup>+</sup> da região subcapsular do baço contendo restos de eritrócitos infectados durante a pré-crise ----- 77 Vídeo 10 – A fagocitose de eritrócitos infectados por DCs no período de crise após a infecção pelo *Pc*----- 80 Vídeo 11 – A fagocitose de eritrócitos infectados por macrófagos F4/80<sup>high</sup> imediatamente após a infecção pelo Pc ----- 83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BDCA1 Antígeno das células dendríticas do sangue
- BSA Albumina bovina sérica
- CD Cluster of differentiation
- CFP Cyan Fluorescent Protein
- DDT Diclorodifeniltricloroetano
- DTR Receptor para toxina diftérica
- EDTA Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- FACS Fluorescent activated cell sorter
- FITC fitohemaglutinina
- GFP Green Fluorescent Protein
- HLA Human Leukocyte Antigen
- IFN-γ Interferon gama
- IgG Imunoglobulina G
- IL Interleucina
- KO Nocautes gênicos
- Lin Fator linfóide
- LPS lipopolissacarídeo
- MSP-1 proteína da superfície do merozoíto 1
- MyD88 Fator de diferenciação mielóide 88
- NF-κB Fator nuclear kappa B
- PCR Reação de polimerase em cadeia
- PE ficoeritrina
- PE-Cy7 ficoeritrina conjugada à cianina 7
- PerCP Peridinin-chlorophyll-protein
- RAG Enzima recombinase
- RPMI Meio Roswell Park Memorial Institute
- Th1 Célula T helper 1
- TLR Receptor do tipo toll
- TNF-α Fator de necrose tumoral alfa
- YFP Yellow Fluorescent Protein

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO 22
1.1	Características da infecção pelo Plasmodium 23
1.2	Características da imunidade adquirida ao Plasmodium 25
1.3	A interação entre a imunidade inata e adquirida 29
1.4	Mecanismos efetores da resposta imune ao Plasmodium – Células fagocíticas
d	o baço 33
2	<b>OBJETIVOS</b> 36
3	MATERIAL E MÉTODOS 38
3.1	ARTIGO 1 - O priming induzido por IFN-y mantém a imunidade cepa-
in	dependente de longa duração contra a fase sanguínea da infecção pelo
Ρ	lasmodium chabaudi 39
3.1.1	Camundongos e parasitas 39
3.1.2	Infecções e análises clínicas 39
3.1.3	Comissão de Ética 39
3.1.4	Purificação de eritrócitos infectados com formas maduras do Pc 40
3.1.5	Ensaio de reinvasão de eritrócitos in vivo 40
3.1.6	ELISA para detecção de anticorpos parasita-específicos 41
3.1.7	Análise fenotípica das células do baço 41
3.1.8	Ensaios de proliferação com CFSE 42
3.1.9	Detecção de IFN-γ 42
3.1.1	<b>0</b> Tratamento in vivo com anti-IFN- $\gamma$ 42
3.1.1	1 Purificação de DCs 43
3.1.1	<b>2</b> PCR Quantitativo em tempo real 43
3.1.1	<b>3</b> Priming induzido por IFN-γ in vivo 44
3.1.1	4 Análises estatísticas 44
3.2	ARTIGO 2 – Análise por microscopia intravital revela um papel fundamental
p	ara as DCs esplênicas na ativação de células T CD4 <sup>+</sup> e na eliminação direta
d	a parasitemia durante a fase aguda da malária experimental 44
3.2.1	Camundongos, parasitas e infecções 44
3.2.2	Comissão de Ética 45
3.2.3	B Depleção de células CD11c⁺ mediada por toxina diftérica (DTx) 45

3.2.4 Análises de microscopia confocal intravital (CIVM) 45
3.2.5 Marcação de eritrócitos infectados purifcados com Cell Tracer Violet (CTV)
46
<b>3.2.6</b> Análises de citometria de fluxo 46
3.2.7 Análises de proliferação de células T 47
<b>3.2.8</b> Detecção de IFN-γ 47
3.2.9 Análises de imunofluorescência 47
3.2.10 Análises estatísticas 48
3.3 ARTIGO 3 – Macrófagos da polpa vermelha são importantes para a geração
de células T foliculares e para induzir respostas de células B T-dependentes
durante a malária experimental 48
3.3.1 Camundongos, infecção e parasitas 48
<b>3.3.2</b> Comissão de Ética 48
3.3.3 Marcação de eritrócitos infectados purifcados com Cell Tracer Violet (CTV)
49
3.3.4 Análises de citometria de fluxo 49
3.3.5 Análises de Microscopia Confocal Intravital (CIVM) 50
3.3.6 Análises de imunofluorescência 50
3.3.7 Ensaios de depleção com lipossomos de clodronato 51
3.3.8 Ensaios de proliferação celular 51
3.3.9 Produção de citocinas 51
<b>3.3.10</b> Produção de anticorpos IgG e IgM específicos ao Pc 52
3.3.11 Ensaios de co-culturas in vitro 52
3.3.12 Análises estatísticas 53
4 RESULTADOS 54
4.1 ARTIGO 1 – O priming induzido por IFN-γ mantém a imunidade cepa-
independente de longa duração contra a fase sanguínea da infecção pelo
Plasmodium chabaudi 55
4.1.1 A eliminação completa da parasitemia residual induz uma perda parcial
da imunidade protetora à parasitas heterólogos PcAJ 55
4.1.2 A perda parcial na imunidade protetora aos parasitas heterólogos PcAJ
parece resultar de uma redução nas populações de células T CD4+
efetoras e de memória efetora 56
4.1.3 O priming induzido por IFN-g do sistema imune inato diminui após a

eliminação da parasitemia residual----- 59

- 4.1.4 A sinalização mediada pelo MyD88 é fundamental para as respostas de células T CD4+ e para o priming induzido por IFN-g em DCs esplênicas de camundongos cronicamente infectados ------ 61
- **4.1.5** O priming in vivo com IFN-g recombinante restaura a imunidade protetora aos parasitas heterólogos PcAJ em camundongos sem parasitemia residual ------ 62
- **4.1.6** O priming in vivo com IFN-g recombinante restaura a resposta de células T CD4+ aos parasitas em camundongos sem parasitemia residual------ 65
- 4.2 ARTIGO 2 Análise por microscopia intravital revela um papel fundamental para as DCs esplênicas na ativação de células T CD4<sup>+</sup> e na eliminação direta da parasitemia durante a fase aguda da malária experimental ------ 69
- **4.2.1** DCs são necessárias para o controle da parasitemia e para a ativação de células T CD4+ esplênicas durante a infecção sanguínea pelo Pc -
- **4.2.2** DCs esplênicas são capazes de fagocitar eritrócitos infectados em camundongos recém-infectados pelo Pc ------ 71
- 4.2.3 DCs esplênicas interagem com células T CD4<sup>+</sup> em zonas ricas em células T CD4<sup>+</sup> e também na polpa vermelha durante os primeiros dias após a infecção pelo Pc ------ 74
- **4.2.4** DCs esplênicas em camundongos durante a pré-crise apresentam capacidade fagocítica intensa ------ 77
- **4.2.5** A fagocitose do Pc pelas DCs esplênicas não é observada durante a crise------ 80
- 4.3 ARTIGO 3 Macrófagos da polpa vermelha são importantes para a geração de células T foliculares e para induzir respostas de células B T-dependentes durante a malária experimental------ 83
- **4.3.1** Células F4/80<sup>high</sup> são capazes de fagocitar parasitas, expressam marcadores de ativação e co-estimulação e aumentam a expressão de ICOSL ------ 83
- **4.3.2** Importância dos macrófagos esplênicos in vivo durante a infecção pelo Pc------ 86

4.3.3	Macrófagos esplênicos não são fundamentais para a ativação pred	coce
	de células T CD4 <sup>+</sup> 8	87

- **4.3.4** Macrófagos da RP são capazes de induzir o fenótipo e função de células Tfh em células T CD4<sup>+</sup>------ 89
- **4.3.5** Macrófagos da RP são fundamentais para a geração de células B do centro germinativo e para a produção de anticorpos IgG específicos ao Pc------ 92
- 5 DISCUSSÃO ------ 96
- 6 CONCLUSÃO ------ 107
- REFERÊNCIAS------ 109
- ANEXOS------ 124

Anexo 1 - IFN-γ-induced priming maintains long-term strain-transcending	; immunity
against blood-stage <i>Plasmodium chabaudi</i> malaria	125
Anexo 2 - Outros artigos publicados durante o Doutorado	137

# 1 INTRODUÇÃO

#### 1.1 Características da infecção pelo *Plasmodium*

A malária, doença causada pelos parasitas do gênero Plasmodium (Filo Apicomplexa), é uma das principais doenças infecciosas do mundo em desenvolvimento (Figura 1) e é responsável pela morte de mais de 500 mil pessoas anualmente, principalmente crianças presentes na África Subsaariana (1). O ciclo de vida do parasita (Figura 2) pode ser dividido em duas fases principais; a fase sexuada, que ocorre no hospedeiro artrópode (mosquitos do gênero Anopheles), e a fase assexuada (que ocorre no hospedeiro vertebrado e se inicia após a picada do mosquito e a subsequente inoculação de esporozoítos). Os esporozoítos movem-se ativamente dentro da derme, até eventualmente alcançarem um capilar sanguíneo; após entrar na corrente sanguínea, chegam até o fígado, onde invadem hepatócitos e posteriormente multiplicam-se, dando origem a milhares de merozoítos (2). Os merozoítos formados eventualmente passam à corrente sanguínea, dentro de merossomos - estruturas onde uma grande quantidade de merozoítos está envolvida por parte da membrana do hepatócito invadido; a liberação dos merozoítos em merossomos permite aos parasitas escaparem da ação de fagócitos residentes, tais como as células de Kupfer (3). Uma vez na corrente sanguínea, os merozoítos invadem ativamente eritrócitos presentes na circulação, e se desenvolvem sequencialmente em anel, trofozoíto e esquizonte, dando origem a novos merozoítos que rompem a membrana destas células, e invadem novos eritrócitos; esta fase do ciclo, geralmente denominada fase eritrocítica, repete-se por dias, sendo que os ciclos de rompimento e desenvolvimento acontecem em intervalos de tempo definidos, que variam de acordo com a espécie do parasita. Por exemplo, em infecções com P. falciparum tais ciclos ocorrem a cada 48 h (4). Eventualmente, após a invasão de um novo eritrócito, os parasitas desenvolvem-se em gametócitos, que são as formas infectantes dos mosquitos. Desta forma, quando um mosquito Anopheles não infectado pica um indivíduo infectado, tais gametócitos invadem o mosquito, dando início novamente à fase sexuada do ciclo de vida.

Figura 1 - Distribuição da malária no mundo.



O mapa acima mostra a prevalência dos casos de infecção pelo *Plasmodium* no planeta. Dados obtidos a partir do World Malaria Report, 2013. Endereço eletrônico: http://www.worldmalariareport.org/.



Figura 2 – Ciclo de vida do *Plasmodium* em humanos.

Ciclo de vida do *Plasmodium* em humanos, com uma descrição resumida das interações entre o parasita e o sistema imune do hospedeiro. Retirado de: Riley e Stewart (2013).

Nas últimas décadas, esforços e investimentos têm sido realizados para o desenvolvimento de estratégias vacinais contra a malária; por exemplo, há uma

vacina em fase III de testes, baseada na proteína do circunsporozoíto (5). Os resultados decorrentes destes investimentos, no entanto, têm sido discretos. De fato, há um aumento nos casos de malária observados em áreas endêmicas e em áreas onde o controle ou erradicação haviam sido atingidos, em comparação com os resultados obtidos na década de 60 – ápice da campanha de dedetização com DDT nessas áreas (1). De acordo com DOOLAN ET AL. (6), três fatores contribuíram para a incapacidade em controlar a infecção: a) o aparecimento de parasitas resistentes à antimaláricos, como cloroquina, artemisina, etc.; b) problemas nas campanhas de controle do vetor em países em desenvolvimento e c) a falta de uma vacina totalmente eficiente para a prevenção da malária. Outro fator potencialmente importante é a falta de conhecimento sobre alguns aspectos da resposta imune ao *Plasmodium* (7). Por exemplo, um melhor entendimento da geração e manutenção da imunidade adquirida em resposta à infecção certamente facilitaria o desenvolvimento de vacinas com maior eficiência.

#### 1.2 Características da imunidade adquirida ao *Plasmodium*

Com relação à aquisição de imunidade adquirida pelo homem, apesar do grande número de trabalhos feitos com amostras de indivíduos infectados, ainda há grandes lacunas e, mais importante, resultados conflitantes entre os estudos realizados em áreas endêmicas. Por exemplo, muitos trabalhos indicam que a aquisição de imunidade contra a doença só acontece após um longo período de exposição ao parasita em áreas endêmicas, e que essa imunidade é cepa-específica, ou seja, o indivíduo ainda é susceptível a novas infecções com outras variantes do Plasmodium (8,9). Em áreas onde a transmissão da malária é normalmente baixa ou instável, como em algumas partes da América do Sul e Ásia, altos índices de episódios clínicos são vistos em indivíduos de todas as idades durante epidemias, como evidenciado em vários documentos históricos (10,11) e de estudos mais recentes em populações de refugiados e em áreas onde a malária tem sido introduzida após mudanças no uso da terra (12,13). Além disso, em populações de migrantes movendo-se de áreas livres de malária para áreas endêmicas, altíssimos níveis de malária clínica foram inicialmente vistos em indivíduos de todas as idades (14). DOOLAN ET AL. (6) listaram três tipos principais de imunidade adquirida contra o parasita em humanos: (a) imunidade contra a doença propriamente dita, conferindo proteção contra as manifestações clínicas da malária, o que afeta o risco de morbidade associado com uma quantidade determinada de carga parasitária; (b) imunidade antiparasita, que confere proteção contra a parasitemia, desta forma afetando a quantidade de carga parasitária por si; e (c) imunidade contra novas infecções, através da manutenção de níveis baixos e geralmente assintomáticos de parasitemia.

Outros estudos associam o maior risco de desenvolver patologias como a malária cerebral, com a prevalência de hiperparasitemia (15); ao mesmo tempo, alguns estudos correlacionam a presença de hiperparasitemia em áreas endêmicas com a intensidade de transmissão (16). Outros estudos ainda ligam o desenvolvimento da imunidade contra a doença com a idade do indivíduo, de maneira independente do tempo de exposição à infecção; tais estudos, realizados com adultos que migraram para áreas endêmicas, mostram que a aquisição de imunidade ocorre após poucos episódios de infecção (17), ao contrário do que foi mostrado nos estudos anteriormente citados. STRUIK E RILEY (18) sugeriram, nesse sentido, que a imunidade contra altos níveis de carga parasitária parece ser estabelecida mais rapidamente em adultos do que em crianças, sugerindo que as mudanças na resposta imune relacionadas com a idade são independentes de exposição prévia à infecção; de fato, segundo estes autores, é difícil separar os efeitos imunológicos da idade dos efeitos da duração da exposição, porque estes dois efeitos estão intimamente relacionados em populações endêmicas.

LANGHORNE ET AL. (19) observaram que a imunidade contra a malária grave é estabelecida completamente ao mesmo tempo em que os níveis de doença não grave mantêm-se constantes, e a carga parasitária na população ainda está aumentando, o que sugere que possa haver mecanismos distintos por trás destas diferentes expressões da imunidade protetora ao parasita. Desta forma, em infecções em humanos, a imunidade adquirida contra a malária desenvolve-se lentamente e de forma incompleta, enquanto a imunidade protetora em relação à mortalidade decorrente da infecção é adquirida mais rapidamente, sendo potencialmente importante após um episódio isolado de infecção (20). Complementando esta noção, TODRYK ET AL. (21) mostraram, através de um estudo onde as respostas imunes celulares foram investigadas em indivíduos recebendo desafios com esporozoítos de P. falciparum através de picadas de mosquitos, que embora a resposta efetora de produção de citocinas em resposta ao parasita tenha se mostrado estável, a resposta de células de memória mostrou-se de baixa magnitude e instável ao longo do tempo, indicando que, neste caso, células T de memória e efetoras sejam diferencialmente reguladas. Além disso, STRUIK e RILEY (18) observaram que a aquisição da imunidade contra a doença severa e fatal é relativamente rápida e mantida por longos períodos de tempo, mesmo na ausência de estímulos da imunidade por re-infecções. Em contraste, a imunidade contra altos níveis de carga parasitária e contra os sintomas de malária não grave leva um tempo muito maior para se desenvolver.

Outro aspecto muito pouco explorado é a queda na imunidade protetora contra o Mulheres parasita em determinadas situações. grávidas, principalmente primigrávidas, assim como adultos removidos das áreas de transmissão, ou tratados com antimaláricos de modo a eliminar totalmente a parasitemia, perdem a imunidade protetora ao parasita, e tornam-se suscetíveis a novas infecções pelo Plasmodium (22). Segundo STRUIK E RILEY (18), enquanto humanos desenvolvem respostas de memória muito eficientes contra muitos outros patógenos, os parasitas da malária podem ter desenvolvido mecanismos específicos de evasão da resposta imune que têm como alvo as respostas de memória da imunidade adquirida. Ainda não é claro se esta diminuição da resposta imune normal ocorre na indução ou na manutenção da memória, uma importante questão ainda não resolvida. É importante ressaltar que tal fenômeno pode ser observado tanto para as formas sanguíneas do parasita, como mostrado acima, quanto para as formas hepáticas do Plasmodium - onde a persistência do parasita é necessária para a manutenção da imunidade protetora (23).

Há uma grande dificuldade em se estudar os aspectos da resposta imune adquirida ao *Plasmodium* em humanos; de fato, estimar a duração da memória em populações de áreas endêmicas da malária é dificultado pela constante re-exposição do sistema imune ao parasita (18). Desta forma, estudos realizados com estes indivíduos têm levado a resultados e conclusões conflitantes, onde, por um lado, a necessidade de antígeno persistente para a manutenção de altos níveis de mecanismos da imunidade efetora parece explicar o fenômeno da *premunition* (resistência à doença clínica acompanhada por uma presença de infecção patente), a qual foi originalmente descrita referindo-se à malária humana (24). Por outro lado, estudos em áreas de transmissão baixa ou instável, como a África do Sul ou a Tailândia, concluíram que as infecções ocorridas durante os primeiros anos de vida contribuem para a proteção em um longo período depois (25,26), o que indica a persistência da memória imunológica na ausência de re-infecção.

A memória imunológica a infecções baseia-se em células T (CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>) e B de memória, assim como em células produtoras de anticorpos (plasmócitos), todas com afinidade superior ao antígeno específico em relação às células T e B presentes anteriormente às infecções (27,28). Com relação às células B, as células secretoras de anticorpo antimaláricas e suas precursoras (células B de memória) parecem ser de longa vida, persistindo na ausência de antígeno e encontrando-se presentes em uma relativa alta frequência. Tais células podem ser detectadas, após reestimulação antigênica in vitro, até ao menos oito anos após a última exposição à malária, como visto em estudos no Madagascar (29). A manutenção de altos níveis de anticorpos circulantes parece depender da persistência do antígeno; após a reinfecção, no entanto, a concentração de anticorpos é rapidamente aumentada, e a maturação de afinidade é observada (18). Neste sentido, é interessante notar que o tratamento eficiente da malária (e, consequentemente, a eliminação dos antígenos persistentes) parece levar a um rápido declínio na concentração de anticorpos (30,31). Considerando todos esses dados, parece que a persistência do antígeno ou a frequente re-infecção é importante para a manutenção de altos níveis de anticorpos circulantes, mas que as células B de memória podem persistir na ausência de antígeno.

Funcionalmente, as respostas de células T CD4<sup>+</sup> de memória podem ser divididas em efetoras (ou de memória efetora), e de memória (ou de memória central) (32); no caso da malária humana, a carga antigênica parece controlar o balanço entre as células de memória efetora e as de memória central (33). De maneira importante, a presença de células T CD4<sup>+</sup> de memória efetora pluripotentes e parasita-específicas no sangue periférico correlacionou com a presença de imunidade protetora (34,35), o que indica que a presença de células T de memória efetora pode ser considerada um robusto indicador de imunidade protetora contra o parasita (9). Ao mesmo tempo, a longevidade e a necessidade de antígeno para as células B e T de memória são semelhantes ao descrito para outras células de memória antígenoespecíficas. Células de memória central persistem por longos períodos de tempo na ausência de antígeno, mas os antígenos são essenciais para a manutenção de altos níveis de células efetoras e de memória efetora (36,37). Neste sentido, a indução de ativação destas células em resposta ao *Plasmodium* pode constituir-se em uma importante estratégia; isto poderia ser alcançado pelo aumento no basal de ativação do sistema imune por certos fatores e moléculas.

Em conjunto com os resultados observados com malária humana, modelos murinos de infecção pelo *Plasmodium* têm sido utilizados. O *P. chabaudi*, por exemplo, é um modelo particularmente apropriado para se estudar a resposta imune contra a fase sanguínea da malária, em especial as respostas imunes observadas durante a fase crônica desta infecção em cepas de camundongos resistentes (38). De modo importante, embora alguns estudos utilizando este parasita tenham estabelecido que as células T CD4<sup>+</sup> de memória desempenham um papel crucial no desenvolvimento da imunidade protetora ao parasita, muitas questões permanecem não muito bem esclarecidas, em especial como a memória imunológica a esta infecção é sustentada (39).

#### 1.3 A interação entre a imunidade inata e adquirida

Como descrito acima, é possível que um aumento no estado de ativação do sistema imune dos hospedeiros (murinos ou humanos) poderia se constituir em uma estratégia eficiente para a melhora na imunidade protetora contra a malária. Para isto, um conhecimento preciso sobre as moléculas consideradas chave para as respostas imunes contra o parasita se faz necessário. Neste sentido, uma molécula importante é o IFN- $\gamma$ . O IFN- $\gamma$  é a única molécula de IFN do tipo II, e é a citocina Th1 prototípica, sendo uma potente indutora da imunidade celular pela promoção da diferenciação Th1 das células T CD4<sup>+</sup>, induzindo a troca de isotipo de anticorpos IgG citofílicos, e ativando fagócitos (40,41). O IFN- $\gamma$  desempenha vários papéis na malária, funcionando igualmente como um indutor e efetor das respostas imunes inatas e adquiridas durante as fases sanguíneas e hepáticas do parasita, sendo possível afirmar que o IFN- $\gamma$  é o determinante central de todas as respostas imunes envolvidas na proteção contra a malária (40).

Em estudos de resistência à fase hepática do *P. falciparum* em indivíduos imunizados com esporozoítos na presença de cloroquina (um antimalárico que não afeta a fase hepática do parasita), a proteção estéril contra o desafio subsequente

com esporozoítos foi atingida em todos os voluntários. De modo interessante, respostas celulares robustas foram detectadas em todos os voluntários imunizados, consistindo em células T CD4<sup>+</sup> de memória efetora produtoras de IFN-γ, TNF-α e IL-2 (34). Desta forma, respostas de IFN-γ suficientemente fortes contra antígenos préeritrocíticos estão associados com a proteção contra episódios de malária clínica.

O IFN-γ também é considerado fundamental no controle das formas sanguíneas do *Plasmodium*, como demonstrado em humanos e em modelos murinos. Estudos em humanos têm consistentemente mostrado que as respostas de IFN-γ induzidas pelos eritrócitos infectados associam-se com riscos reduzidos de febre e episódios de malária clínica (42,43,44). Com relação aos modelos murinos, talvez a evidência mais clara para isto seja mostrada por estudos com infecções em camundongos deficientes para o IFN-γ (45,46,47) e para o receptor de IFN-γ (48); tais camundongos falham em controlar a fase aguda da parasitemia sanguínea, e sucumbem rapidamente em decorrência da hiperparasitemia observada. Uma falha semelhante no controle da parasitemia é observada em animais imunocompetentes, nos quais o IFN-γ foi neutralizado durante a infecção (49,50,51).

Análises mais detalhadas têm demonstrado que as respostas de IFN-y a antígenos individuais do Plasmodium são de curta duração, isto é, declinam alguns anos após a exposição (29,52), ou são instáveis (53,54,55). Entretanto, mesmo antes da caracterização do IFN-y, WYLER E OPPENHEIM (56) demonstraram que as respostas proliferativas e celulares a um extrato total cru de antígenos do parasita poderiam ser detectadas em doadores até 15 anos após uma única infecção malárica. Mais recentemente, TODRYK ET AL. (21) encontraram respostas efetoras de IFN-y intactas após três meses de infecção em voluntários previamente não imunes; outros dados sugerem que tais respostas de IFN-y contra eritrócitos infectados permanecem praticamente inalteradas após pelo menos 14 meses de infecção (40). Desta forma, embora as respostas a antígenos individuais ou epítopos do Plasmodium podem ser instáveis - possivelmente representando flutuações in vivo dos números totais de clones individuais de células T CD4<sup>+</sup> – a resposta de IFNy a eritrócitos infectados parece ser de longa duração. A curta duração das respostas de produção de IFN-y a antígenos individuais pode ser contornada parcialmente pela indução de respostas mais amplas, isto é, por vacinas baseadas em parasitas totais. Tais imunizações expõem o sistema imune do hospedeiro a um painel completo de antígenos do *Plasmodium*, o que pode induzir uma produção de IFN- $\gamma$  contra múltiplas fases do ciclo de vida do parasita (39). Além disso, parasitas totais contêm um adjuvante intrínseco, aumentando ainda mais as respostas de IFN- $\gamma$  no geral (57). De fato, vacinas baseadas em parasitas totais induzem respostas de IFN- $\gamma$  robustas em humanos (34,58,59) e apresentam-se geralmente mais eficientes do que vacinas baseadas em subunidades (60,61,62,63).

Adultos residentes em áreas endêmicas produzem marcadamente menos respostas de IFN-y contra eritrócitos infectados do que residentes em áreas de baixa endemicidade, ou até mesmo em relação a doadores não expostos ao parasita (64,65); além disso, os níveis plasmáticos de IFN-y durante episódios de malária clínica são relativamente menores em pacientes semi-imunes do que em pacientes imunes (66,67). A inibição de respostas pró inflamatórias tem sido proposta como uma adaptação benéfica do hospedeiro para evitar a imunopatologia resultante de infecções crônicas ou repetidas pelo Plasmodium (68). Outra hipótese propõe que a supressão das respostas pró inflamatórias pode ser importante para o prolongamento da sobrevivência dos parasitas no hospedeiro. De fato, a supressão da proliferação (69,70) e da produção de IFN-y (71,72) durante episódios de malária clínica são observações comuns, embora não universais (73). Evidências de que a parasitemia crônica também suprime as respostas de IFN-y foram observadas em estudos longitudinais (53) e em estudos de quimioprofilaxia de longa duração (74). Desta forma, a inibição das respostas celulares no geral, e do IFN-γ em particular, parece ser de importância central para a sobrevivência do parasita no hospedeiro, atingida através de múltiplos mecanismos; ao mesmo tempo, uma ativação excessiva e/ou constante de tais respostas imunes poderia contribuir para quadros de imunopatologia.

Dadas as evidências para um efeito protetor do IFN-γ contra a parasitemia, desenvolver uma vacina contra a malária que induza a produção desta citocina pode ser desejável. No entanto, a eficiência e, até certo ponto, a segurança desta estratégia deverá depender de um entendimento mais preciso da relação complexa entre o IFN-γ e os processos inflamatórios que ocorrem nas infecções agudas e crônicas da malária, inclusive pela utilização de modelos murinos de infecção.

O glicofosfatidilinositol (GPI) do *P. falciparum* tem sido reconhecido há bastante tempo como um potente indutor de respostas de TNF- $\alpha$  em macrófagos (75), e o

reconhecimento destes componentes de membrana do *Plasmodium* (76), assim como de outros parasitas, incluindo o *Trypanosoma* (77) e o *Leishmania* (78), é mediado pelo TLR2 e, em menor grau, pelo TLR4. O TLR9 foi posteriormente mostrado como reconhecendo a hemozoína do *P. falciparum* (79), um produto cristalino do metabolismo da hemoglobina pelos parasitas da malária, embora tenha sido sugerido que, na verdade, os ácidos nucléicos presentes na hemozoína formam o verdadeiro ligante para este receptor (80).

Em um estudo importante, MCCALL ET AL. (81) mostraram que o P. falciparum torna as respostas pró-inflamatórias induzidas por agonistas de TLRs mais robustas tanto in vitro quanto in vivo. Este processo pareceu envolver mais do que uma simples sinergia entre vias de sinalização, uma vez que o efeito acelerador do P. falciparum requer até 48 horas para se desenvolver ao máximo. Os autores observaram que tal efeito, denominado priming, pareceu ser uma característica única do P. falciparum entre outros patógenos infecciosos para humanos. Estes resultados complementaram uma análise de microarray de indivíduos voluntariamente infectados e pacientes naturalmente infectados com malária, os quais sugeriram um aumento na expressão de marcadores de inflamação durante a infecção precoce pela malária (82). Embora houvesse falta de dados funcionais e limitados pela incerteza a respeito da fonte celular da inflamação, o estudo demonstrou claramente um aumento no RNA mensageiro de PBMCs codificando para vários componentes das vias de sinalização inflamatórias, incluindo TLRs, MyD88, NF-kB e IFN-y, durante a infecção pré-sintomática.

Os resultados de MCCALL ET AL. (81) também sugeriram que a infecção malárica pudesse apresentar uma influência bifásica no sistema imune inato, inicialmente induzindo o *priming*, mas depois induzindo a supressão. Esta hipótese é confirmada até certo ponto pelos estudos com modelos murinos, nos quais as respostas de células dendríticas à estimulação de TLRs foram demonstradas serem anti-inflamatórias apenas após a fase aguda da infecção pela malária (83), e de acordo com os resultados de *microarray*, no qual as vias de sinalização anti-inflamatórias mediadas por IL-10 estavam com expressão aumentada apenas em pacientes com malária clínica, mas não em voluntários pré-sintomáticos (82).

Com relação aos mecanismos moleculares e celulares pelos quais o *P. falciparum* induz o *priming*, é interessante notar que, no modelo de infecção com

Propionibacterium, por exemplo, a produção de IFN-y e IL-12 mediada por TLR9 é requerida para o priming (84). Neste sentido, FRANKLIN ET AL. (85) mostraram que o TLR9 e o MyD88 são essenciais para iniciar as respostas de IFN-y e IL-12 e favorecer a hipersensibilidade a agonistas dos TLRs do hospedeiro, resultando em uma produção excessiva de citocinas pró inflamatórias e sintomas parecidos com a sepse na malária aguda. Este trabalho mostrou, resumidamente, que a infecção aguda com o *P. falciparum* em humanos resultou em uma ativação aumentada das células do sistema imune inato em resposta a agonistas de TLRs. Este fenômeno foi observado também em camundongos infectados com o P. chabaudi AS, em uma maneira dependente de TLR9, IFN-y e IL-12. O mecanismo pelo qual a infecção malárica acelera as respostas do sistema imune inato do hospedeiro foi mostrado ser dependente da ativação de TLR9 durante a infecção pelo Plasmodium, o que induz inicialmente a produção de IFN-γ e IL-12, os quais, por sua vez, aumentam a expressão de TLRs e mantêm as vias de sinalização associadas aos TLRs em estado de alerta e responsividade. Isto parece, de fato, aumentar os efeitos deletérios de um desafio com endotoxina. Tal efeito pode ocorrer de modo dramático em humanos, durante co-infecções com malária e bactérias Gram-negativas, como por exemplo, Salmonella (85). Como o IFN-y não é produzido em abundância pelos fagócitos, e é expresso em linfócitos murinos (86), o mecanismo parece envolver uma comunicação entre os braços inato e adquirido do sistema imune. Embora muito seja conhecido sobre como o sistema imune inato afeta as respostas imunes adquiridas, o papel das células da imunidade adquirida nas células do sistema imune inato é basicamente inexplorado. Nós, desta forma, nos questionamos se baixas quantidades de IFN-y produzidas por células T CD4<sup>+</sup> efetoras (TEs) ou de memória efetora (TEMs) em resposta a parasitemia crônica em indivíduos infectados poderia acelerar o sistema imune inato e, juntamente com anticorpos parasitaespecíficos, mediar a imunidade cepa-independente ao Plasmodium.

# 1.4 Mecanismos efetores da resposta imune ao *Plasmodium* – Células fagocíticas do baço

A fagocitose de eritrócitos infectados ou de merozoítos se inicia precocemente após a infecção, e auxilia no controle da parasitemia e indução das respostas imunes observadas na fase aguda da infecção (87,88). A fagocitose acontece principalmente nas regiões da polpa vermelha (RP) e da zona marginal (MZ) do baço (87,88), onde uma rede complexa de células fagocíticas é formada por populações heterogêneas de macrófagos e células dendríticas (DCs – 89,90). Com o objetivo de caracterizar o papel de fagócitos esplênicos na malária, um estudo identificou uma população de monócitos migratórios como células importantes na remoção de eritrócitos infectados pelo *P. chabaudi* (91). Entretanto, estudos anteriores mostraram baixas porcentagens de fagocitose por células esplênicas através de ensaios *ex vivo* (91,92). Estas observações não são totalmente compatíveis com a noção de que o baço é de fundamental importância no controle da parasitemia.

Como explicado anteriormente, a natureza da resposta imune a patógenos é criticamente dependente da interação entre a imunidade inata e adquirida (93). As DCs são fundamentais para esta interação (94). Em humanos, as DCs mielóides são Lin<sup>-</sup> HLA-DR<sup>+</sup>, e expressam CD11c e CD1c, também conhecido como BDCA1 (95,96,97). Este subtipo é encontrado em praticamente todos os tecidos, e migram preferencialmente pelo sistema linfático para o linfonodo drenante. Uma parte desta população, no entanto, migra pela corrente sanguínea até o baço, onde é encontrada em abundância na zona marginal e na zona perifolicular, ou seja, em regiões onde o sangue entra pela circulação aberta do baço. De modo importante, as DCs mielóides são a fonte principal de IL-12, citocina fundamental para a resposta Th1 (98). As DCs murinas clássicas são CD11c<sup>+</sup> CD8a<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup>. DCs mielóides CD11c<sup>+</sup> CD8a<sup>+</sup> encontram-se em áreas de células T no baço, e secretam IL-12 após a maturação; enquanto isso, DCs CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> e CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> são encontradas principalmente na zona marginal e polpa vermelha, e não produzem IL-12.

DCs esplênicas são eficientes células apresentadoras de antígeno (APCs) durante as robustas respostas de células T e B na fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi* (99,100,101,102,103). Dentro da primeira semana após a infecção pelo *P. chabaudi*, DCs esplênicas aumentam a expressão de moléculas do MHC e co-estimuladoras, secretam citocinas pró inflamatórias e estimulam a proliferação de células T e produção de IFN-γ (104,105,106,107). De todo modo, ainda não é claro se as DCs são unicamente cruciais na sua capacidade de iniciar as respostas de células T CD4<sup>+</sup> à fase sanguínea do parasita no baço, de modo análogo ao já observado

durante a infecção pelo *P. berghei* (108). Além disso, muitos detalhes no que diz respeito à dinâmica das DCs esplênicas durante a infecção pela malária permanecem desconhecidos, dificultando nosso entendimento acerca do papel destas células nas respostas imunes protetoras. Após a captura de antígenos, DCs imaturas perdem a capacidade de fagocitar novos patógenos e migram para zonas ricas em células T, onde iniciam as respostas imunes adquiridas (109). Desta forma, é esperado que as DCs deixassem a polpa vermelha logo após fagocitarem eritrócitos infectados ou merozoítos, e não contribuiriam mais para a eliminação dos parasitas da circulação. Ainda assim, estas são apenas suposições.

As análises de comportamento celular pelo uso de microscopia confocal intravital (CIVM) têm sido utilizadas constantemente para resolver questões referentes a mecanismos do sistema imune durante resposta à antígenos ou patógenos. Por exemplo, vários artigos descreveram a função de células T reguladoras em órgãos linfoides secundários (110,111,112), ou de respostas imunes anti-bacterianas (90,113,114,115). Digno de nota, nos últimos artigos mencionados, a fagocitose de Listeria ou Mycobacterium foi descrita pela técnica de CIVM. Além disso, as interações entre Leishmania e o sistema imune do hospedeiro também foram estudadas por CIVM (116). No caso da malária experimental, o comportamento de esporozoítos na pele, no linfonodo drenante e no fígado foram estudados recentemente (117,118,119,120,121); nosso grupo de pesquisa estudou o comportamento de células T reguladoras e DCs na pele de camundongos logo após a infecção pela picada de mosquitos infectados (122). Entretanto, pouco foi feito por estas técnicas na fase sanguínea da malária experimental. De fato, apenas um trabalho (123) descreveu, para o modelo de infecção em P. yoelii, uma alteração na arquitetura do baço e aumento na presença de parasitas dentro deste órgão. Estudos mais detalhados da atividade fagocítica dentro do baço durante a fase sanguínea da infecção, no entanto, ainda não foram feitos.
## **2 OBJETIVOS**

Este projeto, resumidamente, tem como objetivo estudar alguns dos mecanismos efetores pelos quais o *P. chabaudi* é eliminado da circulação, durante as fases aguda e crônica da infecção sanguínea. De modo específico, avaliei durante esse projeto:

1 – Se o *priming* por IFN-γ desempenha um papel na manutenção da imunidade protetora durante a fase crônica da infecção pelo *P. chabaudi*, incluindo a manutenção e/ou geração de células T CD4<sup>+</sup> de memória efetora ou efetoras (TEM<sub>s</sub>/TE<sub>s</sub>).

2 – O papel das DCs esplênicas durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*, especialmente a importância das DCs da região da polpa vermelha/zona marginal na eliminação dos parasitas da circulação por fagocitose. Para isto, foi utilizada, em comparação com técnicas *ex vivo*, a técnica de CIVM.

3 – O papel dos macrófagos da polpa vermelha durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*, tanto na eliminação dos parasitas por fagocitose, quanto nos possíveis papéis destas células nas respostas imunes adquiridas dependentes de células T e B observadas durante essa infecção.

# **3 MATERIAL E MÉTODOS**

## 3.1 ARTIGO 1 – O priming induzido por IFN-γ mantém a imunidade cepaindependente de longa duração contra a fase sanguínea da infecção pelo *Plasmodium chabaudi*

#### 3.1.1 Camundongos e parasitas

Camundongos fêmeas C57BL/6, nocautes para RAG (RAGKO, com background genético C57BL/6), e nocautes para MyD88 (MyD88KO, com background genético C57BL/6), todos originalmente obtidos dos laboratórios Jackson, foram mantidos sob condições específicas livres de patógenos no Biotério de Camundongos Isogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. O *P. chabaudi* (cepas AS – *Pc*AS, e AJ – *Pc*AJ) foi mantido como descrito em Podoba e Stevenson (124). Considerando-se que o ciclo de esquizogonia destes parasitas depende do ritmo circadiano do hospedeiro (125), os camundongos foram mantidos sob um ciclo claro/escuro invertido por ao menos 15 dias antes da infecção, para que fosse possível a realização dos experimentos com as fases maduras do parasita durante o dia.

#### 3.1.2 Infecções e análises clínicas

Nas infecções primárias, os camundongos foram inoculados intraperitonealmente (i.p.) com 1 x  $10^6$  eritrócitos infectados. Os camundongos foram desafiados com uma infecção intravenosa (i.v.) de 1 x  $10^8$  eritrócitos infectados nos dias 60 e 200 pósinfecção (p.i.) e monitorados diariamente para a determinação de curvas de sobrevivência. Para avaliar a parasitemia subpatente, 100 µl de sangue de camundongos com 60, 200 ou 260 dias p.i. foram transferidos i.v. para camundongos RAGKO. As parasitemias foram quantificadas por examinação em microscópio de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa. O peso corporal, a temperatura, e a concentração de hemoglobina no sangue (através de kits para detecção de hemoglobina; Doles, Brasil) também foram avaliados nos camundongos infectados.

## 3.1.3 Comissão de Ética

Todos os procedimentos realizados estavam de acordo com o regulamento do

Conselho Nacional de Saúde e do Colégio Brasileiro em Experimentação Animal, no que diz respeito aos códigos de ética para experimentação e manutenção de camundongos. Os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com números de protocolo 0019/2005 e 0036/2007.

#### 3.1.4 Purificação de eritrócitos infectados com formas maduras do Pc

Eritrócitos infectados com formas maduras do *P. chabaudi* foram obtidos de camundongos com 40 a 60% de parasitemia, em um período do dia com predomínio de trofozoítos maduros e esquizontes. Para a purificação das formas maduras do parasita, 500 µl de sangue heparinizado foi ressuspendido em 1 ml de PBS, pipetado sobre 5 ml de Percoll 74% (GE Healthcare, EUA), e centrifugados (2500 x g, com aceleração e desaceleração de 5 e 0, respectivamente) por 30 min à temperatura ambiente. As camadas formadas acima do Percoll 74% foram coletadas e lavadas três vezes com meio RPMI 1640 completo (suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por calor, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 50 µM de 2-mercaptoetanol, 2 mM de L-glutamina e 1 mM de piruvato de sódio). Todos os suplementos foram adquiridos da Life Technologies (EUA). Essa técnica de purificação gerou uma pureza de formas maduras do parasita maior que 95%.

#### 3.1.5 Ensaio de reinvasão de eritrócitos in vivo

Os camundongos foram infectados i.v. com 5 x 10<sup>8</sup> eritrócitos infectados com formas maduras do parasita. Amostras de sangue foram coletadas em intervalos de 1 h e marcadas com o corante SYTO16 (Molecular Probes, Life Technologies), de acordo com o descrito previamente em (126). As parasitemias foram determinadas através de citometria de fluxo, utilizando-se de um aparelho FACSCalibur (BD Biosciences, EUA), e posterior análise dos resultados através do *software* FlowJo (TreeStar, EUA). As primeiras análises foram feitas 30 min após a infecção (t<sub>0</sub>), quando todos os parasitas eram trofozoítos maduros ou esquizontes. O índice de reinvasão foi considerado como a razão entre as porcentagens de parasitemia nos diferentes tempos medidos, em comparação com os valores de parasitemia em t<sub>0</sub>.

#### 3.1.6 ELISA para detecção de anticorpos parasita-específicos

Os níveis séricos de IgG1 e IgG2a específicos ao PcAS foram quantificados por ELISA, semelhante ao descrito em (127). Resumidamente, placas de ELISA de 96 poços (Costar, EUA) foram sensibilizadas com um extrato total de PcAS (10 ug/ml) overnight à 4 °C. As placas foram saturadas com 3% de BSA (albumina bovina sérica; Sigma-Aldrich, EUA) por 6 h. Após a lavagem das placas, 100 µl das amostras de soros dos camundongos experimentais (diluídas a partir de 1/50 até 1/12800) foram adicionadas aos poços, e as placas foram incubadas por 2 h à temperatura ambiente. A detecção foi realizada pela adição de anticorpos de cabra anti-IgG1 ou anti-IgG2a de camundongo, conjugados à enzima peroxidase (Southern Biotechnology Associates, EUA) por 1 h; após a lavagem das placas, 100 µl de Tetrametilbenzidina (Life Technologies) foi adicionado em cada poço, e 15 min depois os valores de absorbância foram quantificados por densidade óptica (DO) utilizando-se um espectrofotômetro Spectra Max 190 (Molecular Devices, EUA), com um filtro de comprimento de onda de 650 nm. Os níveis de anticorpos em cada amostra de soro foram calculados como o inverso do título end-point, o qual foi definido como a maior diluição que igualou o valor de DO obtido nos controles negativos (pocos com amostras de soro de camundongos RAGKO).

## 3.1.7 Análise fenotípica das células do baço

Suspensões de células do baço dos camundongos experimentais foram incubadas em tampão de lise (40 mM de NH<sub>4</sub>Cl e 4,2 mM de Tris [pH 7,4]) por 5 min à 4 °C, para completa eliminação dos eritrócitos. Os esplenócitos (1 x 10<sup>6</sup> células por poço) foram marcadas utilizando-se as combinações apropriadas de anticorpos monoclonais (mAbs) conjugados com FITC, PE, PE-Cy7, PerCP ou alo-ficocianina (APC). Células T CD4<sup>+</sup> foram incubadas com mAbs específicos ao CD4 (clones H129.19 ou GK1.5), CD27 (clone LG.3A10), CD44 (clone IM7), L-selectina (CD62L; clone MEL-14), e CD127 (IL-7Ra, clone SB/199). DCs, macrófagos, monócitos e neutrófilos foram incubados com mAbs específicos ao CD11b (clone M1/70), CD11c (clone HL3), I-A<sup>b</sup> (MHC de classe II, clone AF6), F4/80 (clone BM8), Ly6C (clone AL-21) e Ly6G (clone 1A8). Todos os mAbs foram adquiridos da BD Pharmingen (EUA), com exceção do mAb F4/80, que foi adquirido da eBioscience (EUA). As células

foram então analisadas por citometria de fluxo, em um aparelho FACSCanto (BD Biosciences), com posterior análise dos resultados obtidos no *software* FlowJo.

### 3.1.8 Ensaios de proliferação com CFSE

A resposta proliferativa de células T CD4<sup>+</sup> ao estímulo com eritrócitos infectados foi mensurada de acordo com o descrito em (127). Resumidamente, 3 x  $10^7$  esplenócitos (diluídos em PBS com 0,1% de BSA) foram incubados com CFSE (Life Technologies) em uma concentração final de 5 µM por 20 min à 37 °C. As células (1 x  $10^6$  células por poço) foram então incubadas em placas de 96 poços (Costar), com 3 x  $10^6$  eritrócitos infectados, 10 µg/ml da fração de 19 kDa da proteína MSP-1 de *Pc*AS (MSP-1<sub>19</sub> recombinante, produzida em nosso laboratório) ou meio completo sem estímulo, por 72 h à 37 °C em uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, as células foram incubadas com mAbs específicos ao CD4 e analisados por citometria de fluxo (FACSCanto), com posterior análise dos resultados obtidos no *software* FlowJo.

### 3.1.9 Detecção de IFN-y

Esplenócitos (1 x  $10^6$  por poço) foram incubados em placas de 96 poços (Costar), com 3 x  $10^6$  eritrócitos infectados, 10 µg/ml de MSP-1<sub>19</sub>, 1 µg/ml de LPS (proveniente da cepa 0111:B4 de *Escherichia coli*; Sigma-Aldrich), 10 µg/ml de CpG oligodeoxinucleotídeo (ODN) 1826 (Coley Pharmaceutical Group, EUA), ou meio completo sem estímulo, por 72 h à 37 °C em uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. O IFNγ foi quantificado nos sobrenadantes das culturas celulares, através da utilização do kit OptEIA IFN-γ, de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences).

#### 3.1.10 Tratamento in vivo com anti-IFN-y

Quatro doses (0,5 mg/camundongo) de mAbs neutralizantes específicos ao IFN-γ (clone H22; eBioscience), ou anticorpo não-específico IgG de hamster da Armênia como controle isotípico (eBioscience) foram injetados i.v. em camundongos C57BL/6 a cada 2 dias, começando no dia 52 após a infecção primária. Essa estratégia de depleção foi baseada em um estudo prévio (128).

#### 3.1.11 Purificação de DCs

Esplenócitos (1 x 10<sup>8</sup>) foram incubadas com microesferas recobertas com anti-CD11c e anti-Pan DC (Miltenyi Biotec, EUA), diluídos em PBS com 0,5% de BSA e 2 mM de EDTA (Life Technologies), por 30 min à 4 °C. As células foram então separadas utilizando-se colunas magnéticas LS (Midi MACS, Miltenyi Biotec). A fração positiva da separação apresentou uma pureza superior a 90% de células CD11c<sup>+</sup>I-A<sup>b+</sup> (DCs), o que foi confirmado por citometria de fluxo.

#### 3.1.12 PCR Quantitativo em tempo real

O RNA foi extraído das DCs (5 x 10<sup>6</sup> por amostra) utilizando-se TRIzol (Life Technologies) (129), e quantificado com um aparelho NanoDrop (Eppendorf, Alemanha). O cDNA foi preparado com um kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Life Technologies). As reações de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foram realizadas em um aparelho ABI 7500 (Life Technologies), utilizandose o kit SyBR Green (Life Technologies). A expressão dos genes stat3, irf7, ifnar, tlr2, tlr4, tlr9, md2, cd36, il1b e beta-actin foi analisada utilizando-se o algoritmo 2<sup>-</sup> <sup>ΔΔCT</sup> (CT sendo equivalente ao ciclo de amplificação basal ou *threshold cycle*). Os primers utilizados (stat3: 5'-GACCCGCCAACAAATTAAGA-3' [forward] e 5'-TCGTGGTAAACTGGACACCA-3' [reverse]; irf7, 5'-CCAGTTGATCCGCATAAGGT-5'-GAGCCCAGCATTTTCTCTTG-3' 3´ [reverse]: [forward] е ifnar, 5´-GCCCTGCTGAATAAGACCAG-3' [forward] e 5'-GTGGGAAGCACACATGACAC-3' 5'-TGCTTTCCTGCTGGAGATTT-3' [reverse]; tlr2. [forward] е 5´-TGTAACGCAACAGCTTCAGG-3' [reverse]; tlr4, 5'-GCTTTCACCTCTGCCTTCAC-3´ е 5'-GAAACTGCCATGTTTGAGCA-3' [reverse]; 5´-[forward] tlr9, TTCCTGCCGCTGACTAATCT-3' [forward] e 5'-TGAGGACACACGGGTATGAA-3' [reverse]; md2, 5'-CTCCATAGAGTTGCCGAAGC-3' [forward] е 5´-GCGGTGAATGATGGTGAAAT-3 [reverse]; cd36, 5´-TCGGATCTGAAATCGACCTT-3' [forward] e 5'-CACAGGCTTTCCTTCTTGC-3' 5'-CAGGCAGGCAGTATCACTCA-3' 5´-[reverse]; il1b. [forward] е TAATGGGAACGTCACACACC-3' [reverse]; beta-actin, 5´е CCTGAACCCTAAGGCCAAC-3' [forward] e 5'-GCCTGGATGGCTACGTACA-3' [reverse]) foram desenhados utilizando-se o software Primer3 (DOI: http://frodo.wi.mit.edu/primer3/) e adquiridos da Life Technologies.

## 3.1.13 Priming induzido por IFN-y in vivo

Quatro doses (15 ng/kg; 10000 U/ camundongo) de IFN- $\gamma$  recombinante (rIFN- $\gamma$ ; IFN- $\gamma$  de camundongo expresso em *E. coli*; PeproTech, EUA) foram injetados i.v. em camundongos C57BL/6 a cada 2 dias, a partir do dia 192 após a infecção primária com *Pc*AS. Essa dose de rIFN- $\gamma$  foi estabelecida de acordo com um estudo anterior (130).

## 3.1.14 Análises estatísticas

Diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram analisadas com o software Prism 5 (GraphPad Inc., EUA), utilizando-se testes de análise de variância (ANOVA) com um teste de comparação múltipla de Tukey, ou teste t de Student, onde era apropriado. A existência de uma distribuição normal foi confirmada utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p era menor do que 0,05 (p<0,05).

## 3.2 ARTIGO 2 – Análise por microscopia intravital revela um papel fundamental para as DCs esplênicas na ativação de células T CD4<sup>+</sup> e na eliminação direta da parasitemia durante a fase aguda da malária experimental

## 3.2.1 Camundongos, parasitas e infecções

Camundongos fêmeas C57BL/6 (B6), B6.CD11c-DTR (108), B6.CFP (131) e B6.CD11c-YFP (132) de 6 a 8 semanas de idade foram mantidos sob condições específicas livres de patógenos no Biotério do Instituto Gulbenkian de Ciência (IGC, Oeiras, Portugal) ou no Biotério de Camundongos Isogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Os parasitas *P. chabaudi* (*Pc* – cepa AS) e o mCherry-*Pc* foram mantidos de acordo com o descrito anteriormente (124,133). Os parasitas GFP-*Pc* foram selecionados por tratamento com pirimetamina (Sigma-Aldrich) (134). Os camundongos foram infectados i.p. com 1 x 10<sup>6</sup> eritrócitos infectados, ou i.v. com 1 x 10<sup>8</sup> eritrócitos infectados. Eritrócitos infectados purificados foram utilizados onde foi especificado no texto. Em ambos os casos, os parasitas foram obtidos em um período do ciclo circadiano do hospedeiro no qual formas maduras do parasita eram predominantes (>95 % de trofozoítos maduros/ esquizontes).

## 3.2.2 Comissão de Ética

Todos os procedimentos experimentais estavam de acordo com o regulamento do Conselho Nacional de Saúde e do Colégio Brasileiro em Experimentação Animal (COBEA), e com o regulamento da *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA). Os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB-USP, com números de protocolo 0036/2007 e 0174/2011, e pela FELASA com número de protocolo AO10/2010.

## 3.2.3 Depleção de células CD11c<sup>+</sup> mediada por toxina diftérica (DTx)

Para depletar as células CD11c<sup>+</sup>, camundongos B6.CD11c-DTR foram injetados i.p com 2 ng/g/peso corporal de DTx (Sigma-Aldrich), ou com PBS como controle da depleção.

## 3.2.4 Análises de microscopia confocal intravital (CIVM)

Camundongos B6.CD11c-YFP infectados com eritrócitos infectados com mCherry-*Pc* foram anestesiados profundamente com uma injeção i.p. de 55 ng/g/peso corporal de quetamina (Imalgene 1000, Merial, EUA) e de 0,85 ng/g/peso corporal de xilazina (Rompun 2%, Bayer, Alemanha). Os baços destes camundongos foram então expostos por uma incisão de aproximadamente um cm logo abaixo das costelas. Os camundongos foram acondicionados e imobilizados sobre uma placa de metal com uma lamínula, sem o rompimento de qualquer vasculatura ou tecido conectivo do baço. A aquisição das imagens *in vivo* foi realizada com um microscópio Eclipse Ti (Nikon Instruments Inc., Japão), equipado com um sistema Andor Revolution® XD (Andor Technology, Reino Unido), uma unidade *spinning disk* Yokogawa CSU-X1 (Andor Technology), uma lente objetiva 20 x PLAN APO VC (Nikon Instruments Inc.) e um sistema de amplificação auxiliar de 1,5 x (Nikon Instruments Inc.). Os dados foram processados com o *software* MicroManager 1.2 (Programa de Licença Pública, NIH, EUA). Em cada filme, seções Z de 28 μm com intervalos Z de 4 μm foram adquiridas por 30 min. O *software* Imaris X64 7.0.0. (Andor Technology) foi utilizado para a edição de imagens e para a determinação das porcentagens de células CD11c<sup>+</sup> mCherry<sup>+</sup>, assim como o volume e esfericidade de células CD11c<sup>+</sup>. Em outros experimentos, camundongos B6.CD11c-YFP foram transferidos adotivamente com 5 x 10<sup>6</sup> células T CD4<sup>+</sup> esplênicas de camundongos B6.CFP (purificadas por separação em citometria de fluxo, utilizando-se um aparelho FACSAria – BD Biosciences). Esses camundongos foram utilizados para microscopia intravital 24 h após a infecção, de maneira semelhante ao descrito acima. O *software* Imaris foi utilizado para a edição de imagens e para a determinação da velocidade e trajetória das células CD11c<sup>+</sup>, assim como a velocidade e intensidade de contato das células T CFP<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>.

## 3.2.5 Marcação de eritrócitos infectados purifcados com Cell Tracer Violet (CTV)

O sangue de camundongos B6 infectados foi diluído em 1 ml de PBS, pipetado sobre 5 ml de Percoll 74% (GE Healthcare) e centrifugado (2500 x *g*, com aceleração e desaceleração de 5 e 0, respectivamente) por 30 min à temperatura ambiente. As camadas formadas acima do Percoll 74% foram coletadas e lavadas com meio RPMI 1640 completo (suplementado com 10 % de soro fetal bovino inativados por calor, 100 U/ ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ ml de estreptomicina, 50  $\mu$ M de 2-mercaptoetanol, 2 mM L-glutamina e 1 mM de piruvato de sódio; Life Technologies). Os eritrócitos infectados purificados (com mais de 95 % de pureza) foram incubados com CTV, de acordo com as instruções do fabricante (Life Technologies – CTV-*Pc*).

#### 3.2.6 Análises de citometria de fluxo

Camundongos B6 infectados com eritrócitos infectados com CTV-*Pc* ou com GFP-*Pc* foram sacrificados e perfundidos com PBS para a remoção dos eritrócitos infectados circulantes. Os baços foram processados e os eritrócitos restantes foram lisados com tampão de lise. Os esplenócitos (1 x 10<sup>6</sup> células por poço) foram incubados com mAbs específicos ao CD3, CD4, CD11c, CD69, CD11b, CD80, CD86, I-A<sup>b</sup>, B220,

CD36, CD64 (FcγRI), DX5 e Ter119 (BD Biosciences). As células foram analisadas por citometria de fluxo (FACSCanto), com posterior análise dos resultados obtidos pelo *software* FlowJo.

## 3.2.7 Análises de proliferação de células T

Os baços de camundongos B6.CD11c-DTR tratados com DTx ou PBS (e anteriormente infectados com *Pc*) foram processados e marcados com CTV, de acordo com as instruções do fabricante. Os esplenócitos (1 x 10<sup>6</sup> células por poço) foram incubados com eritrócitos infectados (3 x 10<sup>6</sup>) ou com meio completo sem estímulo, por 72 h à 37 °C em uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Após as incubações, as células foram incubadas com mAbs específicos ao CD3 e ao CD4, e a proliferação foi analisada por citometria de fluxo.

## 3.2.8 Detecção de IFN-y

Esplenócitos (1 x  $10^6$  células por poço) foram incubadas com eritrócitos infectados (3 x  $10^6$ ) ou com meio completo sem estímulo, por 72 h à 37 °C em uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. O IFN- $\gamma$  foi quantificado nos sobrenadantes utilizando-se o kit OptEIA IFN- $\gamma$ .

## 3.2.9 Análises de imunofluorescência

Camundongos B6 infectados com GFP-*Pc* foram sacrificados e perfundidos com PBS. Os baços foram removidos e congelados em tampão OCT Tissue-Tek® (Sakura Fineteck, Japão). Cortes de 8 µm foram obtidos com um criostato CM3050S (Leica, EUA) e fixados com 1% de paraformaldeído (Alfa Aesar, EUA) por 30 min à temperatura ambiente. Os cortes foram incubados com mAbs específicos ao CD16/CD32 (Fc block; BD Biosciences) por 30 min, seguidos por uma incubação em uma câmara escura umidificada na presença de mAbs específicos ao CD11c, CD19, CD3, CD4 (BD Biosciences) e MOMA-1 (Abcam, Reino Unido) por 2 h à temperatura ambiente. Os cortes foram então incubados por 5 min com 0,5 µg/ml de DAPI (Sigma-Aldrich), lavados com PBS e montados com Fluoromount-G (Southern Biotechnologies). As imagens foram adquiridas em um microscópio de fluorescência

DMRA2 (Leica), com o *software* de aquisição MetaMorph (Molecular Devices). A análise das imagens foi realizada com o *software* Photoshop CS4 (Adobe Inc., EUA). As porcentagens de co-localização entre pixels CD11c<sup>+</sup> e GFP<sup>+</sup>, assim como entre pixels CD11c<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>, e a distribuição de pixels GFP<sup>+</sup> nas imagens foram calculadas utilizando-se o *software* FIJI Windows 64-bit (através da utilização dos *plugins Colocalization threshold* e *Mixture Modeling Thresholding*, respectivamente; Programa de Licença Pública, NIH).

## 3.2.10 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados com o *software* Prism 5 (GraphPad Inc.), utilizandose testes ANOVA com um teste de comparação múltipla de Tukey, ou teste t de Student, onde era apropriado. A existência de uma distribuição normal foi confirmada utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor do que 0,05 (p<0,05).

## 3.3 ARTIGO 3 – Macrófagos da polpa vermelha são importantes para a geração de células T foliculares e para induzir respostas de células B Tdependentes durante a malária experimental

## 3.3.1 Camundongos, infecção e parasitas

Camundongos fêmeas C57BL/6 (B6) e B6.GFP (129) foram mantidos sob condições específicas livres de patógeno no Biotério do Instituto Gulbenkian de Ciência (IGC) ou no Biotério de Camundongos Isogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). O *Pc* (cepa AS), o mCherry-*Pc* e o GFP-*Pc* foram mantidos como descrito anteriormente (133,134). Os camundongos foram infectados i.p. com 1 x  $10^6$  eritrócitos infectados ou i.v. com 1 x  $10^8$  eritrócitos infectados. Eritrócitos infectados purificados foram utilizados quando especificado. Em ambos os casos, os parasitas foram obtidos em um período do ciclo circadiano do hospedeiro no qual as formas maduras do parasita eram predominantes (>95% de trofozoítos maduros e esquizontes).

## 3.3.2 Comissão de Ética

Todos os procedimentos experimentais estavam de acordo com o regulamento do Conselho Nacional de Saúde e do Colégio Brasileiro em Experimentação Animal (COBEA), e com o regulamento da *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA). Os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB-USP, com números de protocolo 0036/2007 e 0174/2011, e pela FELASA com número de protocolo AO10/2010.

## 3.3.3 Marcação de eritrócitos infectados purifcados com Cell Tracer Violet (CTV)

O sangue de camundongos B6 infectados foi diluído em 1 ml de PBS, pipetado sobre 5 ml de Percoll 74% (GE Healthcare) e centrifugado (2500 x *g*, com aceleração e desaceleração de 5 e 0, respectivamente) por 30 min à temperatura ambiente. As camadas formadas acima do Percoll 74% foram coletadas e lavadas com meio RPMI 1640 completo (suplementado com 10% de soro fetal bovino inativados por calor, 100 U/ ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ ml de estreptomicina, 50  $\mu$ M de 2-mercaptoetanol, 2 mM L-glutamina e 1 mM de piruvato de sódio; Life Technologies). Os eritrócitos infectados purificados (com mais de 95% de pureza) foram incubados com CTV, de acordo com as instruções do fabricante (Life Technologies – CTV-*Pc*).

### 3.3.4 Análises de citometria de fluxo

Camundongos B6 previamente infectados com o CTV-*Pc* ou com o mCherry-*Pc* foram sacrificados e perfundidos com PBS para a remoção de eritrócitos infectados circulantes. Os baços destes animais foram processados, e os eritrócitos remanescentes foram lisados com tampão de lise. Os esplenócitos (1 x 10<sup>6</sup> células por poço) foram marcados com mAbs específicos ao CD3, CD4, CD8, CD19, F4/80, MARCO, MOMA-1, CD80, CD86, I-A<sup>b</sup> (MHC de classe II), ICOSL, Fas (CD95), GL7, PD-1, CXCR5, CXCR4, ICOS, CD11c e CD69. Todos os mAbs foram adquiridos da BD Biosciences, exceto os específicos para MARCO e MOMA-1, que foram adquiridos da Abcam. As células foram analisadas por citometria de fluxo (FACSCanto), com posterior análise dos resultados com o *software* FlowJo.

#### 3.3.5 Análises de Microscopia Confocal Intravital (CIVM)

Camundongos B6 foram transferidos i.v. com 5 x 10<sup>5</sup> macrófagos F4/80<sup>+</sup> de camundongos B6.GFP (purificados por separação em citometria de fluxo, utilizandose um aparelho FACSAria); 24 horas após a transferência, estes camundongos foram infectados i.v. com mCherry-Pc. Após 30 min de infecção, os camundongos foram anestesiados com uma dose i.p. de 55 ng/g de peso corporal de cetamina (Imalgene 1000, Merial) e de 0,85 ng/g de peso corporal de xilazina (Rompun 2%, Bayer). Os baços destes camundongos foram expostos por uma incisão de 1 cm logo abaixo das costelas. Os camundongos foram então acondicionados e imobilizados sobre uma placa de metal com uma lamínula, sem o rompimento de qualquer vasculatura ou tecido conectivo do baço. A aquisição das imagens in vivo foi realizada com um microscópio Eclipse Ti (Nikon Instruments Inc., Japão), equipado com um sistema Andor Revolution® XD (Andor Technology, Reino Unido), uma unidade spinning disk Yokogawa CSU-X1 (Andor Technology), uma lente objetiva 20 x PLAN APO VC (Nikon Instruments Inc.) e um sistema de amplificação auxiliar de 1,5 x (Nikon Instruments Inc.). Os dados foram processados com o software MicroManager 1.2 (Programa de Licença Pública, NIH, EUA). Em cada filme, seções Z de 28 µm com intervalos Z de 4 µm foram adquiridas por 30 min. O software Imaris X64 7.0.0. (Andor Technology) foi utilizado para a edição de imagens.

#### 3.3.6 Análises de imunofluorescência

Camundongos B6 infectados com GFP-*Pc* foram sacrificados e perfundidos com PBS. Os baços foram removidos e congelados em tampão OCT Tissue-Tek® (Sakura Fineteck, Japão). Cortes de 8 µm foram obtidos com um criostato CM3050S (Leica, EUA) e fixados com 1% de paraformaldeído (Alfa Aesar, EUA) por 30 min à temperatura ambiente. Os cortes foram incubados com mAbs específicos ao CD16/CD32 (Fc block; BD Biosciences) por 30 min, seguidos por uma incubação em uma câmara escura umidificada na presença de mAbs específicos ao F4/80, CD3, CD4 (BD Biosciences), MARCO e MOMA-1 (Abcam) por 2 h à temperatura ambiente. Os cortes foram então incubados por 5 min com 0,5 µg/ml de DAPI (Sigma-Aldrich), lavados com PBS e montados com Fluoromount-G (Southern

Biotechnologies). As imagens foram adquiridas em um microscópio de fluorescência DMRA2 (Leica), com o *software* de aquisição MetaMorph (Molecular Devices). A análise das imagens foi realizada com o *software* Photoshop CS4 (Adobe Inc., EUA).

## 3.3.7 Ensaios de depleção com lipossomos de clodronato

Para a depleção dos macrófagos, suspensões de lipossomos de clodronato foram preparadas de acordo com o descrito anteriormente (135,136). Os camundongos foram injetados i.v. com 1 mg/kg ou 157 µg/kg das suspensões de lipossomos de clodronato 8 dias antes da infecção com o *Pc*. A depleção de macrófagos da RP ou da MZ foi avaliada no dia 8 após a depleção, através de análise de citometria de fluxo, com marcações com mAbs específicos ao MARCO, MOMA-1, F4/80, CD11b e CD11c. Os lipossomos com clodronato (diclorometileno bisfosfato) ou com PBS foram adquiridos no endereço *clodronateliposomes.com*.

## 3.3.8 Ensaios de proliferação celular

Os baços dos camundongos experimentais foram processados, e as células foram marcadas com CTV de acordo com as instruções do fabricante. Os esplenócitos (1 x  $10^6$  células por poço) foram mantidos em cultura por 72 h à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> na presença de eritrócitos infectados com o *Pc* (3 x  $10^6$  por poço) ou com meio completo sem estímulo. As células foram então marcadas com mAbs específicos ao CD3, CD4, CD8 e CD19, e a proliferação foi avaliada por citometria de fluxo (FACSCanto).

## 3.3.9 Produção de citocinas

Esplenócitos (1 x 10<sup>6</sup> células por poço) foram mantidos em cultura por 72 h à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> na presença de eritrócitos infectados com o *Pc* (3 x 10<sup>6</sup> por poço) ou com meio completo sem estímulo. Os sobrenadantes foram coletados após esse período, e os níveis de IFN- $\gamma$  e IL-21 foram quantificados pela utilização dos kits OptEIA IFN- $\gamma$  e Ready-Set-Go IL-21, respectivamente, de acordo com as instruções dos fabricantes (BD Biosciences e eBiosciences, respectivamente).

#### 3.3.10 Produção de anticorpos IgG e IgM específicos ao Pc

Para detectar anticorpos específicos ao Pc nos soros de camundongos experimentais, testes de ELISA foram realizados de acordo com o descrito em (127). Resumidamente, placas de 96 poços (Costar) foram incubadas à 4 °C overnight com extratos totais de Pc, BCG ou T. cruzi (todos os extratos com concentração de 10 µg/ml). As placas foram saturadas com 3% de BSA por 6 h. Após a lavagem das placas, 100 µl de amostras de soros dos camundongos experimentais (em diluição seriada, com diluição inicial em 1/50) foram adicionadas, e as placas mantidas por 2 h à temperatura ambiente. A detecção foi realizada pela adição de anticorpos de cabra anti-IgM, anti-IgG1 ou anti-IgG2a de camundongo, conjugados à enzima peroxidase (Southern Biotechnology Associates, EUA) por 1 h; após a lavagem das placas, 100 µl de Tetrametilbenzidina (Life Technologies) foi adicionado em cada poço, e 15 min depois os valores de absorbância foram quantificados por densidade óptica (DO) utilizando-se um espectrofotômetro Spectra Max 190 (Molecular Devices, EUA), com um filtro de comprimento de onda de 650 nm. Os níveis de anticorpos em cada amostra de soro foram calculados como o inverso do título endpoint, o qual foi definido como a maior diluição que igualou o valor de DO obtido nos controles negativos (poços com amostras de soro de camundongos RAGKO).

### 3.3.11 Ensaios de co-culturas in vitro

Células T CD4<sup>+</sup> de camundongos com 0 ou 3 dias de infecção dos grupos experimentais tratados com lipossomos de clodronato ou com PBS (separadas através de seleção positiva com uso de colunas magnéticas LS – Miltenyi Biotech), previamente marcadas com CTV, foram incubadas (5 x 10<sup>5</sup> células por poço) por 72 h ou 96 h com células dendríticas (DCs – 1 x 10<sup>5</sup> células por poço) ou com macrófagos F4/80<sup>high</sup> (1 x 10<sup>5</sup> células por poço), na presença de eritrócitos infectados pelo *Pc* (1,5 x 10<sup>6</sup> por poço) ou com meio completo sem estímulo. Após o período de incubação, as células foram marcadas com mAbs específicos ao CD3, CD4, CD8, PD-1, CXCR4, CXCR5 e CD69, e analisadas através de citometria de fluxo (FACSCanto). Os sobrenadantes foram retirados e as citocinas IFN-γ e IL-21 foram quantificadas por ELISA, de acordo com o descrito anteriormente.

#### 3.3.12 Análises estatísticas

Todos os resultados foram analisados por testes de análise de variância (ANOVA), com um teste de comparação múltipla de Tukey. A existência de uma distribuição normal foi confirmada utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor do que 0,05 (p<0,05).

## **4 RESULTADOS**

## 4.1 ARTIGO 1 – O priming induzido por IFN-γ mantém a imunidade cepaindependente de longa duração contra a fase sanguínea da infecção pelo Plasmodium chabaudi

### 4.1.1 A eliminação completa da parasitemia residual induz uma perda parcial da imunidade protetora à parasitas heterólogos PcAJ

A infecção de camundongos C57BL/6 com PcAS induziu uma parasitemia aguda, com subsequente controle (Figura 3A). Após 30 dias de infecção, os parasitas não foram mais detectados em esfregaços sanguíneos, e a presença de parasitemia subpatente foi avaliada através de transferência sanguínea para camundongos RAGKO. A presença de parasitemia residual foi detectada no dia 60 p.i., porém não nos dias 200 ou 260 p.i. (Figura 3B). Para avaliar se estes camundongos mantiveram a imunidade protetora contra parasitas de cepas homólogas ou heterólogas à infecção primária, os camundongos experimentais foram desafiados i.v. com um inóculo alto  $(1 \times 10^8 \text{ eritrócitos infectados})$  de *Pc*AS ou da cepa letal PcAJ (137). Enquanto camundongos no dia 60 p.i. eliminaram de maneira eficiente ambos os desafios com 100 % de sobrevivência, camundongos no dia 200 p.i. desenvolveram baixos, porém significativos, níveis de parasitemia nos primeiros 3 dias após o desafio com PcAS, e não foram capazes de controlar a replicação do PcAJ, resultando em uma mortalidade superior a 70 % (Figuras 3C-D e 3F-G). Para avaliar se a imunidade adquirida de longa duração requer uma ativação de novo do sistema imune, a capacidade destes camundongos em inibir um primeiro ciclo de invasão de eritrócitos quando desafiados i.v. com eritrócitos infectados com formas maduras do parasita (5 x 10<sup>8</sup> eritrócitos infectados). Camundongos com 60 dias p.i. inibiram de modo eficiente a re-infecção tanto pelo PcAS quanto pelo PcAJ (Figuras 3E e 3H). Em contraste, a eficiência de inibição de re-infecção pelo PcAJ foi semelhante em camundongos com 200 dias p.i. e animais não-infectados. Uma vez que os camundongos com 200 dias p.i. mantiveram a capacidade em inibir a reinfecção de eritrócitos pelo PcAS, é possível concluir que a eliminação completa da parasitemia residual está associada com a perda de mecanismos efetores imunes que são particularmente importantes para a proteção contra parasitas heterólogos PcAJ.



**Figura 3** – Parasitemias e curvas de sobrevivência de camundongos C57BL/6 com infecção primária pelo *Pc*AS, e com infecção secundária nos dias 60 e 200 p.i. com o *Pc*AS ou o *Pc*AJ.

(A) Curvas de parasitemia para camundongos C57BL/6 infectados i.p. com 1 x  $10^6 PcAS$ . (B) Parasitemias para camundongos RAGKO transferidos com 100 µl de sangue proveniente de camundongos C57BL/6 com 60, 200 ou 260 dias p.i., monitorados nos dias 7 e 14 após a transferência sanguínea. ND – não detectado. (C) Curvas de parasitemia para camundongos controles pareados por idade (AMCs), camundongos com 60 dias e com 200 dias p.i., desafiados i.v. com 1 x  $10^8 PcAS$ . (D) Curvas de sobrevivência para os camundongos descritos em C. (E) Índice de re-infecção para camundongos AMCs, com 60 dias e com 200 dias p.i., desafiados i.v. com 5 x  $10^8 PcAS$  (trofozoítos maduros e esquizontes). (F) Curvas de parasitemia para camundongos AMCs, com 60 dias p.i., desafiados i.v. com 1 x  $10^8 PcAJ$ . (G) Curvas de sobrevivência para os camundongos descritos em F. (H) Índice de re-infecção para camundongos descritos em F. (H) Índice de re-infecção para camundongos descritos em F. (H) Índice de re-infecção para camundongos descritos em F. (H) Índice de re-infecção para camundongos AMCs, com 60 dias e com 200 dias p.i., desafiados i.v. com 5 x  $10^8 PcAJ$ . (G) Curvas de sobrevivência para os camundongos descritos em F. (H) Índice de re-infecção para camundongos AMCs, com 60 dias e com 200 dias p.i., desafiados i.v. com 5 x  $10^8 PcAJ$  (trofozoítos maduros e esquizontes). (C-H) Diferenças significativas foram analisadas entre os grupos indicados, com \* sendo p<0,05. (A-H) Os dados mostram a média ± desvio-padrão (n = 4-6) de um experimento representativo de três.

#### 4.1.2 A perda parcial na imunidade protetora aos parasitas heterólogos PcAJ parece resultar de uma redução nas populações de células T CD4+ efetoras e de memória efetora

A inativação dos sistemas imunes inato e/ou adquirido pode ser importante para o declínio da imunidade protetora aos parasitas heterólogos PcAJ, após a completa eliminação da parasitemia residual da infecção primária. A imunidade humoral não parece estar envolvida na perda parcial da imunidade protetora, uma vez que os títulos de anticorpos IgG1 e IgG2a parasita-específicos foram mantidos ou até mesmo aumentados em camundongos com 200 dias p.i. quando comparados com os títulos em camundongos com 60 dias p.i. (Figura 4A). Desta forma, diferentes subtipos de células T CD4<sup>+</sup> dos baços destes camundongos – baseados em um estudo recente (138) que definiu células T CD4<sup>+</sup> efetoras (T<sub>E</sub>), células T CD4<sup>+</sup> de memória efetora ( $T_{EM}$ ) e células T CD4<sup>+</sup> de memória central ( $T_{CM}$ ), como descrito na Figura 5. Em camundongos com 60 dias p.i., há um aumento significativo nos números de células T<sub>E</sub> e T<sub>EM</sub> por baço em comparação com os números destas células em camundongos com 200 dias de infecção e controles com idades semelhantes (AMCs); os números de células T<sub>CM</sub> foram mantidos em quantidades comparáveis entre camundongos com 60 dias p.i. e camundongos com 200 dias p.i. (Figura 4B). De fato, no dia 60 p.i., a maior parte das células T CD4<sup>+</sup> de memória (T<sub>M</sub>) apresentou um fenótipo de células T<sub>EM</sub>, nos quais a molécula CD62L estava expressa em baixas quantidades. A redução nos números de células T<sub>E</sub> e T<sub>EM</sub> observada após a eliminação completa da parasitemia foi acompanhada por uma perda na capacidade de células T CD4<sup>+</sup> em proliferar e produzir IFN-γ em resposta ao estímulo com eritrócitos infectados e em proliferar em resposta ao estímulo com MSP-1<sub>19</sub> (Figuras 4C e 4D). A importância do IFN-y na manutenção da imunidade protetora contra os parasitas heterólogos em camundongos com parasitemia residual foi então investigada, através do tratamento de camundongos com 60 dias p.i. com mAbs depletores anti-IFN-y. Foi possível observar uma perda parcial na capacidade de controlar o desafio com PcAJ em camundongos com 60 dias p.i. depletados de IFN-y, em comparação com camundongos com 60 dias p.i. tratados com controle isotípico (Figura 4E). Esse efeito foi acompanhado de uma redução mais acentuada na temperatura corporal (Figura 4F).

**Figura 4** – Anticorpos IgG parasita-específicos, subtipos de células T CD4<sup>+</sup>, respostas de células T CD4<sup>+</sup> à eritrócitos infectados e ao MSP-1<sub>19</sub> em camundongos C57BL/6 crônicos e curados, e influência do IFN- $\gamma$  na parasitemia e temperatura corporal durante a fase crônica da infecção.



Camundongos C57BL/6 foram analisados nos dias 60 e 200 p.i., em comparação à camundongos AMCs. (A) Títulos séricos de anticorpos IgG1 e IgG2a parasita-especificos, determinados por ELISA. (B) Números de células T CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> IL-7Ra<sup>+</sup> CD62L<sup>hi</sup> CD27<sup>+</sup>), T<sub>EM</sub> (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> IL-7Ra<sup>+</sup> CD62L<sup>lo</sup>) e T<sub>E</sub> (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> IL-7Ra<sup>-</sup> CD62L<sup>lo</sup>) por baço, determinados por citometria de fluxo. (C) Porcentagens de proliferação de células T CD4<sup>+</sup> (CFSE<sup>lo</sup>), estimuladas por 72 h com eritrócitos infectados (1 células T para 3 eritrócitos infectados) ou com MSP-1<sub>19</sub> (10 µg/ml), determinadas por citometria de fluxo. (D) Concentrações de IFN- $\gamma$  nos sobrenadantes das culturas celulares descritas em C, determinadas por ELISA. ND – não detectado. (E) Curvas de parasitemia para camundongos com 60 dias p.i., tratados previamente com mAbs anti-IFN- $\gamma$  ou com controles isotípicos, e subsequentemente re-infectados i.v. com 1 x 10<sup>8</sup> eritrócitos infectados com *Pc*AJ. (F) Temperaturas corporais nos camundongos descritos em E. (A-D) Diferenças significativas foram analisadas entre os camundongos tratados com anti-IFN- $\gamma$  e os

camundongos tratados com controle isotípico, com \* sendo p<0,05. (A-F) Os dados mostram a média ± desvio-padrão (n = 3-6) de um experimento representativo de três.

**Figura 5** – Estratégias de *gating* utilizadas para definer os subtipos de células T CD4<sup>+</sup>.



Camundongos C57BL/6 foram analisados nos dias 7 e 60 p.i. com 1 x 10<sup>6</sup> eritrócitos infectados pelo *Pc*AS. Os leucócitos esplênicos foram selecionados pelo tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A). Após a remoção dos *doublets* da análise (FSC-H vs. FSC-W), as células CD4<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> foram subdivididas de acordo com a expressão de CD127 (IL-7R $\alpha$ ), CD62L e CD27, em células CD4<sup>+</sup> T<sub>E</sub> (CD127<sup>-</sup> CD62L<sup>lo</sup> – *gate* verde), células CD4<sup>+</sup> T<sub>M</sub> (CD127<sup>+</sup> - *gate* vermelho), células CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> (CD127<sup>+</sup> CD62L<sup>lo</sup> – *gate* azul), e células CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> (CD127<sup>+</sup> CD62L<sup>hi</sup> CD27<sup>+</sup> - *gate* laranja). Gráficos de citometria representativos de células CD4<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> de camundongos com 7 e 60 dias p.i. foram utilizados para definir os subtipos de células T<sub>E</sub> e T<sub>M</sub>.

#### 4.1.3 O priming induzido por IFN-γ do sistema imune inato diminui após a eliminação da parasitemia residual

A resposta ineficiente de células T CD4<sup>+</sup> aos eritrócitos infectados pode não explicar completamente a perda parcial na imunidade protetora ao desafio com parasitas heterólogos observado após a eliminação da parasitemia residual. Tal hipótese vem do fato que células T CD4<sup>+</sup> estimuladas pelos eritrócitos infectados levam alguns dias para secretar IFN-γ, mas camundongos cronicamente infectados e camundongos curados diferem nas suas capacidades em prontamente inibir a re-invasão de novos eritrócitos (Figura 3H). Desta forma, nós postulamos que a eliminação completa da parasitemia residual reduz o efeito do *priming* induzido pelo IFN-γ, um mecanismo pelo qual o sistema imune inato tem sua resposta aumentada (41). Uma vez que os mecanismos moleculares do *priming* induzido pelo IFN-γ

envolvem a ativação de TLRs e outros genes induzidos pelo IFN (139), a expressão do mRNA dos genes tlr2, tlr4, tlr9, md2, cd36, il1b, stat3, irf7 e ifnar em DCs esplênicas dos camundongos experimentais foram comparadas. Essa população celular está presente principalmente na polpa vermelha do baço, onde estão em contato direto com eritrócitos infectados, e também na polpa branca, contribuindo dessa forma tanto para a eliminação dos parasitas quanto para a ativação de células T (101,140). Um aumento significativo, em comparação com DCs de camundongos não infectados, na expressão gênica nas DCs foi observado em camundongos com 60 dias p.i., com exceção do mRNA para ifnar, enquanto não há aumento de expressão em nenhum dos genes nas DCs de camundongos com 200 dias p.i. (Figura 6A). Uma vez que a alta expressão gênica de TLRs durante a fase aguda da infecção pelo PcAS tem sido associada com uma produção aumentada de IFN-y em resposta ao estímulo com agonistas de TLR (85), a resposta de esplenócitos à agonistas de TLR4 e TLR9 (LPS e CpG, respectivamente) foi avaliada. De fato, esplenócitos de camundongos com 60 dias p.i. produziram níveis aumentados de IFN-y em resposta ao LPS e ao CpG, enquanto não houve resposta significativa para os esplenócitos de camundongos com 200 dias de infecção, ou controles (Figura 6B).





Camundongos C57BL/6 foram analisados nos dias 60 e 200 p.i. com 1 x  $10^6$  eritrócitos infectados pelo *PcAS*, em comparação com camundongos AMCs. (A) Aumento da expressão de mRNAs para *stat3*, *ifnar*, *irf7*, *tlr2*, *tlr4*, *tlr9*, *md2*, *cd3*6 e *il1b* em relação à amostras-controle (0d), determinado por qPCR em DCs esplênicas e analisados pelo método  $-\Delta\Delta$ CT. (B) Concentrações de IFN- $\gamma$  em sobrenadantes de culturas de células esplênicas estimuladas com LPS (10 µg/ml) ou com CpG ODN 1826 (10 µg/ml), por 72 h, determinadas por ELISA. (A-B) Diferenças significativas foram analisadas entre camundongos com 60 e 200 dias p.i., com \* sendo p<0,05. Os dados mostram a média ± desvio-padrão (n=5-6) de um experimento representativo de três.

### 4.1.4 A sinalização mediada pelo MyD88 é fundamental para as respostas de células T CD4<sup>+</sup> e para o priming induzido por IFN-γ em DCs esplênicas de camundongos cronicamente infectados

Nossos resultados anteriores correlacionam a persistência da imunidade protetora cepa-independente ao *P.chabaudi* com a manutenção de níveis elevados de células T<sub>E</sub> e T<sub>EM</sub>, assim como com a hiper-responsividade ao TLR. Então, é possível que a sinalização pelo TLR possa contribuir para a geração e/ou manutenção de células  $T_E$  e  $T_{EM}$ , e consequentemente para o aumento do *priming* induzido pelo IFN-y de DCs esplênicas. Em concordância com esta hipótese, camundongos nocautes para a molécula adaptadora MyD88 apresentaram maiores porcentagens de parasitemia crônica em comparação com camundongos C57BL/6 (Figura 7A). Apesar do fato de que números semelhantes de células T<sub>E</sub> foram encontradas nos baços de camundongos C57BL/6 e MyD88KO com 60 dias p.i., há um menor número de células T<sub>EM</sub> nos camundongos MyD88KO (Figura 7B). Além disso, as respostas de células T CD4<sup>+</sup> aos parasitas são diminuídas em camundongos MyD88KO com 60 dias p.i., como demonstrado pela diminuída resposta proliferativa e de produção de IFN-y in vitro ao estímulo com eritrócitos infectados ou com MSP-1<sub>19</sub> (Figuras 7C e 7D). A ausência da molécula MyD88 também resultou em uma expressão reduzida do mRNA dos genes induzidos por IFN stat3, irf7 e ifnar em DCs esplênicas (Figura 7E), indicando que o *priming* induzido pelo IFN-γ também é dependente do MyD88. Desta forma, a via de sinalização parece ser fundamental para a manutenção das respostas de células T CD4<sup>+</sup>, a qual pode induzir o *priming* por IFN-y e um controle eficiente da parasitemia residual.

**Figura 7** – Curvas de parasitemia, subtipos de células T CD4<sup>+</sup>, respostas de células T CD4<sup>+</sup> a eritrócitos infectados e à MSP-1<sub>19</sub>, e expressão de genes induzidos pelo IFN em camundongos C57BL/6 e MyD88KO infectados com *Pc*AS.



Camundongos C57BL/6 e MyD88KO infectados com 1 x  $10^6$  eritrócitos infectados foram analisados em comparação com camundongos AMCs. (A) Curvas de parasitemia. (B) Números de células CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> IL-7Ra<sup>+</sup> CD62L<sup>hi</sup> CD27<sup>+</sup>), T<sub>EM</sub> (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> IL-7Ra<sup>+</sup> CD62L<sup>lo</sup>) e T<sub>E</sub> (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> IL-7Ra<sup>-</sup> CD62L<sup>lo</sup>) por baço no dia 60 p.i., determinados por citometria de fluxo. (C) Porcentagens de proliferação de células T CD4<sup>+</sup> (CFSE<sup>lo</sup>) esplênicas de camundongos com 60 dias p.i. estimuladas por 72 h com eritrócitos infectados (1 células T para cada 3 eritrócitos infectados) ou MSP-1<sub>19</sub> (10 µg/ml), determinadas por citometria de fluxo. (D) Concentrações de IFN- $\gamma$  nos sobrenadantes de culturas celulares descritas em C, determinadas por ELISA. ND – não detectado. (E) Aumento da expressão de mRNAs para *stat3, irf7* e *ifnar* em relação a amostras-controle (0d), determinado por qPCR e analisado pelo método – $\Delta\Delta$ CT. (A-E) Diferenças significativas foram analisadas entre camundongos C57BL/6 e MyD88KO, com \* sendo p<0,05. Os dados mostram a média ± desvio-padrão (n=4-6) de um experimento representativo de três.

#### 4.1.5 O priming in vivo com IFN-γ recombinante restaura a imunidade protetora aos parasitas heterólogos PcAJ em camundongos sem parasitemia residual

Nossos resultados anteriores sugerem que a eliminação completa da parasitemia residual induz uma redução no *priming* induzido por IFN-γ do sistema imune inato e

consequentemente a um controle deficiente da re-infecção, em especial a reinfecção com o PcAJ. Para investigar se o priming in vivo com IFN-y pode restaurar o estado de ativação do sistema imune observado na presença da parasitemia residual, camundongos C57BL/6 com 192 dias p.i. foram tratados a cada 2 dias com 4 doses sub-ótimas (indutoras do *priming*) i.v. de IFN-y recombinante (Figura 8A), de acordo com o estabelecido em (130). Confirmando que este tratamento induz o priming do sistema imune inato, esplenócitos de camundongos com 200 dias p.i. e tratados com IFN-y recombinante produziram quantidades significativamente aumentadas de IFN-y em resposta ao LPS e ao CpG, em comparação com camundongos com 200 dias p.i e não-tratados (Figura 8B). Os camundongos tratados com IFN-y recombinante apresentaram uma melhora na capacidade em controlar uma re-infecção pelo PcAS (Figura 9A) e com o PcAJ (Figura 8C). Além disso, em camundongos com 200 dias p.i. desafiados com o PcAJ, o tratamento com IFN-y levou à 100 % de sobrevivência, e atenuou as manifestações clínicas da doença, isto é, uma redução na temperatura corporal e na concentração de hemoglobina no sangue (Figuras 8D e 8E). Outros parâmetros, como peso corporal e dano hepático, foram semelhantes aos observados em camundongos não infectados para ambos os grupos de camundongos desafiados, tratados ou não tratados (dados não mostrados). Camundongos controles tratados com IFN-y recombinante apresentaram um aumento na produção de IFN-y espontânea ou em resposta ao estímulo com LPS (Figura 9B), mas estes camundongos não se protegeram contra a infecção primária pelo PcAS (Figura 9C). Estes resultados indicam que o priming induzido por IFN-y restaura a imunidade protetora cepaindependente em camundongos que estiveram previamente em contato com o Pc.

**Figura 8** – Capacidade de resposta ao TLR, curvas de parasitemia, curvas de sobrevivência e manifestações clínicas da doença em camundongos C57BL/6 curados, tratados ou não com IFN-γ e re-infectados com parasitas heterólogos *Pc*AJ.



Iniciando no dia 192 p.i., camundongos C57BL/6 foram tratados a cada 2 dias com 4 doses i.v. (15 ng/kg; 10000 U por camundongo) de rIFN- $\gamma$ , e então re-infectados i.v. com 1 x 10<sup>8</sup> eritrócitos infectados com *Pc*AJ. Os camundongos tratados com IFN- $\gamma$  foram comparados com camundongos não tratados e com AMCs. (A) Desenho experimental. (B) Concentrações de IFN- $\gamma$  de sobrenadantes de cultura celular de camundongos não re-infectados, estimulados com LPS (10 µg/ml) ou CpG ODN 1826 (10 µg/ml) por 72 h, determinadas por ELISA. (C) Curvas de parasitemia. (D) Curvas de sobrevivência. (E) Temperaturas corporais dos camundongos. (F) Concentrações de hemoglobina. Diferenças significativas foram analisadas entre camundongos tratados ou não tratados com IFN- $\gamma$ , com \* sendo p<0,05. Os dados mostram a média ± desvio-padrão (n = 4-6) de um experimento representativo de três.

**Figura 9** – Curvas de parasitemia e respostas de células T CD4<sup>+</sup> em camundongos C57BL/6 curados e AMCs, tratados com IFN- $\gamma$  e infectados com parasitas homólogos *Pc*AS.



Iniciando no dia 192 p.i., camundongos C57BL/6 foram tratados a cada 2 dias com 4 doses i.v. (15 ng/kg; 10000 U por camundongo) de rIFN- $\gamma$ . Camundongos AMCs não infectados foram tratados utilizando-se o mesmo protocolo. Os camundongos tratados com IFN- $\gamma$  foram comparados com camundongos não tratados. (A) Curvas de parasitemia para camundongos com 200 dias p.i., re-infectados i.v. com 1 x 10<sup>8</sup> eritrócitos infectados. (B) Produção de IFN- $\gamma$  estimulada por LPS em camundongos AMCs. (C) Curvas de parasitemia para AMCs re-infectados i.p. com 1 x 10<sup>6</sup> eritrócitos infectados. (A-C) Diferenças significativas foram analisadas entre camundongos tratados ou não tratados com IFN- $\gamma$ , com \* sendo p<0,05. Os dados mostram a média ± desvio-padrão (n = 4-6) de um experimento representativo de três.

#### 4.1.6 O priming in vivo com IFN-γ recombinante restaura a resposta de células T CD4<sup>+</sup> aos parasitas em camundongos sem parasitemia residual

A relevância da via de sinalização do TLR no desenvolvimento da imunidade adquirida ao *P. chabaudi* é sugerida pelos nossos resultados mostrando um aumento na parasitemia em camundongos MyD88KO cronicamente infectados, o que está associado à baixos números de células T<sub>EM</sub> e uma reduzida capacidade de proliferação e produção de IFN-γ pelas células T CD4<sup>+</sup> em resposta ao estímulo com eritrócitos infectados. Como nossos resultados anteriores também mostraram que o tratamento de camundongos curados com doses baixas de IFN-γ recombinante

restauram tanto a hiper-responsividade ao TLR e a imunidade protetora cepaindependente, nós decidimos investigar se este tratamento também aumenta as respostas de células T CD4<sup>+</sup> nos camundongos com 200 dias p.i.. Nossos resultados mostram uma diminuição na expressão de CD62L em células T CD4<sup>+</sup> de memória ( $T_M$ ) em camundongos tratados com o IFN- $\gamma$ , indicando uma mudança de fenótipo destas células de T<sub>CM</sub> para T<sub>EM</sub> (Figura 10A). Essa mudança resultou de um aumento nos números de células T<sub>EM</sub> e uma concomitante diminuição nos números de células T<sub>CM</sub> em comparação com o observado em camundongos com 200 dias p.i. e não tratados, enquanto os números de células T<sub>E</sub> não foram modificados (Figura 10B). O priming com IFN-y destes camundongos não está associado com mudanças na dinâmica populacional de células fagocíticas do baço; camundongos com 200 dias p.i. tratados ou não com IFN-y apresentaram números semelhantes por baço de DCs, macrófagos F4/80<sup>+</sup>, monócitos inflamatórios Ly6C<sup>hi</sup> e neutrófilos (Figura 11). O priming in vivo com IFN-y re-estabeleceu a resposta de células T CD4<sup>+</sup> ao estímulo com eritrócitos infectados e com MSP-1<sub>19</sub> em termos de proliferação (Figuras 10C e 10D) e de produção de IFN-y (Figura 10E). O tratamento de camundongos controles com IFN-y recombinante induziu um pequeno aumento na capacidade espontânea de proliferação de células T CD4<sup>+</sup>, mas não causou nenhum efeito na proliferação de células T CD4<sup>+</sup> ou na produção de IFN-y em resposta ao estímulo com eritrócitos infectados (Figura 12). Desta forma, é possível concluir que o *priming* induzido pelo IFN-γ restaura a capacidade de células T CD4<sup>+</sup> de memória em responder aos parasitas em camundongos que eliminaram completamente a parasitemia residual.



**Figura 10** – Subtipos de células T CD4<sup>+</sup> e respostas de células T CD4<sup>+</sup> a eritrócitos infectados e a MSP-1<sub>19</sub> em camundongos C57BL/6 curados e tratados com IFN-γ.

Iniciando no dia 192 p.i, camundongos C57BL/6 foram tratados a cada 2 dias com 4 doses i.v. (15 ng/kg; 10000 U por camundongo) de rIFN-γ. Os camundongos tratados com IFN-γ foram analisados no dia 200 p.i. em comparação com camundongos não tratados e camundongos AMCs. (A) Expressão de CD62L em células CD4<sup>+</sup> T<sub>M</sub> (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> IL-7Rα<sup>+</sup>), determinada por citometria de fluxo. (B) Números de células CD4<sup>+</sup> T<sub>M</sub> (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> IL-7Rα<sup>+</sup>), determinada por citometria de fluxo. (B) Números de células CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> IL-7Rα<sup>+</sup> CD62L<sup>hi</sup> CD27<sup>+</sup>), T<sub>EM</sub> (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> IL-7Rα<sup>+</sup> CD62L<sup>lo</sup>) e T<sub>E</sub> (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> IL-7Rα<sup>-</sup> CD62L<sup>lo</sup>) por baço. (C) Histogramas representativos de marcação com CFSE de células T CD4<sup>+</sup> esplênicas estimuladas por 72 h com eritrócitos infectados (1 célula T para 3 eritrócitos infectados), obtidos por citometria de fluxo. (D) Porcentagens de proliferação de células T CD4<sup>+</sup> (CFSE<sup>lo</sup>) estimuladas por 72 h com eritrócitos infectados (1 célula T para cada 3 eritrócitos infectados) ou com MSP-1<sub>19</sub> (10 µg/mI), determinadas por citometria de fluxo. (E) Concentrações de IFN-γ em sobrenadantes das culturas celulares descritas em C, determinadas por ELISA. (B, D, e E) Diferenças significativas foram analisadas entre camundongos tratados com IFN-γ ou não tratados, com \* sendo p<0,05. Os dados mostram a média ± desvio-padrão (n = 5-6) de um experimento representativo de três.

**Figura 11** – Números de células fagocíticas esplênicas em camundongos C57BL/6 curados e tratados com IFN-γ.



Iniciando no dia 192 p.i., camundongos C57BL/6 foram tratados a cada 2 dias com 4 doses i.v. (15 ng/kg; 10000 U por camundongo) de rIFN- $\gamma$ . Os camundongos tratados com IFN- $\gamma$  foram analisados no dia 200 p.i., em comparação com camundongos não tratados e camundongos AMCs. (A) Gráficos representativos mostrando DCs (CD11c<sup>+</sup> I-A<sup>b+</sup>), macrófagos da polpa vermelha (RpMΦs – CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>h</sup>), monócitos inflamatórios (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>lo</sup> Ly6C<sup>hi</sup> Ly6G<sup>-</sup>) e neutrófilos (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>-</sup> Ly6C<sup>hi</sup> Ly6G<sup>+</sup>). (B) Números por baço das quatro populações fagocíticas descritas. Diferenças significativas foram analisadas entre camundongos tratados com IFN- $\gamma$  e camundongos não tratados, com \* sendo p<0,05. Os dados mostram a média ± desvio-padrão (n = 4-6) de um experimento representativo de três.



**Figura 12** – Respostas de células T CD4<sup>+</sup> a eritrócitos infectados em camundongos AMCs tratados com IFN-γ.

Camundongos C57BL/6 AMCs foram tratados a cada 2 dias com 4 doses i.v. (15 ng/kg; 10000 U por camundongo) de rIFN- $\gamma$ . Os camundongos tratados com IFN- $\gamma$  foram analisados em comparação com camundongos não tratados. Como um controle positivo, camundongos AMCs foram infectados i.p. com 1 x 10<sup>6</sup> *Pc*AS, e analisados 4 dias depois (4d). (A) Histogramas representativos da marcação com CFSE de células T CD4<sup>+</sup> esplênicas estimuladas por 72 h com eritrócitos infectados (1 células T para 3 eritrócitos infectados), determinados por citometria de fluxo. (B) Porcentagens de proliferação de células T CD4<sup>+</sup> (CFSE<sup>10</sup>) estimuladas por 72 h com eritrócitos infectados (1 célula T para 3 eritrócitos infectados), determinadas por citometria de fluxo. (C) Concentrações de IFN- $\gamma$  nos sobrenadantes das culturas celulares descritas em B, determinadas por ELISA. (B-C) Diferenças significativas foram analisadas entre camundongos tratados com IFN- $\gamma$  e não tratados, com \* sendo p<0,05. Os dados mostram a média ± desvio-padrão (n = 5-6) de um experimento representativo de três.

4.2 ARTIGO 2 – Análise por microscopia intravital revela um papel fundamental para as DCs esplênicas na ativação de células T CD4<sup>+</sup> e na eliminação direta da parasitemia durante a fase aguda da malária experimental

### 4.2.1 DCs são necessárias para o controle da parasitemia e para a ativação de células T CD4<sup>+</sup> esplênicas durante a infecção sanguínea pelo Pc

Para avaliar se as DCs são importantes no controle precoce da infecção sanguínea pelo *Pc*, camundongos B6.CD11c-DTR foram tratados com toxina diftérica (DTx) para a eliminação de células CD11c<sup>+</sup> (Figura 13A). Camundongos tratados com DTx e infectados pelo *Pc* apresentaram maiores níveis de parasitemia (Figura 13B), de mortalidade (Figura 13C) e perda de peso corporal (Figura 13D) em comparação

com camundongos tratados com PBS. No dia 4 p.i., camundongos B6.CD11c-DTR tratados com DTx apresentaram números reduzidos por baço de células T CD4<sup>+</sup> (Figura 13E). O tratamento com DTx também inibiu completamente a proliferação de células T CD4<sup>+</sup> e de produção de IFN-γ *in vitro* em resposta ao estímulo com eritrócitos infectados (Figura 13F).



Figura 13 - Os efeitos da depleção de células CD11c<sup>+</sup> na infecção aguda pelo Pc.

(A-F) Camundongos B6.CD11c-DTR foram tratados com DTx para depletar as células CD11c<sup>+</sup>, ou com PBS como controle. Os camundongos foram infectados i.p. com 1 x 10<sup>6</sup> *Pc* 24 h após o tratamento. (A) Gráficos representativos obtidos por citometria de fluxo confirmam a eficiência da depleção induzida pelo DTx nas células CD11c<sup>+</sup>. Os dados mostram as porcentagens de células CD11c<sup>+</sup> na população de esplenócitos. (B) As curvas de parasitemia são mostradas (médias ± desvio-padrão). (C) As curvas de sobrevivência são mostradas. (D) Variações no peso corporal em relação ao dia 0 p.i. são mostradas (médias ± desvio-padrão). (E) Os dados mostram os números de células T (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>) por baço nos dias 0 e 4 p.i. (médias ± desvio-padrão). (F) Os dados mostram as porcentagens de proliferação de células T CD4<sup>+</sup> (CFSE<sup>lo</sup>), e as concentrações de IFN- $\gamma$  nos sobrenadantes de culturas de esplenócitos estimuladas por 72 h com eritrócitos infectados (médias ± desvio-padrão). Em B-D, as diferenças significativas (p<0,05) entre os grupos indicados são designadas por \*. Em E e F, as diferenças significativas

(p<0,05) entre todos os grupos são designadas por \*. Em A-F, um experimento representativo de três (n = 5) é mostrado.

## 4.2.2 DCs esplênicas são capazes de fagocitar eritrócitos infectados em camundongos recém-infectados pelo Pc

Para verificar se as DCs esplênicas são capazes de fagocitar eritrócitos infectados em camundongos recém-infectados, as interações entre células CD11c<sup>+</sup> e eritrócitos infectados pelo mCherry-Pc foram estudadas na região da polpa vermelha (RP) subcapsular de camundongos B6.CD11c-YFP através da utilização da técnica de CIVM (90). Os camundongos foram infectados i.v. com eritrócitos infectados por formas maduras do parasita, as quais apresentam modificações na membrana que facilitam o reconhecimento destes parasitas por DCs (125). Em camundongos não infectados, as células CD11c<sup>+</sup> apresentaram-se sésseis, com extensão ativa de protrusões e dendritos (Vídeo 1). Aos quinze minutos p.i., os eritrócitos infectados pelo mCherry-Pc encontraram-se presentes na região subcapsular do baço (Figura 14A, Vídeo 2). Animações em 3D de CIVM mostraram restos de eritrócitos infectados pelo mCherry-Pc dentro de células CD11c<sup>+</sup> (definidos por co-localizações em amarelo entre os sinais de mCherry e YFP, visualizados em 3D; Figura 14B, Vídeo 3). Neste período, 13% das células CD11c<sup>+</sup> continham fragmentos de mCherry-Pc em seu interior (Figura 14C). Também foi possível observar vários eritrócitos infectados pelo mCherry-Pc retidos por células CD11c<sup>+</sup>, porém sem sinais visíveis de internalização (Figura 14B, Vídeo 4). Desta forma, uma proporção substancial de DCs da região subcapsular do baço foram capazes de reter e/ou internalizar eritrócitos infectados momentos após a infecção pelo Pc. Estas células não se apresentaram ativadas, como indicado pelo pequeno volume celular médio (Figura 14D) e pela baixa expressão de CD80 e CD86 (Figuras 15A e 15B); tais parâmetros, assim como a esfericidade celular média (Figura 14D), se mostraram semelhantes aos observados em DCs de camundongos não infectados (dados não mostrados).

A atividade fagocítica das DCs esplênicas de camundongos recém-infectados foi também analisada *ex vivo* por citometria de fluxo ou imunofluorescência. Aproximadamente 2% das células CD11c<sup>+</sup> esplênicas internalizaram eritrócitos infectados pelo CTV-*Pc* (4 x 10<sup>4</sup> células CTV<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> por baço), como mostrado por citometria de fluxo (Figuras 14E e 14F). Resultados comparáveis foram obtidos com
eritrócitos infectados pelo GFP-*Pc* (Tabela 1). A atividade fagocítica não estava restrita a apenas um subtipo de DC, uma vez que células CD11c<sup>+</sup> co-expressando CD11b, CD8 ou B220 apresentaram-se CTV<sup>+</sup> (Figura 16A). Considerando-se o número de células por baço, as células CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> foram responsáveis pela maior parte do controle do parasita imputado às células CD11c<sup>+</sup> em camundongos recém-infectados (Figura 16B). A análise por imunofluorescência mostrou aproximadamente 5% de co-localização entre *pixels* CD11c<sup>+</sup> e GFP<sup>+</sup> nos baços de camundongos recém-infectados (Figuras 14G e 14H). A maior parte dos eritrócitos infectados pelo GFP-*Pc* foi encontrada dentro da polpa vermelha (RP) e da zona marginal (MZ) do baço (Figura 14I).

**Figura 14** – Fagocitose *in vivo* e *ex vivo* de eritrócitos infectados, por DCs subcapsulares da RP rapidamente após a infecção pelo *Pc*.



(A-D) Os camundongos B6.CD11c-YFP foram infectados i.v. com 1 x 10<sup>8</sup> eritrócitos infectados pelo mCherry-*Pc*. Os baços foram analisados por CIVM 15 min depois. (A) Fotos em série tiradas após 15 min p.i. (0 min) mostram a região subcapsular da RP. As fotos em destaque acima mostram a amplificação de uma região com algumas células co-expressando o YFP

(verde) e o mCherry (vermelho). Nas imagens à direita, uma região mostrando o contato entre células CD11c⁺ e eritrócitos infectados por mCherry-*Pc* é amplificada. (B) Animações em 3D de CIVM mostra células CD11c<sup>+</sup> contendo restos de eritrócitos infectados pelo mCherry-*Pc* (pontos amarelos de co-localização entre o mCherry e o YFP, em 3D). (C) Porcentagens de células CD11c<sup>+</sup> mCherry<sup>+</sup> na população de células CD11c<sup>+</sup> são mostradas (médias ± desviopadrão). (D) O volume e esfericidade média das células CD11c $^{\star}$  são mostradas. As linhas horizontais representam os valores médios. (E-I) Camundongos B6 foram infectados i.v. com 1 x 10<sup>8</sup> eritrócitos infectados com fases maduras dos parasitas CTV-*Pc* (citometria de fluxo) ou GFP-Pc (imunofluorescência). Os bacos dos camundongos foram analisados após 15 min. (E) Gráficos representativos obtidos por citometria de fluxo mostram a marcação com CTV em células CD11c<sup>+</sup> de camundongos B6 não infectados (-) e camundongos B6 recentemente infectados (15 min p.i.). As células CD11c<sup>+</sup> foram analisadas na população CD3<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> DX5<sup>-</sup> Ter119, excluindo células T, células B, células NK e eritrócitos. Os dados mostram as porcentagens de células CD11c<sup>+</sup> CTV<sup>+</sup> na população de células CD11c<sup>+</sup>. (F) Os números de células CD11c<sup>+</sup> totais e células CD11c<sup>+</sup> CTV<sup>+</sup> por baço foram calculados dos dados obtidos em E (médias ± desvio-padrão). (G) Uma imunofluorescência representativa (com aumento de 10x) mostra o baço de um camundongo B6 infectado. A marcação de macrófagos metalofílicos MOMA-1<sup>+</sup> e de células B CD19<sup>+</sup> determina as regiões da RP/MZ e a polpa branca (WP). A imagem abaixo, em destaque, detalha uma célula CD11c<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> na região da RP. (H) Porcentagens de co-localização entre pixels CD11c e GFP nas imagens de imunofluorescência são mnostradas (médias ± desvio-padrão). (I) Porcentagens de distribuição de *pixels* GFP nas regiões da RP/MZ e da WP dos baços são mostradas (médias ± desvio-padrão). Em A, B e G, as barras de escala correspondem à 50 µm. Em C e D, os dados foram calculados utilizando o software Imaris. Em H e I, os dados foram calculados utilizando o software FIJI. Em I, as diferenças significativas (p<0,05) entre os grupos indicados são designados por \*. Em A-D, um experimento representativo de quatro (n = 2) é mostrado. Em E-I, um experimento representativo de três (n = 4) é mostrado.

Figura 15 – Expressão de marcadores de ativação em DCs esplênicas durante a infecção aguda pelo *Pc*.



Camundongos B6 foram infectados i.p. com 1 x 10<sup>6</sup> *Pc*. Os baços foram analisados nos dias 0, 5 ou 8 p.i.. (A) Histogramas representativos obtidos por citometria de fluxo mostram a expressão de MHC de classe II (I-A<sup>b</sup>), CD80 e CD86 em células CD11c<sup>+</sup>. Os respectivos controles de *fluorescence minus one* (FMO) para cada marcador são representados pelos

histogramas preenchidos. (B) Os valores de intensidade de mediana de fluorescência (MFI) foram calculados a partir dos dados obtidos em A (médias  $\pm$  desvio-padrão). (C) Histogramas representativos obtidos por citometria de fluxo mostram a expressão de CD36 (esquerda) e FcγRI (direita) em células CD11c<sup>+</sup> nos dias 0 ou 5 p.i.. Os controles FMO correspondentes para cada marcador são representados por histogramas preenchidos. (D) Os valores de intensidade de mediana de fluorescência (MFI) foram calculados a partir dos dados obtidos em C (médias  $\pm$  desvio-padrão). Em B e D, as diferenças significativas foram analisadas entre os diferentes dias p.i., para cada marcador de ativação; \* indica p<0,05. Em A-D, os dados mostram um experimento representativo de três (n = 5).

**Figura 16** – Fagocitose de eritrócitos infectados, por diferentes subtipos de DCs durante a infecção aguda pelo *Pc*.



Os baços foram analisados 15 min após a injeção i.v. com 1 x  $10^8$  eritrócitos infectados com formas maduras do CTV-*Pc* (histogramas com linhas negras) ou com PBS (histogramas preenchidos), em camundongos B6 com 0, 5 ou 8 dias p.i. com 1 x  $10^6$  *Pc*. (A) Histogramas representativos obtidos por citometria de fluxo mostram a marcação de CTV nos subtipos de DCs esplênicas (CD11b<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup>). (B) Números de células CD11c<sup>+</sup> totais ou CD11c<sup>+</sup> CTV<sup>+</sup> foram calculados a partir dos dados obtidos em A. Em B, as diferenças significativas foram analisadas entre os subtipos de DCs nos diferentes dias p.i.; \* indica p<0,05. Em A-B, os dados mostram um experimento representativo de três (n = 5).

#### 4.2.3 DCs esplênicas interagem com células T CD4<sup>+</sup> em zonas ricas em células T CD4<sup>+</sup> e também na polpa vermelha durante os primeiros dias após a infecção pelo Pc

O próximo objetivo foi avaliar a dinâmica das DCs esplênicas durante os primeiros dias após a infecção pelo *Pc*. Às 12 h p.i., as células CD11c<sup>+</sup> da região subcapsular do baço apresentaram maior velocidade celular média e maior distribuição (Figura 17A). O movimento aumentado das células CD11c<sup>+</sup> correlacionou com uma maior migração destas células em direção à zonas ricas em células T CD4<sup>+</sup>. Isto foi evidenciado por imunofluorescências mostrando, às 2 h e às 24 h p.i., a presença de

áreas de co-localização entre os sinais de CD11c e de CD4 em amarelo (Figura 17B), e pela maior porcentagem de co-localização entre *pixels* CD11c<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> (Figura 17C). Nós também transferimos adotivamente células T CD4<sup>+</sup> CFP<sup>+</sup> para camundongos B6.CD11c-YFP para avaliar a interação entre as DCs da região subcapsular do baço com as células T CD4<sup>+</sup> durante o início da infecção pelo *Pc* através de CIVM. Em camundongos não infectados, a maior parte das células CD4<sup>+</sup> CFP<sup>+</sup> fez contatos apenas transientes com as células CD11c<sup>+</sup> na região subcapsular (Vídeo 5, Figura 17D); as células CD4<sup>+</sup> CFP<sup>+</sup> se movimentaram de maneira ativa dentro do baço (Figura 17E). Após 24 h p.i., as células CD4<sup>+</sup> CFP<sup>+</sup> mantiveram contatos mais estáveis com as células CD11c<sup>+</sup> da região subcapsular (Vídeo 6, Figura 17D), como indicado pela diminuição na velocidade média das células CD4<sup>+</sup> CFP<sup>+</sup>, assim como um aumento no coeficiente de parada destas células (Figura 17E).

**Figura 17** – Análise das interações entre DCs esplênicas e células T CD4<sup>+</sup> após a infecção pelo *Pc*.



(A) Camundongos B6.CD11c-YFP foram infectados i.p. com 1 x  $10^6$  eritrócitos infectados pelo mCherry-*Pc*. Os baços foram analisados por CIVM após 2 e 12 h e em controles não

infectados. A velocidade média das células CD11c<sup>+</sup> e o deslocamento médio são mostrados. (B-C) Camundongos B6 foram infectados i.p. com 1 x 10<sup>6</sup> eritrócitos infectados pelo mCherry-Pc. Os baços foram analisados 2 ou 24 h p.i., e em controles não infectados. (B) Imagens de imunofluorescências representativas (com aumento de 10 x) mostram as células CD11c<sup>+</sup> e células CD4<sup>+</sup> em lâminas marcadas com DAPI. As barras de escala correspondem a 50 µm. (C) Porcentagens de co-localização entre pixels CD11c e CD4 nas imagens de imunofluorescência são mostradas (médias ± desvio-padrão). (D-E) Camundongos B6.CD11c-YFP foram transferidos adotivamente com 5 x  $10^6$  células T CD4<sup>+</sup> CFP<sup>+</sup> e infectados i.p. com 1 x  $10^6$ eritrócitos infectados pelo mCherry-Pc. Os bacos foram analisados por CIVM após 24 h, e em controles não infectados. (D) Fotos representativas mostram a região da RP subcapsular com os trajetos percorridos pelas células CD4<sup>+</sup> CFP<sup>+</sup>. (E) Valores de velocidade média e coeficiente de parada de células CD4<sup>+</sup> CFP<sup>+</sup> são mostrados. Em B e D, as barras de escala correspondem a 100 µm. Em A e E, os dados foram calculados utilizando o *software* Imaris. Em C, os dados foram calculados utilizando o software FIJI. Em A, C e E, as diferenças significativas (p<0,05) entre os grupos indicados são designadas por \*. Em A, D e E, um experimento representativo de três (n = 2) é mostrado. Em B e C, um experimento representativo de três (n = 4) é mostrado.

### 4.2.4 DCs esplênicas em camundongos durante a pré-crise apresentam capacidade fagocítica intensa

Para investigar se as DCs esplênicas têm um papel direto na eliminação da parasitemia durante a pré-crise, as interações entre as DCs esplênicas e os eritrócitos infectados após 5 dias p.i. foram analisadas in vivo e ex vivo. Essa hipótese foi sugerida pelos nossos resultados anteriores, mostrando um controle ineficiente da parasitemia em camundongos B6.CD11c-DTR tratados com DTx nos dias 4 e 5 p.i. (Figura 13B), quando as células T e B proliferam mas ainda não produzem quantidades substanciais de IFN-γ ou anticorpos ex vivo (102,141). Além disso, no dia 5 p.i., as DCs esplênicas apresentaram uma expressão aumentada do receptor fagocítico FcyRI (Figuras 15C e 15D). De modo interessante, foi possível visualizar um grande número de eritrócitos infectados pelo mCherry-Pc dentro da região subcapsular do baço, e as células CD11c<sup>+</sup> apresentaram-se mais móveis em comparação com o observado em camundongos não infectados, e mostrando uma intensa capacidade fagocítica (Figura 18A, Vídeo 7). A presença de uma intensa vacuolização nestas DCs foi também observada claramente. Foi possível também observar algumas células CD11c<sup>+</sup> (contendo restos de eritrócitos infectados de internalizações prévias) em pleno processo de fagocitose de eritrócitos infectados pelo mCherry-Pc (Figura 18A, Vídeo 8). Animações em 3D confirmaram a internalização dos parasitas mCherry por células CD11c<sup>+</sup> (Figura 18B, Vídeo 9). Este fenômeno foi observado em 49% das células CD11c<sup>+</sup> (Figura 18C). Após 5 dias p.i., as células CD11c<sup>+</sup> apresentaram-se ativadas, com maior volume celular médio, menor esfericidade média, e maior expressão de MHC de classe II, CD80 e CD86

em comparação com as DCs observadas em camundongos recém-infectados (Figuras 18D, 15A, 15B e Tabela 1).

A análise por citometria de fluxo confirmou que as DCs esplênicas foram capazes de fagocitar eritrócitos infectados durante a pré-crise. Quando eritrócitos infectados pelo CTV-Pc foram injetados i.v. em camundongos com 5 dias p.i., aproximadamente 4% das DCs esplênicas apresentaram-se CTV<sup>+</sup> (1,4 x 10<sup>5</sup> células CD11c<sup>+</sup> CTV<sup>+</sup> por baço) (Figuras 18E e 18F). A atividade fagocítica não estava restrita a um subtipo de DC em particular, uma vez que uma proporção de todos os subtipos estudados internalizaram eritrócitos infectados durante a pré-crise (Figura 16A). Entretanto, os números por baço de células CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CTV<sup>+</sup> e de células CD11c<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CTV<sup>+</sup> eram significativamente maiores em comparação com os números observados para os outros subtipos (Figura 16B). Além disso, quase 10% das células CD11c<sup>+</sup> de camundongos com 5 dias p.i. pelo GFP-Pc eram GFP+ (3,9 x 10<sup>5</sup> células CD11c<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> por baço; Figuras 18G e 18H). A análise por imunofluorescência corroborou o papel importante das DCs esplênicas da fagocitose de eritrócitos infectados observada na pré-crise. A co-localização entre pixels CD11c<sup>+</sup> e GFP<sup>+</sup> foi de 41% nos baços de camundongos com 5 dias p.i. (Figuras 18I e 18J). Comparativamente, foi possível observar um aumento substancial na ativação e na capacidade fagocítica in vivo e ex vivo nas DCs esplênicas durante a pré-crise (Tabela 1). Além disso, uma frequência significativamente elevada de fagocitose de eritrócitos infectados pôde ser detectada pela utilização da CIVM em comparação com a citometria de fluxo.



**Figura 18** – Análise da fagocitose de eritrócitos infectados *in vivo* e *ex vivo* por DCs subcapsulares da RP durante a pré-crise.

(A-D) Camundongos B6.CD11c-YFP foram infectados i.p. com 1 x  $10^6$  eritrócitos infectados pelo mCherry-*Pc*. Os baços foram analisados por CIVM com 5 dias p.i., em um período do dia onde os estágios maduros do parasita são predominantes. (A) Fotos em série mostram a região da RP subcapsular e, nas imagens à direita, uma célula CD11c<sup>+</sup> (verde) em processo ativo de fagocitose de um eritrócito infectado pelo mCherry-*Pc* (vermelho) em detalhe. (B) Animações em 3D de CIVM mostra a presença de restos de eritrócitos infectados pelo mCherry-*Pc* (pontos amarelos de co-localização entre mCherry e YFP em 3D) dentro de células CD11c<sup>+</sup>. (C) Porcentagens de células CD11c<sup>+</sup> mCherry<sup>+</sup> na população de células CD11c<sup>+</sup> são mostradas (médias ± desvio-padrão). (D) Os valores médios de volume e esfericidade média das células CD11c<sup>+</sup> são mostrados. As linhas horizontais representam as médias. (E-F) Camundongos B6 foram infectados i.p. com 1 x 10<sup>6</sup> eritrócitos infectados pelo *Pc*. Após 5 dias p.i., metade dos camundongos B6 foram re-infectados i.v. com 1 x 10<sup>8</sup> eritrócitos infectados com formas maduras de CTV-*Pc*. Os baços foram analisados por citometria de fluxo após 15

min. (E) Gráficos representatios mostram a marcação com CTV em células CD11c<sup>+</sup> de camundongos infectados com Pc que foram re-infectados [Pc (5d) + CTV-Pc] ou não [Pc (5d)] com eritrócitos infectados com o CTV-Pc. As células CD11c<sup>+</sup> foram analisadas na população CD3 CD19 DX5 Ter119. Os dados mostram as porcentagens de células CD11c<sup>+</sup> CTV<sup>+</sup> na população de células CD11c<sup>+</sup>. (F) Números de células CD11c<sup>+</sup> totais e células CD11c<sup>+</sup> CTV<sup>+</sup> por baço foram calculados a partir dos dados obtidos em E (médias ± desvio-padrão). (G-J) Camundongos B6 foram infectados i.p. com 1 x 10<sup>6</sup> eritrócitos infectados com Pc ou GFP-Pc. Os baços foram analisados após 5 dias, em um período do dia onde formas maduras do parasita eram predominantes. (G) Gráficos representativos obtidos por citometria de fluxo mostram a marcação com GFP em células CD11c<sup>+</sup> de camundongos que foram infectados com o Pc [Pc (5d)] ou com o GFP-Pc [GFP-Pc (5d)]. As células CD11c<sup>+</sup> foram analisadas na população CD3 CD19 DX5 Ter119. Os dados mostram as porcentagens de células CD11c<sup>+</sup> GFP⁺ na população de células CD11c⁺. (H) Números de células CD11c⁺ totais e células CD11c⁺ GFP<sup>+</sup> por baço foram calculados a partir dos dados obtidos em G (médias ± desvio-padrão). (I) Uma imagem representativa de imunofluorescência (com aumento de 10x) representa os baços de camundongos infectados. A imagem em destaque abaixo detalha uma célula CD11c<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup>. (J) Porcentagens de co-localização de pixels CD11c e GFP nas imagens de imunofluorescências são mostradas (médias ± desvio-padrão). Em A e I, as barras de escala correspondem a 50 µm. Em B, as barras de escala correspondem a 30 µm. Em C e D, os dados foram obtidos utilizando o software Imaris. Em J, os dados foram obtidos utilizando o software FIJI. Em A-D, um experimento representativo de cinco (n = 2) é mostrado. Em E-J, um experimento representativo de três (n = 4) é mostrado.

#### 4.2.5 A fagocitose do Pc pelas DCs esplênicas não é observada durante a crise

Durante a fase de crise da infecção aguda pelo Pc, modificações profundas na estrutura do baço são observadas, as quais resultam no fechamento da RP (142). Considerando este aspecto, nós estendemos nosso estudo para esta fase da infecção aguda. A análise por CIVM mostrou apenas alguns eritrócitos infectados pelo mCherry-Pc sendo retidos por células CD11c<sup>+</sup> da região subcapsular em camundongos com 8 dias p.i. (Figuras 19A e 19B, Vídeo 10), e eventos de colocalização entre os sinais mCherry e YFP mostraram-se raros (Figura 19C). Neste ponto da infecção, os volumes médios das células CD11c<sup>+</sup> mostraram-se menores em comparação aos volumes observados na pré-crise (Figura 19D, Tabela 1). A esfericidade média mostrou-se semelhante em camundongos com 5 e 8 dias p.i., em comparação com camundongos não-infectados (Figura 19D, Tabela 1). A análise por citometria de fluxo também mostrou uma baixa capacidade fagocítica pelas DCs esplênicas, tanto quando os camundongos eram re-infectados i.v. com eritrócitos infectados pelo CTV-Pc, assim como quando os camundongos eram infectados i.p. com o GFP-Pc (Figuras 19E, 19F, 19G e 19H). Estes dados indicam que as DCs esplênicas podem estar principalmente envolvidas na apresentação de antígenos em detrimento da atividade fagocítica durante a crise, uma vez que as células CD11c<sup>+</sup> expressaram altos níveis de MHC de classe II e CD80 no dia 8 p.i. (Figuras

15A e 15B).

**Figura 19** – Análise da fagocitose de eritrócitos infectados *in vivo* e *ex vivo* por DCs esplênicas durante a crise.



(A-D) Camundongos B6.CD11c-YFP foram infectados i.p. com 1 x 10<sup>6</sup> eritrócitos infectados pelo mCherry-Pc. Os baços foram analisados por CIVM com 8 dias p.i., em um período do dia onde formas maduras do parasita eram predominantes. (A) Uma foto representativa mostra a região da RP subcapsular. (B) Animações 3D de CIVM mostram a presença de pouços eritrócitos infectados pelo mCherry-Pc (vermelho) ligados à células CD11c<sup>+</sup> (verde). (C) Porcentagens de células CD11c<sup>+</sup> mCherry<sup>+</sup> na população de células CD11c<sup>+</sup> sao mostradas (médias ± desvio-padrão). (D) Os valores para volume e esfericidade das células CD11c<sup>+</sup> são mostrados. As linhas horizontais representam as médias. (E-F) Camundongos B6 foram infectados i.p. com 1 x 10<sup>6</sup> Pc. Aos 8 dias p.i., metade dos camundongos B6 foram reinfectados i.v. com 1 x 10<sup>8</sup> eritrócitos com formas maduras do CTV-Pc. Os baços foram analisados por citometria de fluxo após 15 min. (E) Gráficos representativos obtidos por citometria de fluxo mostram a marcação com CTV em células CD11c<sup>+</sup> de camundongos infectados pelo Pc que foram re-infectados [Pc (8d) + CTV-Pc] ou não [Pc (8d)] com eritrócitos infectados pelo CTV-Pc. As células CD11c<sup>+</sup> foram analisadas na população CD3<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> DX5<sup>-</sup> Ter119. Os dados mostram as porcentagens de células CD11c<sup>+</sup> CTV<sup>+</sup> na população CD11c<sup>+</sup>. (F) Os números de células CD11c<sup>+</sup> totais e células CD11c<sup>+</sup> CTV<sup>+</sup> por baço foram calculados a partir dos dados obtidos em E (médias ± desvio-padrão). (G-H) Camundongos B6 foram infectados i.p. com 1 x 10<sup>6</sup> eritrócitos infectados pelo *Pc* ou pelo GFP-*Pc*. Os baços foram analisados aos 8 dias p.i., em um período do dia onde formas maduras do parasita eram predominantes. (G) Gráficos representativos obtidos por citometria de fluxo mostram a marcação de GFP em células CD11c<sup>+</sup> de camundongos que foram infectados pelo Pc [Pc (8d)] ou pelo GFP-Pc [GFP- *Pc* (8d)]. As células CD11c<sup>+</sup> foram analisadas na população CD3<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> DX5<sup>-</sup> Ter119<sup>-</sup>. Os dados mostram as porcentagens de células CD11c<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> na população CD11c<sup>+</sup>. (H) Números de células CD11c<sup>+</sup> totais e células CD11c<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> por baço foram calculados a partir dos dados obtidos em G (médias ± desvio-padrão). Em A e B, as barras de escala correspondem a 50 µm e 30 µm, respectivamente. Em C e D, os dados foram obtidos utilizando o *software* Imaris. Em A-D, um experimento representativo de três (n = 2) é mostrado. Em E-H, um experimento representativo de três (n = 5) é mostrado.

**Tabela 1** – Análise comparativa das técnicas *in vivo* e *ex vivo* no estudo das DCs esplênicas durante a infecção aguda pelo *Pc*.

PARAMETERS	TECHNIQUE	15 min p.i.	5 days p.i.	8 days p.i.
CD11c <sup>+</sup> cell volume ( $\mu$ m <sup>3</sup> ) (X 10 <sup>4</sup> )	CIVM	0.2±0.2	1.4±1.2*#	0.5±0.6
CD11c <sup>+</sup> cell sphericity (a.u.)	CIVM	0.7±0.1	0.6±0.1*	0.6±0.1*
mCherry <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> cells (%)	CIVM	12.6±2.6	48.8±8.9*#	1.7±1.5*
$CTV^{+}CD11c^{+}$ cells (%)	Flow cytometry	1.8±0.6	4.1±1.4*#	0.1±0.0
$\text{GFP}^{+}\text{CD11c}^{+}\text{ cells (\%)}$	Flow cytometry	2.1±0.5	10.1±3.2*#	0.9±0.3
CD11c-GFP pixel colocalization (%)	Immunofluorescence	5.3±1.9	41.3±16.3*	

Os dados comparam os vários parâmetros em camundongos recém-infectados, em camundongos com 5 dias p.i. (pré-crise) e em camundongos com 8 dias p.i. (crise). Para as análises in vivo, dois experimentos principais foram realizados: camundongos B6.CD11c-YFP foram infectados i.v. com 1 x 10<sup>8</sup> eritrócitos com formas maduras do mCherry-Pc, e os baços foram avaliados 15 min depois; ou os camundongos foram infectados i.p. com 1 x 10<sup>6</sup> mCherry-Pc, e os baços foram analisados aos 5 ou 8 dias p.i., em um período do dia onde formas maduras do parasita eram predominantes. Para as análises ex vivo, dois experimentos principais foram realizados: camundongos B6 foram infectados com 1 x 10<sup>8</sup> eritrócitos infectados com formas maduras do CTV-Pc (citometria de fluxo) ou GFP-Pc (citometria de fluxo e imunofluorescência), e os baços foram analisados após 15 minutos; ou os camundongos foram infectados i.p. com 1 x 10<sup>6</sup> eritrócitos infectados com GFP-Pc (citometria de fluxo e imunofluorescência), e os bacos foram analisados com 5 ou 8 dias p.i., em um período do dia onde formas maduras do parasita eram predominantes. Os dados foram compilados das Figuras 14, 18 e 19. Diferenças significativas (p<0,05) entre os grupos de camundongos recém-infectados e camundongos com 5 ou 8 dias p.i. são indicadas por \*. Diferenças significativas (p<0,05) entre os grupos com 5 dias p.i. e com 8 dias p.i. são indicadas por #. Os dados mostram um experimento representativo de quatro (n = 4-6).

4.3 ARTIGO 3 – Macrófagos da polpa vermelha são importantes para a geração de células T foliculares e para induzir respostas de células B Tdependentes durante a malária experimental

# 4.3.1 Células F4/80<sup>high</sup> do baço de camundongos infectados são capazes de fagocitar parasitas, expressam marcadores de ativação e co-estimulação e aumentam a expressão de ICOSL

Em primeiro lugar, nós avaliamos se diferentes macrófagos esplênicos são capazes de fagocitar eritrócitos infectados durante a fase aguda da infecção pelo Pc. Durante a fase aguda da infecção, macrófagos F4/80<sup>high</sup> da polpa vermelha (RP) mantiveramse com o mesmo tamanho populacional (Figura 20A), assim como macrófagos MARCO<sup>+</sup> da zona marginal (MZ) e macrófagos MOMA-1<sup>+</sup> metalofílicos da MZ (Figura 20A), indicando que estas três populações são residentes e não incluem células derivadas de precursores que poderiam aparecer durante a infecção, de uma maneira oposta ao observado para células F4/80<sup>low</sup> (Figura 21). Através da transferência adotiva de macrófagos F4/80<sup>high</sup> de camundongos GFP para camundongos B6, foi possível observar a fagocitose imediatamente após a infecção com o mCherry-Pc por CIVM (Figura 20B, Vídeo 11). Análises por citometria de fluxo da fagocitose de CTV-Pc, por sua vez, mostraram um aumento nas porcentagens de macrófagos CTV<sup>+</sup> quando inoculados nos dias 0, 5 (pré-crise; 143) e 8 p.i. (crise, quando a RP se fecha e os parasitas não são capazes de alcançar esta região de forma eficiente; 142) (Figura 20C). As análises ex vivo também mostraram que uma porcentagem de macrófagos da MZ pode fagocitar o Pc nos dias 0 e 5 p.i., porém com menores valores de células CTV<sup>+</sup> em comparação com os dos macrófagos da RP (Figura 20C). Análises de imunofluorescência também foram utilizadas como uma ferramenta para se avaliar a fagocitose de eritrócitos infectados pelo Pc por estes macrófagos. No baço de camundongos recém-infectados pelo GFP-Pc, foi possível observar uma co-localização parcial entre *pixels* F4/80<sup>+</sup> e GFP<sup>+</sup>, e, de forma semelhante, entre *pixels* MARCO<sup>+</sup> e GFP<sup>+</sup>, e MOMA-1<sup>+</sup> e GFP<sup>+</sup> (Figura 20D). Os resultados indicaram, desta forma, que todos os três tipos de macrófagos esplênicos estudados pareceram ser capazes, durante a infecção aguda pelo Pc, de fagocitar eritrócitos infectados.

A seguir, nós avaliamos a expressão de marcadores de ativação e co-estimulação por macrófagos da RP durante a infecção pelo *Pc*. Estes macrófagos apresentaram

expressão de MHC de classe II, CD80 e CD86 (Figura 20E), embora em menor nível do que o observado para células dendríticas (DCs – Figura 22). De modo interessante, as expressões de todos estes marcadores encontraram-se diminuídas no dia 5 após a infecção (Figura 20E). De maneira oposta, macrófagos da RP não expressam ICOSL constitutivamente; no dia 5 após a infecção há um aumento na expressão desta molécula co-estimulatória (Figura 20E), o qual pode estar envolvido com a interação com ICOS e a posterior geração de respostas de células B T-dependentes (144).

**Figura 20** – Análise das populações de macrófagos esplênicos durante a infecção aguda pelo *Pc*.



(A) Camundongos B6 foram infectados i.p. com  $1 \times 10^6 Pc$ , e nos dias 0, 5 e 8 p.i., os números totais de macrófagos esplênicos F4/80<sup>high</sup>, MARCO<sup>+</sup> e MOMA-1<sup>+</sup> foram quantificados através de citometria de fluxo (médias ± desvio-padrão). (B) Camundongos B6 foram transferidos adotivamente com  $5 \times 10^5$  macrófagos F4/80<sup>+</sup>, e infectados i.p. com mCherry-*Pc* 24 h depois. Os baços foram analisados por CIVM após 2 h (esquerda) e 2,5 h (direita). (C) Camundongos B6 – com 0, 5 ou 8 dias p.i. com  $1 \times 10^6 Pc$ , foram infectados i.v. com  $1 \times 10^8$  eritrócitos infectados com formas maduras do CTV-*Pc*, e os baços foram analisados 15 min depois. Os dados mostram a porcentagem de macrófagos CTV<sup>+</sup>, sendo que na esquerda são mostrados gráficos representativos obtidos por citometria de fluxo pelos diferentes tipos de macrófagos esplênicos, e na direita são representadas as porcentagens de células CTV<sup>+</sup> para cada tipo de

macrófago (médias  $\pm$  desvio-padrão). (D) Camundongos B6 foram infectados i.v. com 1 x 10<sup>8</sup> GFP-*Pc*, e os baços foram analisados por imunofluorescência após 15 min. As imagens mostram as interações entre macrófagos esplênicos e o GFP-*Pc*. (E) Os valores de intensidade de mediana de fluorescência (MFI) para os marcadores MHC de classe II (I-A<sup>b</sup>), CD80, CD86, ou ICOSL foram analisados para as células F4/80<sup>high</sup> nos dias 0 e 5 p.i. com o *Pc* (médias  $\pm$  desvio-padrão). Diferenças significativas (p<0,05) entre os grupos de camundongos recém-infectados e camundongos com 5 ou 8 dias p.i. são indicadas por \*. Os dados mostram um experimento representativo de três (n = 5).

**Figura 21** – Números totais de DCs e células F4/80<sup>low</sup> esplênicas durante a infecção aguda pelo *Pc*.



Camundongos B6 foram infectados i.p. com 1 x  $10^6 Pc$ , e nos dias 0, 5 e 8 p.i., os números totais de DCs (CD11c<sup>+</sup>I-A<sup>b+</sup>) e células F4/80<sup>low</sup> foram quantificados através de citometria de fluxo (médias ± desvio-padrão). Os dados mostram um experimento representativo de três (n=5).

**Figura 22** - Expressão de marcadores de ativação e co-estimulação em DCs e células F4/80<sup>low</sup> esplênicas durante a infecção aguda pelo *Pc*.



Camundongos B6 foram infectados i.p. com 1 x 10<sup>6</sup> *Pc*, e os valores de intensidade de mediana de fluorescência (MFI) para os marcadores MHC de classe II (I-A<sup>b</sup>), CD80, CD86 e ICOSL foram

analisados para as DCs (acima, CD11c<sup>+</sup> I-A<sup>b+</sup>) e para as células F4/80<sup>low</sup> (abaixo) nos dias 0 e 5 p.i. (médias ± desvio-padrão). Diferenças significativas (p<0,05) entre os grupos de camundongos recém-infectados e camundongos com 5 dias p.i. são indicadas por \*. Os dados mostram um experimento representativo de três (n=5).

#### 4.3.2 Efeitos do tratamento in vivo com diferentes doses de lipossomos de clodronato durante a infecção pelo Pc

O próximo objetivo foi avaliar a importância relativa de macrófagos durante a infecção aguda pelo *Pc*. Para isto, nós utilizamos uma estratégia de depleção com lipossomos de clodronato, onde a injeção i.v. de 1 mg destas moléculas induziu a depleção de macrófagos da RP e da MZ, enquanto a injeção de 157  $\mu$ g induziu exclusivamente a depleção de macrófagos da MZ (Figura 23). Nesses experimentos, os camundongos foram infectados 8 dias após a injeção de lipossomas de clodronato para assegurar a repopulação das DCs. A injeção de 157  $\mu$ g de lipossomos de clodronato não induziu nenhum efeito na parasitemia (Figura 24A) ou na sobrevivência (Figura 24B) durante a infecção aguda pelo *Pc*. Quando 1 mg de lipossomos foram injetados, no entanto, os camundongos apresentaram um aumento na parasitemia (Figura 24A) e uma diminuição na sobrevivência após a infecção pelo *Pc* (Figura 24B). Estes resultados indicam que os macrófagos são, ao menos parcialmente, importantes no controle da parasitemia e na manutenção da sobrevivência após a infecção pelo *Pc*, o que não é observado para os macrófagos da MZ.

**Figura 23** - Análise de depleção dos macrófagos esplênicos pela utilização de lipossomos de clodronato.



Para eliminar diferencialmente macrófagos da RP e da MZ, camundongos B6 foram injetados i.v. com 1 mg ou com 157  $\mu$ g de lipossomos contendo clodronato. A dose de 1 mg eliminou completamente tanto macrófagos F4/80<sup>high</sup> da RP, quanto macrófagos MARCO<sup>+</sup> e MOMA-1<sup>+</sup> da MZ. Enquanto isso, a dose de 157  $\mu$ g foi suficiente apenas para a depleção de macrófagos da MZ. Os dados mostram um experimento representativo de dois (n=8).





(A) Camundongos B6, previamente tratados com 1 mg ou 157  $\mu$ g de lipossomos de clodronato, foram infectados i.p. com 1 x 10<sup>6</sup> *Pc*, e as parasitemias foram analisadas por esfregaços corados com Giemsa, em comparação com camundongos B6 tratados apenas com PBS (médias ± desvio-padrão). (B) Curvas de sobrevivência referentes aos camundongos tratados e infectados em A. Diferenças significativas (p<0,05) entre os grupos de camundongos tratados com PBS ou com lipossomos de clodronato são indicadas por \*. Os dados mostram um experimento representativo de dois (n = 8).

#### 4.3.3 Macrófagos esplênicos contribuem parcialmente para a ativação precoce de células T CD4<sup>+</sup>

Após determinar os efeitos do tratamento in vivo com diferentes doses de lipossomos de clodronato durante a infecção pelo Pc, nós avaliamos a importância dos macrófagos da RP e da MZ para as respostas imunes observadas durante esta infecção. Aos 5 dias p.i., os números totais de esplenócitos eram menores em camundongos tratados com 1 mg ou 157 µg de lipossomos de clodronato, em comparação com aqueles observados em camundongos tratados com PBS (Figura 25A). Os números de células T CD4<sup>+</sup> no dia 5 p.i. também se mostraram diminuídos nos grupos tratados, embora a diminuição tenha sido mais acentuada nos grupos tratados com 1 mg de clodronato (Figura 25B). Com relação à ativação precoce das células T CD4<sup>+</sup>, não houve diferença na expressão de CD69 por estas células (Figura 25C). Além disso, a resposta proliferativa ao estímulo com eritrócitos infectados pelo Pc in vitro mostrou-se inalterada na ausência de qualquer um dos macrófagos estudados (Figura 25D) – embora a resposta proliferativa espontânea ex vivo estava diminuída nos camundongos tratados com 1 mg de clodronato (Figura 25D). Em concordância com os resultados de proliferação celular, a produção de IFN-γ em resposta a eritrócitos infectados pelo *Pc* mostrou-se inalterada em ambos os grupos tratados (Figura 25E). Ao contrário, a produção espontânea de IFN-y foi parcialmente inibida nos camundongos tratados com 1 mg de clodronato (Figura 25E). Em conjunto, os resultados indicam que os macrófagos esplênicos não são fundamentais para a ativação precoce de células T CD4<sup>+</sup> durante a infecção pelo Pc, embora a ativação espontânea ex vivo destas células parecesse depender parcialmente da presença de macrófagos da RP.



**Figura 25** – Importância dos macrófagos da RP e da MZ para a ativação precoce de células T CD4<sup>+</sup> durante a infecção aguda pelo *Pc*.

(A) Camundongos B6, previamente tratados com 1 mg ou 157 µg de lipossomos de clodronato, foram infectados i.p. com 1 x  $10^6$  *Pc*, e os números de células esplênicas foram observados aos 5 dias p.i. (médias ± desvio-padrão). (B) Os números de células T CD4<sup>+</sup> por baço também foram observados aos 5 dias p.i. (médias ± desvio-padrão). (C) Histogramas representativos da expressão de CD69 por células T CD4<sup>+</sup> (esquerda) e porcentagens de células T CD4<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> (direita) nos camundongos experimentais aos 5 dias p.i. (médias ± desvio-padrão). (D) Acima, histogramas representativos da marcação com CFSE de células T CD4<sup>+</sup> esplênicas dos camundongos experimentais, estimuladas por 72 h com eritrócitos infectados (1 célula T para 3 eritrócitos infectados), determinados por citometria de fluxo. Abaixo, as porcentagens de proliferação de células T CD4<sup>+</sup> (CFSE<sup>low</sup>) dos camundongos experimentais, tanto espontânea quanto após a estimulação por 72 h com eritrócitos infectados (médias ± desvio-padrão). (E) Concentrações de IFN- $\gamma$  nos sobrenadantes de culturas de esplenócitos mostradas em D, quantificadas por ELISA (médias ± desvio-padrão). Diferenças significativas (p<0,05) entre os grupos de camundongos tratados com PBS ou com lipossomos de clodronato são indicadas por \*. Os dados mostram um experimento representativo de dois (n = 8).

#### 4.3.4 Macrófagos da RP são capazes de induzir o fenótipo e função de células Tfh em células T CD4<sup>+</sup>

Nossos resultados anteriores indicaram que os macrófagos são parcialmente importantes para o controle da parasitemia durante a infecção pelo *Pc*. Além disso, a capacidade de ativação espontânea *ex vivo* das células T CD4<sup>+</sup> pareceu ser dependente de macrófagos da RP. De modo interessante, quando nós analisamos o padrão de expressão gênica das células T CD4<sup>+</sup> de camundongos com 5 dias p.i., enquanto marcadores de expressão precoce (dados não mostrados) mantêm-se

expressos, a expressão de marcadores para o fenótipo de Tfhs foi fortemente inibida nos camundongos tratados com 1 mg de lipossomos de clodronato (Figura 26A). Em concordância com estes resultados, a expressão proteica de ICOS por células T CD4<sup>+</sup> durante a pré-crise (5 dias p.i.) foi parcialmente inibida quando os camundongos foram tratados com 1 mg de clodronato (Figura 26B). A expressão de ICOS por células T CD8<sup>+</sup> foi completamente inibida em ambos os grupos tratados no mesmo tempo após a infecção (Figura 26C). De modo importante, a expressão proteica de ICOS por células T CD4<sup>+</sup> após 4 dias de infecção foi completamente inibida nos camundongos tratados com 1 mg de clodronato (Figura 27). Além disso, o número de células Tfh no dia 5 p.i. é menor com o tratamento com 1 mg de clodronato, embora nos camundongos tratados com 157 µg tais números estejam parcialmente diminuídos (Figura 26D). A produção de IL-21 em resposta aos eritrócitos infectados pelo Pc mostrou-se também diminuída nos camundongos tratados com 1 mg (Figura 26E). Em conjunto, estes resultados indicam que os macrófagos da RP são fundamentais para a geração completa da população de células Tfh observada durante a infecção aguda com o Pc. Para confirmar a capacidade de macrófagos da RP em gerar células T CD4<sup>+</sup> com o fenótipo de células Tfh, nós realizamos co-culturas in vitro com macrófagos da RP (F4/80<sup>high</sup>) e células T CD4<sup>+</sup> de camundongos não infectados ou com 3 dias após a infecção sendo que as células T eram provenientes de camundongos tratados ou não com lipossomos de clodronato. Os macrófagos da RP foram capazes de induzir a expressão concomitante de PD1 e CXCR5, um fenótipo ligado à células Tfh (Figuras 26F e 26G), de uma maneira semelhante ao observado na presença de DCs (Figuras 26F e 26G), as quais são geralmente ligadas à geração de células Tfh in vivo (145). Além disso, nestas co-culturas, a presença de macrófagos da RP induziu um aumento na produção de IFN-y e IL-21 por estas células T CD4<sup>+</sup>, de modo semelhante ao observado na presença de DCs (Figura 26H), indicando que, ao menos parcialmente, estes macrófagos induziram o fenótipo de Tfh in vitro. É importante notar, no entanto, que as células T de camundongos previamente tratados com 1 mg de clodronato aumentaram apenas parcialmente a produção de IFN-γ e IL-21 na presença de macrófagos da RP, indicando que a ausência de macrófagos da RP nos primeiros dias após a infecção pelo Pc induzem as células T CD4<sup>+</sup> a se tornarem insensíveis à estimulações posteriores.



**Figura 26** – Importância de macrófagos da RP e da MZ para o fenótipo de células Tfh<sub>s</sub> durante a infecção aguda pelo *Pc*.

(A) Camundongos B6, previamente tratados com 1 mg de lipossomos de clodronato, foram infectados i.p. com 1 x 10<sup>6</sup> *Pc*; a expressão, em células T CD4<sup>+</sup> com 5 dias p.i., de mRNAs para stat3, icos e il6 foi avaliada por qPCR, utilizando o método –ΔΔCT (médias ± desvio-padrão). (B) Camundongos B6, previamente tratados com 1 mg ou 157 µg de lipossomos de clodronato, foram infectados i.p. com 1 x 10<sup>6</sup> Pc, e a expressão de ICOS nas células T CD4<sup>+</sup> foi analisada por citometria de fluxo no dia 5 p.i.; na esquerda, histogramas representativos da expressão de ICOS nas células T CD4<sup>+</sup>, enquanto na direita, os números de células T CD4<sup>+</sup> ICOS<sup>+</sup> por baço são mostrados (médias ± desvio-padrão). (C) As porcentagens de células T CD8<sup>+</sup> ICOS<sup>+</sup> aos 5 dias p.i. são mostradas, determinadas por citometria de fluxo (médias ± desvio-padrão). (D) Na esquerda, gráficos representativos, obtidos por citometria de fluxo, mostrando a expressão concomitante de PD-1 e CXCR5 em células T CD4<sup>+</sup> dos grupos experimentais aos 5 dias p.i.; na direita, os números totais de células T CD4<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> (Tfh<sub>s</sub>) por baço são mostrados (médias ± desvio-padrão). (E) Concentrações de IL-21 nos sobrenadantes de culturas celulares de esplenócitos mostradas na Figura 25D, quantificadas por ELISA (médias ± desvio-padrão). (F) Co-culturas com células T CD4<sup>+</sup> de camundongos com 3 dias p.i. dos grupos experimentais com DCs ou macrófagos F4/80<sup>high</sup> de camundongos B6, na presença de eritrócitos infectados, foram realizadas e mantidas por 72 h ou 96 h. Gráficos representativos, obtidos por citometria de fluxo, mostrando a expressão concomitante de PD-1 e CXCR5 nas células T CD4<sup>+</sup> destas coculturas são mostrados. (G) Porcentagens de células T  $CD4^+$  PD-1<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> (Tfhs) nas coculturas mostradas em F foram obtidas através de citometria de fluxo (médias ± desviopadrão). (H) Concentrações de IFN- $\gamma$  (acima) e IL-21 (abaixo) nos sobrenadantes das coculturas mostradas em F, quantificadas por ELISA (médias ± desvio-padrão). Diferenças significativas (p<0,05) entre os grupos de camundongos tratados com PBS ou com lipossomos de clodronato são indicadas por \*. Os dados mostram um experimento representativo de dois (n = 8).



Figura 27 – Expressão de ICOS em células T CD4<sup>+</sup> após 4 dias de infecção pelo *Pc*.

(A) Camundongos B6, previamente tratados com 1 mg de lipossomos de clodronato, foram infectados i.p. com 1 x  $10^6$  *Pc*; a expressão de ICOS nas células T CD4<sup>+</sup> aos 4 dias p.i. foi avaliada por citometria de fluxo. Gráficos representativos mostram a expressão de ICOS nas células T CD4<sup>+</sup>, obtidas por citometria de fluxo. (B) Gráficos representativos mostram a expressão de ICOS em células T CD4<sup>+</sup> provenientes das co-culturas mostradas na Figura 26F. Os dados mostram um experimento representativo de três (n = 5).

#### 4.3.5 Macrófagos da RP são fundamentais para a geração de células B do centro germinativo e para a produção de anticorpos IgG específicos ao Pc

Os resultados anteriores indicaram que os macrófagos da RP são importantes para a geração de células Tfh durante a infecção pelo *Pc.* As células Tfh são fundamentais para a interação com células B, e posterior geração da ativação de células B T-dependente, troca de isotipo e geração de anticorpos específicos (146). Desta forma, nós investigamos se a ausência de macrófagos da RP poderia inibir a ativação de células B. O número total de células B mostrou-se significativamente reduzido em ambos os grupos tratados com lipossomos de clodronato (Figura 28A). A expressão do marcador de ativação precoce CD69 manteve-se inalterado em todos os grupos tratados (Figura 28B), porém a expressão de outros marcadores de ativação tais como Fas ou aumento na expressão de MHC de classe II mostraram-se diminuídas em ambos os grupos tratados (Figura 28C). Estes resultados indicaram que a ativação precoce de células B dependeu principalmente de macrófagos da MZ. A proliferação das células B em resposta ao estímulo com eritrócitos infectados pelo *Pc in vitro*, no entanto, foi parcialmente inibida apenas no grupo tratado com 1 mg de lipossomos de clodronato (Figura 28D).

Depois, nós observamos o fenótipo das células B no dia 30 após a infecção. O número de células B Fas<sup>+</sup> GL7<sup>+</sup> do centro germinativo (GC) foi diminuído apenas nos camundongos tratados com 1 mg de lipossomos de clodronato (Figura 28E). Além disso, o número de células B IgG2a<sup>+</sup> (Figura 28F) e de plasmócitos IgG2a<sup>+</sup> (Figura 29) mostraram-se diminuídos no grupo tratado com 1 mg de lipossomos de clodronato, embora houvesse uma diminuição parcial nestes números nos camundongos tratados com 157  $\mu$ g. E, de forma importante, a produção e liberação de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos ao *Pc* foi inibida apenas nos grupos tratados com 1 mg de lipossomos de clodronato, B RP na infecção aguda pelo *Pc* é fundamental para as respostas de células B observadas na infecção crônica pelo *Pc*, e ligadas geralmente à ação das células Tfh.



**Figura 28** – Importância dos macrófagos da RP e da MZ para a ativação de células B durante a infecção pelo *Pc*.

(A) Camundongos B6, previamente tratados com 1 mg ou 157 μg de lipossomos de clodronato, foram infectados i.p. com 1 x 10<sup>6</sup> *Pc*; o número de células B por baço foi quantificado através de citometria de fluxo (médias ± desvio-padrão). (B) Na esquerda, histogramas representativos mostrando a expressão de CD69 nas células B dos camundongos experimentais; na direita, as porcentagens de células B CD69<sup>+</sup> por baço, aos 5 dias p.i. (médias ± desvio-padrão). (C) Na esquerda, histogramas representativos mostrando a expressão de Fas e de MHC de classe II (I-Ab) em células B dos grupos experimentais aos 5 dias p.i.; na direita, os valores de intensidade de mediana de fluorescência (MFI) para estes dois marcadores, quantificados por citometria de fluxo (médias ± desvio-padrão). (D) Na esquerda, histogramas representativos da marcação com CTV de células B esplênicas dos camundongos experimentais aos 5 dias p.i., estimuladas por 72 h com eritrócitos infectados (1 célula B para 3 eritrócitos infectados), determinados por citometria de fluxo. Na direita, as porcentagens de proliferação de células B (CTV<sup>Iow</sup>) dos camundongos experimentais, tanto espontânea quanto após a estimulação por 72 h com eritrócitos infectados). (E) Na esquerda, gráfico representativo da expressão concomitante de Fas e GL7 por células B, definindo a população de células B do

GC. Na direita, os números de células B do GC por baço, aos 30 dias p.i., foram determinados por citometria de fluxo (médias  $\pm$  desvio-padrão). (F) Na esquerda, histogramas representativos da expressão de IgG2a intracelular em células B CD19<sup>+</sup> em camundongos experimentais aos 30 dias p.i; na direita, os números de células B IgG2a<sup>+</sup> por baço aos 30 dias p.i. foram determinados por citometria de fluxo (médias  $\pm$  desvio-padrão). (G) Os títulos séricos de anticorpos IgM, IgG1 e IgG2a parasita-específicos foram determinados nos camundongos experimentais aos 30 dias p.i. por ELISA. Diferenças significativas (p<0,05) entre os grupos de camundongos tratados com PBS ou com lipossomos de clodronato são indicadas por \*. Os dados mostram um experimento representativo de dois (n = 8).

Figura 29 – Números de plasmócitos ilgG2a+ nos baços dos camundongos experimentais infectados com *Pc*.



Camundongos B6, previamente tratados com 1 mg ou 157  $\mu$ g de lipossomos de clodronato, foram infectados i.p. com 1 x 10<sup>6</sup> *Pc*; os números de plasmócitos (CD19<sup>low</sup> CD138<sup>+</sup>) ilgG2a<sup>+</sup> aos 30 dias p.i. foram quantificados por citometria de fluxo (médias ± desvio-padrão). Diferenças significativas (p<0,05) entre os grupos de camundongos tratados com PBS ou com lipossomos de clodronato são indicadas por \*. Os dados mostram um experimento representativo de dois (n = 8).

### **5 DISCUSSÃO**



Figura 30 - Modelo da interação entre a imunidade inata e adquirida durante a malária experimental crônica.

Em camundongos cronicamente infectados (60 dias p.i.), a exposição contínua aos parasitas mantém a população de células  $T_E e T_{EM}$ , as quais são capazes de produzir doses sub-ótimas de IFN- $\gamma$ , que induzem o priming por IFN- $\gamma$  do sistema imune, o qual por sua vez contribui para a manutenção das respostas de células  $T_E e T_{EM}$  aos parasitas. Quando os parasitas são completamente eliminados (200d p.i.), esse ciclo positivo cessa, e como consequência, há uma diminuição nos números de células  $T_E e T_{EM}$ , e também uma queda no estado de ativação do sistema imune. Essa queda torna os camundongos mais susceptíveis à novas infecções pelo *P. chabaudi*.

As características da imunidade naturalmente adquirida contra a malária são típicas da imunidade aos parasitas em geral, no qual a infecção é controlada e tolerada ao invés de prevenida ou eliminada. A re-infecção assintomática, níveis baixos de parasitemia, e a presença de gametócitos são observados em indivíduos considerados imunes, os quais não estão em risco de desenvolver morbidade significativa ou doença fatal (18,147). Em comum com as respostas observadas à maioria das outras infecções, a manutenção de respostas efetoras às fases sanguíneas do *Plasmodium* requer a persistência de baixos níveis de antígeno; esta, de fato, é a base para a *premunition*. De fato, SERGENT E PARROT (24) descreveram a *premunition* como um estado de constante alerta e operação dos sistemas de defesa do corpo. Desta forma, seria possível postular que uma vacina atenuada que permitisse a persistência em baixos níveis do antígeno, ou uma vacina que suprimisse, mas não eliminasse completamente a parasitemia, poderia induzir uma resposta imune eficiente de longa duração, capaz de prevenir altos níveis de carga parasitária e a malária clinica, de modo semelhante ao observado na imunidade naturalmente adquirida contra a malária. No entanto, células de memória em estado não-ativado podem sobreviver por longos períodos de tempo na ausência do antígeno e se tornarem re-ativadas após a re-infecção, o que também é observado em outras infecções. De maneira importante, alguns aspectos da imunidade clínica, nomeadamente a imunidade à doença grave e aos altos níveis de parasitemia pode ser mantida por longos períodos de tempo, na ausência de reinfecção. Está é uma observação importante, dado o potencial dano da re-introdução da malária em populações onde a transmissão tem sido marcadamente reduzida por controle de vetores ou vacinação (18).

No Artigo 1, o modelo experimental de infecção pelo P. chabaudi foi utilizado para determinar a razão pela qual a imunidade protetora cepa-inespecífica contra a malária é perdida na ausência de exposição contínua aos parasitas. Os resultados confirmam a noção de que o declínio das respostas de células T<sub>M</sub> aos parasitas, mas não na produção de anticorpos IgG específicos ao parasita, leva à falha na manutenção da imunidade protetora de longa duração contra a infecção pelo Pc (127). Além disso, os resultados mostraram que os mecanismos efetores imunológicos que garantem a imunidade cepa-inespecífica ao Pc agem quase que imediatamente após a re-infecção, inibindo o primeiro ciclo de invasão de eritrócitos, de maneira anterior à ativação de novo de células T. Teoricamente, as células T<sub>M</sub> são capazes de ativar a resposta imune inata através do IFN-γ, ou de modo independente desta citocina, como foi recentemente descrito para a infecção por influenza A (148). Nossos dados corroboram a idéia de que a persistência do parasita mantem uma população de células CD4<sup>+</sup> T<sub>E</sub>/T<sub>EM</sub> capazes de produzir baixos níveis de IFN-y (138). Os resultados também mostram que a estimulação contínua do sistema imune inato pelo IFN-y, um processo evidenciado em camundongos cronicamente infectados pela expressão aumentada de genes induzidos pelo IFN em DCs, e pelo aumento nas respostas a agonistas de TLR em esplenócitos, permite o controle da re-infecção heteróloga, e impede o desenvolvimento de manifestações clínicas da doença, e a consequente morte dos animais (Figura 30). Estes resultados podem explicar o porquê da imunidade clínica e estéril contra a

malária serem possivelmente eventos excludentes.

O aumento na expressão e função de TLRs induzidos pelo IFN-y foi previamente mostrado durante a infecção aguda pela malária em humanos e camundongos, e foi considerado um importante fator na expansão das respostas antimaláricas em um período onde a imunidade inata exerce um papel fundamental (85). Este estudo mostrou uma resposta robusta de IFN-y a agonistas de TLR por esplenócitos uma semana após a infecção pelo PcAS, a qual diminui dentro de duas semanas; de fato, os níveis de IFN-y produzidos na quarta semana p.i. são comparáveis com os níveis descritos em nosso estudo, com camundongos cronicamente infectados. Nossos resultados recapitulam a noção de que a resposta de células T CD4<sup>+</sup> esplênicas ao *Pc*AS se desenvolve em duas fases, concomitantemente com as parasitemias aguda e crônica; desta forma, a fase inicial é intensa e de curta duração, rapidamente induzindo altas quantidades de citocinas pro inflamatórias, e a fase tardia é caracterizada por pequenos picos de produção de IFN-y (102). A continuidade do priming induzido por IFN-y do sistema imune inato durante a fase crônica da infecção parece ser essencial para o controle de parasitas de cepas heterólogas, contra as quais a imunidade humoral não é ideal, devido, por exemplo, a polimorfismos no gene da msp1 (137,149). É importante notar que, em nosso estudo, o priming in vivo com baixas doses de IFN-y induziu a proteção contra a reinfecção pelo parasita apenas em camundongos previamente infectados, mas não em camundongos não infectados, sugerindo que a cooperação com outros mecanismos efetores da resposta imune, como anticorpos contra epítopos conservados em antígenos do parasita (150), é necessária para garantir a imunidade cepa-inespecífica à infecção pelo Pc.

Os mecanismos efetores imunológicos aumentados pelo *priming* induzido pelo IFN-γ são muitos, como indicado pela diversidade de genes induzidos pelo IFN que estão com expressão aumentada após, por exemplo, o tratamento de macrófagos com baixas doses de IFN-γ (41,139). Nossos resultados correlacionaram a expressão de mRNAs específicos para *tlr2*, *tlr4*, *tlr9*, *md2* e *cd36* em DCs esplênicas de camundongos cronicamente infectados, com a capacidade em controlar a reinfecção por cepas heterólogas do parasita, o que sugere um papel para estas moléculas na manutenção da imunidade cepa-inespecífica à malária. Considerando a existência, no *Plasmodium*, de vários ligantes para TLR, como o

glicofosfatidilinositol (GPI), o qual é reconhecido pelo complexo TLR1/TLR2 com a contribuição do TLR4 (76,151), e o DNA do parasita, o qual é reconhecido pelo TLR9 (80), a capacidade de resposta ao TLR de longa duração em camundongos cronicamente infectados, pode manter a capacidade de macrófagos, DCs e outras células com expressão de TLRs em reconhecer eritrócitos infectados e merozoítos. De fato, tem sido mostrado que a ativação de DCs não requer apenas contatos diretos célula-a-célula e a internalização de eritrócitos infectados pelas DCs, mas também envolve a sinalização por TLR4, TLR9 e MyD88, através do NF-κB (140). Além disso, o TLR3 e o TLR9 promovem a fagocitose de bactérias por macrófagos murinos e humanos através da indução de um programa genético para fagocitose, o qual pode também ser induzido por TLR4 e TLR5 (152,153). O receptor scavenger do tipo B CD36, outra molécula cujo mRNA encontrou-se com expressão aumentada nas DCs esplênicas de camundongos cronicamente infectados, medeia a fagocitose independente de opsonização de eritrócitos infectados por monócitos e DCs (154). A ligação de eritrócitos infectados a estas células parece ocorrer através do reconhecimento de resíduos de fosfatidilserina expostos na membrana de eritrócitos infectados, ou na expressão nestas membranas da proteína do P. falciparum PfEMP-1 (155).

Por outro lado, a alta expressão de mRNA específico para *stat3* nas DCs esplênicas de camundongos cronicamente infectados indica que o *priming* induzido por IFN-γ do sistema imune inato é um processo refinado, que é regulado durante a fase crônica através de mecanismos de *feedback* negativo, como aqueles mediados por IL-10, STAT3 e SOCS1 (139). Há tempos tem se descrito que a exposição a agonistas de TLR leva a um desenvolvimento de tolerância através de um bloqueio de vias de sinalização correspondentes (156,157,158). A tolerância quase certamente ocorre em pacientes de áreas holoendêmicas de malária que não exibem os sinais e sintomas da doença, apesar da presença de parasitas na circulação (159,160). De modo semelhante, a temperatura corporal e o peso voltam ao normal após o controle da parasitemia aguda em camundongos infectados pelo *Pc*AS (150). De acordo com o conceito de que vias de sinalização estimulatórias e regulatórias coexistem durante a infecção pelo *Pc*AS, células T CD4<sup>+</sup> co-expressando IFN-γ e IL-10 exercem um papel importante tanto na proteção como no controle das manifestações clínicas da doença (161).

Outro aspecto importante do priming induzido pelo IFN-y observado em nosso trabalho é o seu efeito em subtipos de células CD4<sup>+</sup> T<sub>M</sub> em camundongos curados, levando a uma mudança no padrão, de células CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> para células CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>, e restaurando a capacidade proliferativa e de produção de IFN-y em resposta a eritrócitos infectados e a agonistas de TLR. A importância do reconhecimento de antígenos cognatos para a manutenção e sobrevivência de células CD4<sup>+</sup> T<sub>M</sub> foi recentemente discutida para a malária (19), assim como para outras doenças (162,163). O mecanismo exato pelo qual o IFN-y mantém as células CD4<sup>+</sup> T<sub>M</sub> em um estado de memória efetora ainda não é bem compreendido. Nós hipotetizamos que o re-estabelecimento das respostas de células CD4<sup>+</sup> T<sub>M</sub> a eritrócitos infectados é, ao menos em parte, um efeito indireto da indução do aumento, induzido por IFN-y, da resposta ao TLR em DCs esplênicas. Essa possibilidade é apoiada pelos nossos dados em camundongos MyD88KO, indicando que a sinalização pelo TLR também contribui para a manutenção de respostas de células CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> durante a fase crônica da infecção, o que, por sua vez, leva ao priming induzido pelo IFN-y e auxilia no controle da parasitemia remanescente. Os níveis elevados de parasitemia crônica em camundongos MyD88KO não causaram morte dos camundongos em nosso estudo, concordando com resultados anteriores (138,164).

A infecção com o *Pc* induz tanto respostas imunes inatas quanto adquiridas, as quais levam à eliminação do parasita ao longo da infecção (165,166), e é comumente aceito que alguns mecanismos, tais como a neutralização mediada por anticorpos (167,168) e a fagocitose (91,92) poderiam ser importantes para a eliminação dos parasitas da circulação. Entretanto, um estudo detalhado da fagocitose de eritrócitos infectados durante a malária experimental ainda não havia sido realizado. No Artigo 2, nós avalamos, por técnicas *in vivo* e *ex vivo*, este mecanismo durante a infecção aguda pelo *Pc*. Resumidamente, nós verificamos que DCs e macrófagos da RP são capazes de fagocitar eritrócitos infectados durante esta fase da infecção; além disso, nossos resultados indicam que estas células contribuem diferencialmente para a formação das respostas imunes adquiridas que se desenvolvem subsequentemente à atividade fagocítica.

Através da depleção e visualização de DCs esplênicas *in vivo* e *ex vivo* durante a infecção aguda pelo *Pc*, nós demonstramos claramente que estas células são participantes centrais na ativação precoce de células T CD4<sup>+</sup>, assim como na

eliminação do parasita. As técnicas *in vivo* demonstraram inequivocamente que DCs da região subcapsular da RP reconhecem e fagocitam eritrócitos infectados durante o primeiro encontro com o parasita, e também durante o período de pré-crise, enquanto o fechamento do baço coincide com uma limitada capacidade de fagocitose do *Pc* pelas DCs durante a crise. Nossas primeiras evidências sugerindo que as DCs contribuem diretamente para a limitação da parasitemia pelo *Pc* foram os resultados mostrando que a depleção de células CD11c<sup>+</sup> levou a um aumento na parasitemia no início da infecção. Embora células NK ativadas e alguns macrófagos também expressem níveis moderados de CD11c (169,170), a expressão abundante de CD11c é um marcador bem conhecido para DCs, as quais são o principal alvo para o tratamento com DTx em camundongos B6.CD11c-DTR (171). Uma vez que células T levam um tempo maior para produzir IFN- $\gamma$  e induzir a secreção de anticorpos durante a infecção pelo *Pc* (102,141), o papel protetor das células CD11c<sup>+</sup> não pode ser completamente atribuído à necessidade de se ter DCs para ativação das células T.

A técnica de CIVM nos permitiu visualizar a interação entre as DCs da região subcapsular da RP e os eritrócitos infectados em grande detalhe. Em camundongos não infectados, estas células apresentaram extensões de protusões e dendritos de forma ativa, como previamente mostrado (90,172). Logo após a infecção pelo Pc, nós observamos eritrócitos infectados no momento em que eram removidos da circulação por DCs, as quais não apresentaram um fenótipo ativado. Embora nós não tenhamos visualizado a fagocitose de eritrócitos infectados em camundongos recém-infectados diretamente, a detecção de restos do Pc dentro de DCs subcapsulares da RP sugeriu que a fagocitose de eritrócitos infectados de fato ocorreu. A apresentação de antígenos do parasita possivelmente ocorre rapidamente após a infecção pelo Pc, como observado na infecção por L. monocytogenes (113). Durante o primeiro dia p.i., as DCs da região subcapsular da RP se movimentaram de forma rápida, e fizeram contatos estáveis com células T CD4<sup>+</sup>. As DCs também migraram rapidamente para áreas ricas em células T, logo após a infecção pelo Pc, um processo que possivelmente envolve a sinalização por quimiocinas, como indicado por estudos em camundongos deficientes para CCR7 (172). A rápida interação entre DCs e células T CD4<sup>+</sup> parece ser importante para a iniciação da resposta imune adquirida contra a infecção pelo Pc, uma vez que a proliferação de células T CD4<sup>+</sup> e a produção de IFN-γ foram completamente ausentes em camundongos B6.CD11c-DTR tratados com DTx.

Durante a pré-crise, nós observamos pela primeira vez a fagocitose de eritrócitos infectados diretamente in vivo. Isto ocorreu em um grande número de DCs subcapsulares da RP, de modo que até metade desta população apresentou restos do Pc. O fato que estas DCs subcapsulares da RP apresentaram um fenótipo ativado foi bastante interessante. Ainda que a maior parte das DCs subcapsulares da RP podem ser células imaturas que recentemente migraram para o baço (173), é esperado que a ativação das DCs leve à maturação e consequente bloqueio da atividade fagocítica destas células, permitindo o re-estruturamento da maquinaria celular para a apresentação de antígenos (109). Em acordo com nossos dados, um estudo anterior determinou o pico da capacidade de fagocitose de eritrócitos infectados por DCs in vitro como sendo 5 dias p.i., em paralelo com um aumento na expressão de MHC de classe II e de moléculas co-estimulatórias (105). Em ambos os estudos, a atividade fagocítica não foi restrita a um subtipo de DC em particular. Nossos dados ex vivo implicam DCs CD11b<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> na maior parte do controle do parasita imputado à DCs esplênicas em camundongos recém-infectados, e em camundongos durante a fase de pré-crise.

Durante a crise, a diminuição da função fagocítica das DCs esplênicas coincidiu com o período de fechamento do baço, o qual foi evidenciado em nosso estudo por imagens *in vivo* mostrando pouquíssimos eritrócitos infectados na região subcapsular da RP aos 8 dias p.i., quando as parasitemias apresentavam-se ainda maior do que o observado em 5 dias p.i.. A diminuição na fagocitose de eritrócitos infectados também foi associada com a expressão máxima, nas DCs, de MHC de classe II e de CD80, o que indica que a completa maturação das DCs foi apenas atingida durante a crise. Esta ideia é corroborada por um estudo anterior que mostrou uma diminuição da capacidade fagocítica de DCs esplênicas *in vitro* aos 8 dias p.i. (105). Desta forma, além do fechamento do baço e o subsequente bloqueio da entrada de eritrócitos infectados na RP, as DCs esplênicas parecem perder a capacidade em fagocitar parasitas, concomitantemente aumentando sua capacidade em apresentar antígenos cognatos. Esta é uma observação interessante porque, durante a crise, a maior parte das células T e B que são ativadas durante a fase aguda da infecção pelo *Pc* sofrem apoptose (174,175). Assim, é possível que DCs maduras sejam necessárias para expandir e diferenciar as poucas células T remanescentes, levando à geração de respostas de memória à malária (127,176). A quantificação da fagocitose de eritrócitos infectados ex vivo por citometria de fluxo nos mostrou porcentagens de DCs Pc<sup>+</sup> substancialmente menores em comparação com dados obtidos in vivo por CIVM. Esta discrepância pode resultar de diferenças nos basais de detecção de fluorescência da CIVM e da citometria de fluxo; de diferenças nas subpopulações de DCs observadas por estas técnicas (DCs subcapsulares da RP ou DCs esplênicas totais, respectivamente); ou o tipo de fluorocromo associado aos eritrócitos infectados (mCherry, GFP ou CTV). Outra explicação plausível para a baixa detecção da fagocitose de eritrócitos infectados por citometria de fluxo pode ser a rápida degradação de eritrócitos infectados, ou o quenching de fluorocromos (91), de forma que restos do Pc possam ser identificados dentro das DCs apenas pouco tempo após a fagocitose. Baixas frequências de fagocitose de eritrócitos infectados foram também detectadas por citometria de fluxo em monócitos migratórios (91,92). A técnica de imunofluorescência confirmou que as DCs esplênicas, particularmente aquelas presentes na RP e na MZ, exercem um papel importante na eliminação dos eritrócitos infectados durante a infecção aguda pelo Pc. Embora esta técnica não discrimine de forma eficiente células, as porcentagens de co-localização de pixels CD11c e GFP foram comparáveis aos números observados de DCs Pc<sup>+</sup> obtidos por CIVM.

No Artigo 3, nós observamos que macrófagos da MZ, e principalmente macrófagos da RP, fagocitaram eritrócitos infectados eficientemente durante a infecção aguda pelo *Pc*. De modo importante, a ausência de macrófagos da RP levou a um aumento na parasitemia durante a fase aguda da infecção pelo *Pc*, indicando um papel importante para estas células. De fato, estas células são comumente ligadas à remoção de antígenos e patógenos do sangue (177).

As diferentes taxas de repopulação entre macrófagos esplênicos após a depleção com lipossomos de clodronato (113) nos permitiram estudar os papéis individuais de macrófagos da RP e macrófagos da MZ na imunidade contra a infecção pelo *Pc*. Macrófagos da RP pareceram ser pouco importantes para a ativação de células T CD4<sup>+</sup> durante o início da infecção. Esses macrófagos foram importantes para respostas espontâneas de células T CD4<sup>+</sup> *ex vivo*, o que pode ser ligado a uma ativação policional que ocorreu previamente *in vivo* (102). Os macrófagos da RP

foram também fundamentais para a ativação de células B e posterior função *in vivo*. A apresentação de antígenos por macrófagos para células B já foi anteriormente observada, principalmente com macrófagos da MZ (178); em linfonodos, uma subpopulação de macrófagos presente no seio subcapsular parece também ser importante para apresentar antígenos virais diretamente para células B, pela captura através de receptores de superfície, no entanto sem posterior degradação antigênica (179). Porém, isto não exclui a possibilidade de que, em outros casos, macrófagos residentes (por exemplo, da RP) fagocitem antígenos (por exemplo, eritrócitos infectados), posteriormente para células B; de fato, algumas proteínas de membrana de macrófagos poderiam exercer um papel neste sentido, tais como receptores Fcγ ou DC-SIGN (180). Outro modo possível pelo qual os macrófagos da RP influenciariam a ativação de células B seria a produção de citocinas tais como BAFF (181).

No entanto, a explicação mais provável pela qual os macrófagos da RP são importantes para a ativação e função de células B durante a infecção pelo Pc é a função dos macrófagos da RP em ativar e induzir o fenótipo de células Tfh. Células Tfh são especializadas no auxílio à ativação de células B. As células Tfh dependem da expressão do fator de transcrição Bcl6. Como aspectos típicos das células Tfh, podemos listar a expressão de CXCR5, PD-1, IL-21 e ICOS, entre outras moléculas, e a ausência de Blimp-1. As células Tfh são fundamentais para a formação do GC, e uma vez que o GC se forma, tais células passam a ser necessárias para a manutenção do GC, assim como na regulação da diferenciação de células B do GC em plasmócitos e células B de memória (182). O nosso trabalho mostrou que, na ausência de macrófagos da RP, mas não da MZ, a expressão de ICOS nas células T CD4<sup>+</sup> durante a fase aguda da infecção apresentou-se diminuída; de modo semelhante, a ausência dos macrófagos da RP levou a uma menor quantidade de células T CD4<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup>, assim como na produção de IL-21 em resposta ao estimulo in vitro com eritrócitos infectados; todos estes marcadores são, como descrito acima, típicos de células Tfh. Além disso, macrófagos da RP foram capazes de induzir o fenótipo de células Tfh in vitro. A capacidade de macrófagos da RP em induzir o fenótipo de células Tfh in vitro foi um pouco pior em comparação com a capacidade de DCs em fazer o mesmo – as DCs tem sido consideradas células

importantes em passos iniciais na geração de células Tfh (182); porém, a inibição na geração das células Tfh observada *in vivo* na ausência de macrófagos da RP indica um papel fundamental desta população, durante a infecção pelo *Pc*, na geração de Tfh<sub>s</sub>, e na subsequente indução de respostas de células B.

Os resultados obtidos nesta tese indicam que, durante a infecção pelo *Pc*, elementos da imunidade inata, tais como DCs (mostrada no Artigo 2) ou macrófagos da RP (mostrada no Artigo 3) parecem influenciar na ativação e diferenciação de respostas imunes adquiridas, notadamente as respostas mediadas por células T  $CD4^+$ . Ao mesmo tempo, elementos da imunidade adquirida, como as células  $T_M$ , parecem exercer influência em células da imunidade inata, como foi mostrado no Artigo 1, onde o IFN- $\gamma$  proveniente destas células T induz uma maior ativação nas DCs esplênicas. É possível, desta forma, que a comunicação entre a imunidade inata e adquirida possa ser importante para a geração e manutenção dos mecanismos efetores necessários para a eliminação do *Plasmodium* da circulação. Ao mesmo tempo, o desenvolvimento de técnicas que permitem uma visualização e avaliação precisa da fagocitose de eritrócitos, tal como a técnica de CIVM (observada nos Artigos 2 e 3), será fundamental para que os efeitos da interação entre a imunidade inata e a imunidade adquirida nos mecanismos efetores antiparasíticos sejam esclarecidos.

## 6 CONCLUSÃO
Os resultados apresentados na tese nos permitem concluir:

- Que o priming por IFN-γ do sistema imune de camundongos C57BL/6 é necessário para a manutenção do estado de vigilância imunológica do hospedeiro, e consequentemente para a imunidade cepa-inespecífica contra a infecção pelo *Pc*. Os resultados sugerem também que a perda de proteção em camundongos espontaneamente curados resulta da interrupção de um ciclo positivo, no qual a contínua exposição aos parasitas mantém a população de células CD4<sup>+</sup> T<sub>E</sub>/T<sub>EM</sub> que são capazes de produzir doses baixas de IFN-γ, e o priming do sistema imune induzido por esse IFN-γ contribui para sustentar as respostas de células CD4<sup>+</sup> T<sub>E</sub>/T<sub>EM</sub> contra estes parasitas.

- Que a técnica de CIVM nos permitiu visualizar a fagocitose de eritrócitos infectados pela rede de DCs da região subcapsular da RP, assim como a dinâmica de movimentação e mudanças morfológicas destas DCs, e a interação entre DCs e células T CD4<sup>+</sup> nas diferentes fases da infecção aguda pelo *Pc*. Durante vários dias após a infecção pelo *Pc*, tais DCs mostraram-se altamente eficientes no reconhecimento e fagocitose dos eritrócitos infectados. O fenótipo de maturação completa das DCs foi atingido somente durante a crise, quando a re-estruturação do baço talvez possa facilitar o desenvolvimento da imunidade adquirida.

- Que os macrófagos da RP, durante a infecção aguda pelo Pc, são importantes para a eliminação dos parasitas da circulação, e também para a geração de células Tfh, o que correlacionou com a importância destes macrófagos na ativação e função de células B ao longo das fases aguda e crônica da infecção pelo Pc.

# REFERÊNCIAS

### **REFERÊNCIAS\***

1. World Health Organization (WHO). World Malaria Report. **WHO Report 2013**, World Health Organization, 2013.

2. PRUDÊNCIO, M. et al. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 4, p. 849-856, 2006.

3. STURM, A. et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, v. 313, n. 5791, p. 1287-1290, 2006.

4. MAURITZ, J. M. A. et al. The homeostasis of *Plasmodium falciparum*infected red blood cells. **PLoS Comput. Biol.**, v. 5, p. e1000339, 2009.

5. AGNANDJI, S. T. et al. Induction of *Plasmodium falciparum*-specific CD4+ T cells and memory B cells in Gabonese children vaccinated with RTS,S/AS01(E) and RTS,S/AS02(D). **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e18559, 2011.

6. DOOLAN, D. L. et al. Acquired immunity to malaria. Clin. Microbiol. Rev., v. 22, n. 1, p. 13-36, 2009.

7. STANISIC, D. I. et al. Escaping the immune system: How the malaria parasite makes vaccine development a challenge. **Trends Parasitol.**, v. 29, n. 12, p. 612-622, 2013.

8. SNOW, R. W. et al. Relation between severe malaria morbidity in children and level of *Plasmodium falciparum* transmission in Africa. **Lancet**, v. 349, n. 9066, p. 1650-1654, 1997.

9. BORRMAN, S. et al. Protective immunity against malaria by 'natural immunization': a question of dose, parasite diversity, or both? **Curr. Opin. Immunol.**, v. 23, n. 4, p. 500-508, 2011.

10. GILL, G. (Ed.). Some points in the epidemiology of malaria arising out of the study of the malaria epidemic in Ceylon in 1934–35. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 29, p. 427-480, 1936.

11. BASTIEN, P. (Ed.). Particularites epidemiologiques des acces pernicieux a *Plasmodium faciparum* dans un contexte d'epidemie palustre. **Med. Trop.** (Mars), v. 47, p. 125-131, 1987.

12. ZHOU, G. et al. Association between climate variability and malaria epidemics in the East African highlands. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, n. 8, p.2375-2380, 2004.

<sup>\*</sup>De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

13. ROWLAND, M. et al. Malaria epidemiology and control in refugee camps and complex emergencies. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 95, n. 8, p. 741-754, 2001.

14. BAIRD, J. K. et al. Onset of clinical immunity to *Plasmodium falciparum* among Javanese migrants to Indonesian Papua. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 97, n. 6, p. 557-564, 2003.

15. MARSH, K. et al. The pathogenesis of severe malaria in African children. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 90, n. 4, p. 395-402, 1996.

16. MCELROY, P. D. et al. Predicting outcome in malaria: correlation between rate of exposure to infected mosquitoes and level of *Plasmodium falciparum* parasitemia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 51, n. 5, p. 523-532, 1994.

17. BAIRD, J. K. et al. Age-specific prevalence of *Plasmodium falciparum* among six populations with limited histories of exposure to endemic malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 49, n. 6, p. 707-719, 1993.

18. STRUIK, S. S. et al. Does malaria suffer from lack of memory? **Immunol. Rev.**, v. 201, p. 268-290, 2004.

19. LANGHORNE, J. et al. Immunity to malaria: more questions than answers. **Nat. Immunol.**, v. 9, n. 7, p. 725-732, 2008.

20. GUPTA, S. et al. Acquired immunity and postnatal clinical protection in childhood cerebral malaria. **Proc. Biol. Sci.**, v. 266, n. 1414, p. 33-38, 1999.

21. TODRYK, S. M. et al. Multiple functions of human T cells generated by experimental malaria challenge. **Eur. J. Immunol.**, v. 39, n. 11, p. 3042-3051, 2009.

22. DOURADINHA, B. et al. Harnessing immune responses against *Plasmodium* for rational vaccine design. **Trends Parasitol.**, v. 27, n. 6, p. 274-283, 2011.

23. SCHELLER, L. F. et al. Maintenance of protective immunity against malaria by persistent hepatic parasites derived from irradiated sporozoites. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, n. 9, p. 4066-4068, 1995.

24. SERGENT, E. et al. Premunition in bovine piroplasmosis and human malaria. **Arch. Inst. Pasteur Alger.**, v. 29, n. 2, p. 117-119, 1951.

25. KLEINSCHMIDT, I. et al. Patterns in age-specific malaria incidence in a population exposed to low levels of malaria transmission intensity. **Trop. Med. Int. Health**, v. 6, n. 12, p. 986-991, 2001.

26. LUXEMBURGER, C. et al. The epidemiology of severe malaria in an area of low transmission in Thailand. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 91, n. 3, p. 256-262, 1997.

27. MUELLER, I. et al. Natural acquisition of immunity to *Plasmodium vivax*: epidemiological observations and potential targets. **Adv. Parasitol.**, v. 81, p. 77-131, 2013.

28. TAYLOR, S. M. et al. Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis**. Lancet Infect. Dis.**, v. 12, n. 6, p. 457-468, 2012.

29. MIGOT, F. et al. Human immune responses to the *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocyte surface antigen (Pf155/RESA) after a decrease in malaria transmission in Madagascar. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 48, n. 3, p. 432-439, 1993.

30. FERREIRA, M. U. et al. The isotype composition and avidity of naturally acquired anti-*Plasmodium falciparum* antibodies: differential patterns in clinically immune Africans and Amazonian patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, n. 3, p. 315-323, 1996.

31. GIHA, H. A. et al. Nine-year longitudinal study of antibodies to variant antigens on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 8, p. 4092-4098, 1999.

32. PEPPER, M. et al. Origins of CD4(+) effector and central memory T cells. **Nat. Immunol.**, v. 12, n. 6, p. 467-471, 2011.

33. HARARI, A. et al. Functional heterogeneity of memory CD4 T cell responses in different conditions of antigen exposure and persistence. **J. Immunol.**, v. 174, n. 2, p. 1037-1045, 2005.

34. ROESTENBERG, M. et al. Protection against a malaria challenge by sporozoite inoculation. **N. Engl. J. Med.**, v. 361, n. 5, p. 468-477, 2009.

35. ROESTENBERG, M. et al. Long-term protection against malaria after experimental sporozoite inoculation: an open-label follow-up study. Lancet, v. 377, n. 9779, p. 1770-1776, 2011.

36. GRAY, D. (Ed.). A role for antigen in the maintenance of immunological memory. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, n. 1, p. 60-65, 2002.

37. OCHSENBEIN, A. F. et al. A comparison of T cell memory against the same antigen induced by virus versus intracellular bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, n. 16, p. 9293-9298, 1999.

38. TAYLOR-ROBINSON, A. W. (Ed.). Regulation of immunity to *Plasmodium*: implications from mouse models for blood stage malaria vaccine design. **Exp. Parasitol.**, v. 126, n. 3, p. 406-414, 2010.

39. KAECH, S. M. et al. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, n. 4, p. 251-262, 2002.

40. MCCALL, M. B. et al. Interferon-γ--central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria. **J. Leukoc. Biol.**, v. 88, n. 6, p. 1131-1143, 2010.

41. SCHRODER, K. et al. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **J. Leukoc. Biol.**, v. 75, n. 2, p. 163-189, 2004.

42. DODOO, D. et al. Absolute levels and ratios of proinflammatory and antiinflammatory cytokine production *in vitro* predict clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. **J. Infect. Dis.**, v. 185, n. 7, p. 971-979, 2002.

43. D'OMBRAIN, M. C. et al. Association of early interferon-gamma production with immunity to clinical malaria: a longitudinal study among Papua New Guinean children. **Clin. Infect. Dis.**, v. 47, n. 11, p. 1380-1387, 2008.

44. ROBINSON, L. J. et al. Cellular tumor necrosis factor, gamma-interferon, and interleukin-6 responses as correlates of immunity and risk of clinical *Plasmodium falciparum* malaria in children from Papua New Guinea. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 3033-3043, 2009.

45. SU, Z. et al. Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 8, p. 4399-4406, 2000.

46. VAN DER HEYDE, H. C. et al. The time course of selected malarial infections in cytokine-deficient mice. **Exp. Parasitol.**, v. 85, n. 2, p. 206-213, 1997.

47. AMANI, V. et al. Involvement of IFN-gamma receptor-medicated signaling in pathology and anti-malarial immunity induced by *Plasmodium berghei* infection. **Eur. J. Immunol.**, v. 30, n. 6, p. 1646-1655, 2000.

48. FAVRE, N. et al. The course of *Plasmodium chabaudi chabaudi* infections in interferon-gamma receptor deficient mice. **Parasite Immunol.**, v. 19, n. 8, p. 375-383, 1997.

49. MEDING, S. J. et al. Role of gamma interferon during infection with *Plasmodium chabaudi chabaudi*. Infect. Immun., v. 58, n. 11, p. 3671-3678, 1990.

50. STEVENSON, M. M. et al. Role of endogenous gamma interferon in host response to infection with blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS. **Infect. Immun.**, v. 58, n. 10, p. 3225-3232, 1990.

51. YONETO, T. et al. Gamma interferon production is critical for protective immunity to infection with blood-stage *Plasmodium berghei* XAT but neither NO production nor NK cell activation is critical. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 5, p. 2349-2356, 1999.

52. ZEVERING, Y. et al. Life-spans of human T-cell responses to determinants

from the circumsporozoite proteins of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, n. 13, p. 6118-6122, 1994.

53. BEJON, P. et al. The induction and persistence of T cell IFN-gamma responses after vaccination or natural exposure is suppressed by *Plasmodium falciparum*. **J. Immunol.**, v. 179, n. 6, p. 4193-4201, 2007.

54. DENT, A. E. et al. Temporal stability of naturally acquired immunity to Merozoite Surface Protein-1 in Kenyan adults. **Malar. J.**, v. 8, p. 162, 2009.

55. MOORMANN, A. M. et al. Stability of interferon-gamma and interleukin-10 responses to *Plasmodium falciparum* liver stage antigen 1 and thrombospondin-related adhesive protein immunodominant epitopes in a highland population from Western Kenya. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, p. 489-495, 2009.

56. WYLER, D. J. et al. Lymphocyte transformation in human *Plasmodium falciparum* malaria. J. Immunol., v. 113, p. 449-454, 1974.

57. COBAN, C. et al. Immunogenicity of whole-parasite vaccines against *Plasmodium falciparum* involves malarial hemozoin and host TLR9. **Cell Host Microbe**, v. 7, p. 50-61, 2010.

58. HOFFMAN, S. L. et al. Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. J. Infect. Dis., v. 185, p. 1155-1164, 2002.

59. POMBO, D. J. et al. Immunity to malaria after administration of ultralow doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. **Lancet**, v. 360, p. 610-617, 2002.

60. GRAVES, P. et al. Vaccines for preventing malaria (bloodstage). **Cochrane Database Syst. Rev.**, CD006199, 2006.

61. GRAVES, P. et al. Vaccines for preventing malaria (preerythrocytic). **Cochrane Database Syst. Rev.**, CD006198, 2006.

62. GRAVES, P. et al. Vaccines for preventing malaria (SPf66). **Cochrane Database Syst. Rev.**, CD005966, 2006.

63. REMARQUE, E. J. et al. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. **Trends Parasitol.**, v. 24, p. 74-84, 2008.

64. CHIZZOLINI, C. et al. T lymphocyte interferon-gamma production induced by *Plasmodium falciparum* antigen is high in recently infected non-immune and low in immune subjects. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 79, p. 95-99, 1990.

65. RHEE, M. S. et al. Changes in cytokine production associated with acquired immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 126, p. 503-510, 2001.

66. RINGWALD, P. et al. Levels of cytokines in plasma during *Plasmodium falciparum* malaria attacks. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, p. 2076-2078, 1991.

67. MSHANA, R. N. et al. Cytokines in the pathogenesis of malaria: levels of IL-1 beta, IL-4, IL-6, TNF-alpha and IFN-gamma in plasma of healthy individuals and malaria patients in a holoendemic area. **J. Clin. Lab. Immunol.**, v. 34, p. 131-139, 1991.

68. FINNEY, O. C. et al. Regulatory T cells in malaria — friend or foe? **Trends Immunol.**, v. 31, p. 63-70, 2010.

69. TROYE-BLOMBERG, M. et al. Regulation of the immune response in *Plasmodium falciparum* malaria. II. Antigen specific proliferative responses in vitro. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 53, p. 345-353, 1983.

70. THEANDER, T. G. et al. Suppression of parasite-specific response in *Plasmodium falciparum* malaria. A longitudinal study of blood mononuclear cell proliferation and subset composition. **Scand. J. Immunol.**, v. 24, p. 73-81, 1986.

71. TROYE-BLOMBERG, M. et al. Production of IL-2 and IFN-gamma by T cells from malaria patients in response to *Plasmodium falciparum* or erythrocyte antigens in vitro. **J. Immunol.**, v. 135, p. 3498-3504, 1985.

72. RILEY, E. M. et al. Cellular immune responses to *Plasmodium falciparum* antigens in Gambian children during and after an acute attack of falciparum malaria. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 73, p. 17-22, 1988.

73. LUTY, A. J. et al. *Plasmodium falciparum* liver-stage antigen-1 peptidespecific interferon-gamma responses are not suppressed during uncomplicated malaria in African children. **Eur. Cytokine Netw.**, v. 12, p. 647-653, 2001.

74. OTOO, L. N. et al. Cellular immune responses to *Plasmodium falciparum* antigens in children receiving long term anti-malarial chemoprophylaxis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 83, p. 778-782, 1989.

75. SCHOFIELD, L. et al. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. **J. Exp. Med.**, v. 177, p. 145-153, 1993.

76. KRISHNEGOWDA, G. et al. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 8606-8616, 2005.

77. ROPERT, C. et al. Macrophage signaling by glycosylphosphatidylinositolanchored mucinlike glycoproteins derived from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. **Microbes Infect.**, v. 4, p. 1015-1025, 2002. 78. BECKER, I. et al. Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 130, p. 65-74, 2003.

79. COBAN, C. et al. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. **J. Exp. Med.**, v. 201, p. 19-25, 2005.

80. PARROCHE, P. et al. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, p. 1919-1924, 2007.

81. MCCALL, M. B. et al. *Plasmodium falciparum* infection causes proinflammatory priming of human TLR responses. **J. Immunol.**, v. 179, p. 162-171, 2007.

82. OCKENHOUSE, C. F. et al. Common and divergent immune response signaling pathways discovered in peripheral blood mononuclear cell gene expression patterns in presymptomatic and clinically apparent malaria. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 5561-5573, 2006.

83. PERRY, J. A. et al. Cutting edge: the acquisition of TLR tolerance during malaria infection impacts T cell activation. **J. Immunol.**, v. 174, p. 5921-5925, 2005.

84. KALIS, C. et al. Requirement for TLR9 in the immunomodulatory activity of *Propionibacterium acnes*. **J. Immunol.**, v. 174, p. 4295-4300, 2005.

85. FRANKLIN, B. S. 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. USA**, v. 106, p. 5789-5794, 2009.

86. ARTAVANIS-TSAKONAS, K. et al. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*- infected erythrocytes. **J. Immunol.**, v. 169, p. 2956-2963, 2002.

87. BUFFET, P. A. et al. The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. **Blood**, v. 117, n. 2, p. 381-392, 2011.

88. YADAVA, A. et al. Trafficking of *Plasmodium chabaudi adami*-infected erythrocytes within the mouse spleen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, n. 10, p. 4595-4599, 1996.

89. MEBIUS, R. E. et al. Development and function of the splenic marginal zone. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 24, n. 6, p. 449-464, 2004.

90. WAITE, J. C. et al. Dynamic imaging of the effector immune response to listeria infection *in vivo*. **PLoS Pathog.**, v. 7, n. 3, p. e1001326, 2011.

91. SPONAAS, A. M. et al. Migrating monocytes recruited to the spleen play an important role in control of blood stage malaria. **Blood**, v. 114, n. 27, p. 5522-

5531, 2009.

92. BELYAEV, N. N. et al. Induction of an IL7-R(+)c-Kit(hi) myelolymphoid progenitor critically dependent on IFN-gamma signaling during acute malaria. **Nat. Immunol.**, v. 11, n. 6, p. 477-485, 2010.

93. STEVENSON, M. M. et al. Antigen presentation and dendritic cell biology in malaria. **Parasite Immunol.**, v. 28, n. 1-2, p. 5-14, 2006.

94. BANCHEREAU, J. et al. Immunobiology of dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 18, p. 767-811, 2000.

95. DZIONEK, A. et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. **J. Immunol.**, v. 165, n. 11, p. 6037-6046, 2000.

96. KOHRGRUBER, N. et al. Survival, maturation, and function of CD11c- and CD11c+ peripheral blood dendritic cells are differentially regulated by cytokines. **J. Immunol.**, v. 163, n. 6, p. 3250-3259, 1999.

97. PATTERSON, S. et al. Subpopulations of peripheral blood dendritic cells show differential susceptibility to infection with a lymphotropic strain of HIV-1. **Immunol. Lett.**, v. 66, n. 1-3, p. 111-116, 1999.

98. HEUFLER, C. et al. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 26, n. 3, p. 659-668, 1996.

99. LUNDIE, R. J. (Ed.). Antigen presentation in immunity to murine malaria. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 23, n. 1, p. 119-123, 2011.

100. SPONAAS, A. M. et al. Malaria infection changes the ability of splenic dendritic cell populations to stimulate antigen-specific T cells. **J. Exp. Med.**, v. 203, n. 6, p. 1427-1433, 2006.

101. VOISINE, C. et al. Classical CD11c+ dendritic cells, not plasmacytoid dendritic cells, induce T cell responses to *Plasmodium chabaudi* malaria. **Int. J. Parasitol.**, v. 40, n. 6, p. 711-719, 2010.

102. MUXEL, S. M. et al. The spleen CD4+ T cell response to blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria develops in two phases characterized by different properties. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22434, 2011.

103. GUERMONPREZ, P. et al. Inflammatory Flt3I is essential to mobilize dendritic cells and for T cell responses during *Plasmodium* infection. **Nat. Med.**, v. 19, n. 6, p. 730-738, 2013.

104. URBAN, B. C. et al. Early interactions between blood-stage plasmodium parasites and the immune system. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 297, p. 25-70, 2005.

105. ING, R. et al. Interaction of mouse dendritic cells and malaria-infected erythrocytes: uptake, maturation, and antigen presentation. **J. Immunol.**, v. 176, n. 1, p. 441-450, 2006.

106. WYKES, M. N. et al. What really happens to dendritic cells during malaria? **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 6, n. 11, p. 864-870, 2008.

107. LEISEWITZ, A. L. et al. Response of the splenic dendritic cell population to malaria infection. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 7, p. 4233-4239, 2004.

108. DEWALICK, S. et al. Cutting edge: conventional dendritic cells are the critical APC required for the induction of experimental cerebral malaria. **J. Immunol.**, v. 178, n. 10, p. 6033-6037, 2007.

109. BANCHEREAU, J. et al. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245-252, 1998.

110. TADOKORO, C. E. et al. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells *in vivo*. **J. Exp. Med.**, v. 203, n. 3, p. 505-511, 2006.

111. BOISSONNAS, A. et al. Foxp3+ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes. **Immunity**, v. 32, n. 2, p. 266-278, 2010.

112. TANG, Q. et al. Imaging the function of regulatory T cells *in vivo*. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 18, n. 4, p. 496-502, 2006.

113. AOSHI, T. et al. Bacterial entry to the splenic white pulp initiates antigen presentation to CD8+ T cells. **Immunity**, v. 29, n. 3, p. 476-486, 2008.

114. CLAY, H. et al. Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death. **Immunity**, v. 29, n. 2, p. 283-294, 2008.

115. EGEN, J. G. et al. Macrophage and T cell dynamics during the development and disintegration of mycobacterial granulomas. **Immunity**, v. 28, n. 2, p. 271-284, 2008.

116. LANG, T. et al. Imaging *Leishmania* development in their host cells. **Trends Parasitol.**, v. 25, n. 10, p. 464-473, 2009.

117. GUEIRARD, P. et al. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 107, n. 43, p. 18640-18645, 2010.

118. AMINO, R. et al. Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis to the liver. **Cell Host Microbe**, v. 3, n. 2, p. 88-96, 2008.

119. THIBERGE, S. et al. *In vivo* imaging of malaria parasites in the murine liver. **Nat. Protoc.**, v. 2, n. 7, p. 1811-1818, 2007.

120. AMINO, R. et al. Imaging malaria sporozoites in the dermis of the mammalian host. **Nat. Protoc.**, v. 2, n. 7, p. 1705-1712, 2007.

121. AMINO, R. et al. Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. **Nat. Med.**, v. 12, n. 2, p. 220-224, 2006.

122. DA SILVA, H. B. et al. Early skin immunological disturbance after *Plasmodium*-infected mosquito bites. **Cell. Immunol.**, v. 277, n. 1-2, p. 22-32, 2012.

123. MARTIN-JAULAR, L. et al. Strain-specific spleen remodelling in *Plasmodium yoelii* infections in Balb/c mice facilitates adherence and spleen macrophage-clearance escape. **Cell. Microbiol.**, v. 13, n. 1, p. 109-122, 2011.

124. PODOBA, J. E. et al. CD4+ and CD8+ T lymphocytes both contribute to acquired immunity to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 1, p. 51-58, 1991.

125. GARCIA, C. R. et al. *Plasmodium* in the postgenomic era: new insights into the molecular cell biology of malaria parasites. **Int. Rev. Cell. Mol. Biol.**, v. 266, p. 85-156, 2008.

126. JIMENEZ-DÍAZ, M. B. et al. Quantitative measurement of *Plasmodium*infected erythrocytes in murine models of malaria by flow cytometry using bidimensional assessment of SYTO-16 fluorescence. **Cytometry A**, v. 75, p. 225-235, 2009.

127. FREITAS DO ROSÁRIO, A. P. 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.**, v. 181, p. 8344-8355, 2008.

128. ROTTMAN, M. et al. IFN-gamma mediates the rejection of haematopoietic stem cells in IFN-gammaR1-deficient hosts. **PLoS Med.**, v. 5, p. e26, 2008.

129. CHOMCZYNSKI, P. (Ed.). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**, v. 15, p. 532-534 e 536-537, 1993.

130. KOLE, L. et al. Synergistic effect of interferon-gamma and mannosylated liposome-incorporated doxorubicin in the therapy of experimental visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 180, p. 811-820, 1999.

131. HADJANTONAKIS, A. K. et al. Embryonic stem cells and mice expressing different GFP variants for multiple non-invasive reporter usage within a single animal. **BMC Biotechnol.**, v. 2, p. 11, 2002.

132. LINDQUIST, R. L. et al. Visualizing dendritic cell networks *in vivo*. **Nat. Immunol.**, v. 5, p. 1243-1250, 2004.

133. SPENCE, P. J. et al. Transformation of the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi*. **Nat. Protoc.**, v. 6, p. 553-561, 2011.

134. REECE, S. E. et al. Transformation of the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi* and generation of a stable fluorescent line PcGFPCON. **Malar. J.**, v. 7, p. 183, 2008.

135. CALDERON, B. et al. In CD4+ T-cell-induced diabetes, macrophages are the final effector cells that mediate islet beta-cell killing: studies from an acute model. **Am. J. Pathol.**, v. 169, p. 2137-2147, 2006.

136. VAN ROOIJEN, N. et al. "*In vivo*" depletion of macrophages by liposomemediated "suicide". **Methods Enzymol.**, v. 373, p. 3-16, 2003.

137. CHEESMAN, S. et al. A single parasite gene determines strain-specific protective immunity against malaria: the role of merozoite surface protein 1. **Int. J. Parasitol.**, v. 40, p. 951-961, 2010.

138. STEPHENS, R. et al. Effector memory Th1 CD4 T cells are maintained in a mouse model of chronic malaria. **PLoS Pathog.**, v. 6, p. e10011208, 2010.

139. HU, X. et al. Regulation of interferon and Toll-like receptor signaling during macrophage activation by opposing feedforward and feedback inhibition mechanisms. **Immunol. Rev.**, v. 226, p. 41-56, 2008.

140. SEIXAS, E. et al. The interaction between DC and *Plasmodium berghei/chabaudi-*infected erythrocytes in mice involves direct cell-to-cell contact, internalization and TLR. **Eur. J. Immunol.**, v. 39, p. 1850-1863, 2009.

141. CASTILLO-MENDEZ, S. I. et al. Characterization of the spleen B-cell compartment at the early and late blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria. **Scand. J. Immunol.**, v. 66, p. 309-319, 2007.

142. KRUCKEN, J. et al. Massive destruction of malaria-parasitized red blood cells despite spleen closure. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 6390-6398.

143. DA SILVA, H. B. et al. Intravital Imaging Shows a Key Role for Splenic DCs in Acute Malaria for CD4+ T Cell Activation and Parasite Clearance. **PLoS Pathog.**, em revisão, 2014.

144. GREENWALD, R. J. et al. The B7 family revisited. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 515-548, 2005.

145. VINUESA, C. G. et al. How T cells earn the folicular rite of passage. **Immunity**, v. 35, p. 671-680, 2011.

146. MA, C. S. et al. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. **J. Exp. Med.**, v. 209, p. 1241-1253, 2012.

147. BRUCE-CHWATT, L. J. (Ed.). A longitudinal longitudinal survey of natural malaria infection in a group of west african adults. I. **West. Afr. Med. J.**, v. 12, p. 141-173, 1963.

148. STRUTT, T. M. et al. Memory CD4+ T cells induce innate responses independently of pathogen. **Nat. Med.**, v. 16, p. 558-565, 2010.

149. PATTARADIOKRAT, S. et al. Linkage group selection: towards identifying genes controlling strain specific protective immunity in malaria. **PLoS One**, v. 2, p. e857, 2007.

150. STEPHENS, R. et al. The contribution of *Plasmodium chabaudi* to our understanding of malaria. **Trends Parasitol.**, v. 27, p. 274-283, 2012.

151. NAIK, R. S. et al. Glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*: molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis. **J. Exp. Med.**, v. 192, p. 1563-1576, 2000.

152. DOYLE, S. E. et al. Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. **J. Exp. Med.**, v. 199, p. 81-90, 2004.

153. DENG, T. et al. Toll-like receptor 3 activation differentially regulates phagocytosis of bacteria and apoptotic neutrophils by mouse peritoneal macrophages. **Immunol. Cell. Biol.**, v. 91, p. 52-59, 2013.

154. SERGHIDES, L. et al. CD36 and malaria: friends or foes? **Trends Parasitol.**, v. 19, p. 461-469, 2003.

155. STEVENSON, M. M. et al. Innate immunity to malaria. Nat. Rev. Immunol., v. 4, p. 169-180, 2004.

156. FAVORITE, G. O. et al. Effects produced by the intravenous injection in man of a toxic antigenic material derived from *Eberthella typhosa*: Clinical, hematological, chemical and serological studies. **J. Clin. Invest.**, v. 21, p. 589-599, 1942.

157. MILLER, S. I. et al. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, p. 36-46, 2005.

158. TAKEDA, K. et al. Toll-like receptors in innate immunity. **Int. Immunol.**, v. 17, p. 1-14, 2005.

159. GATTON, M. L. et al. Evaluation of the pyrogenic threshold for *Plasmodium falciparum* malaria in naive individuals. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 66, p. 467-473, 2002.

160. BOUTLIS, C. S. et al. Malaria tolerance — for whom the cell tolls? **Trends Parasitol.**, v. 22, p. 371-377, 2006.

161. FREITAS DO ROSÁRIO, A. P. et al. IL-27 promotes IL-10 production by effector Th1 CD4+ T cells: A critical mechanism for protection from severe immunopathology during malaria infection. **J. Immunol.**, v. 188, p. 1178-1190, 2012.

162. MCKINSTRY, K. K. et al. The potential of CD4 T-cell memory. **Immunology**, v. 130, p. 1-9, 2010.

163. TAYLOR, J. J. et al. CD4+ memory T cell survival. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 23, p. 319-323, 2011.

164. FRANKLIN, B. S. 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.**, v. 9, p. 881-890, 2007.

165. ENGWERDA, C. R. et al. The importance of spleen in malaria. **Trends Parasitol.**, v. 21, p. 75-80, 2005.

166. LANGHORNE, J. et al. Dendritic cells, pro-inflammatory responses, and antigen presentation in a rodent malaria infection. **Immunol. Rev.**, v. 201, p. 35-47, 2004.

167. VON DER WEID, T. et al. A dual role for B cells in *Plasmodium chabaudi* chabaudi (AS) infection? **Res. Immunol.**, v. 145, p. 412-419, 1994.

168. STEPHENS, R. et al. Malaria-specific transgenic CD4(+) T cells protect immunodeficient mice from lethal infection and demonstrate requirement for a protective threshold of antibody production for parasite clearance. **Blood**, v. 106, p. 1676-1684, 2005.

169. MOON, K. A. et al. Allergen-induced CD11b+ CD11c(int) CCR3+ macrophages in the lung promote eosinophilic airway inflammation in a mouse asthma model. **Int. Immunol.**, v. 19, p. 1371-1381, 2007.

170. BURT, B. M. et al. CD11c identifies a subset of murine liver natural killer cells that responds to adenoviral hepatitis. **J. Leukoc. Biol.**, v. 84, p. 1039-1046, 2008.

171. BENNETT, C. L. et al. DC ablation in mice: promises, pitfalls, and challenges. **Trends Immunol.**, v. 28, p. 525-531, 2007.

172. KURSAR, M. et al. Differential requirements for the chemokine receptor CCR7 in T cell activation during *Listeria monocytogenes* infection. J. Exp. Med., v. 201, p. 1447-1457, 2005.

173. ING, R. et al. Dendritic cell and NK cell reciprocal cross talk promotes

gamma interferon-dependent immunity to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection in mice. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 770-782, 2009.

174. ELIAS, R. M. et al. Role of CD28 in polyclonal and specific T and B cell responses required for protection against blood stage malaria. **J. Immunol.**, v. 174, n. 2, p. 790-799, 2005.

175. HELMBY, H. et al. Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 1485-1490, 2000.

176. DA SILVA, H. B. et al. IFN-γ-induced priming maintains long-term straintranscending immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria. **J. Immunol.**, v. 191, p. 5160-5169, 2013.

177. MEBIUS, R. E. et al. Structure and function of the spleen. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 5, p. 606-616, 2005.

178. KOPPEL, E. A. et al. Specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-related 1 (SIGNR1) expressed by marginal zone macrophages is essential for defense against pulmonary *Streptococcus pneumoniae* infection. **Eur. J. Immunol.**, v. 35, p. 2962-2969, 2005.

179. JUNT, T. et al. Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. **Nature**, v. 450, p. 110-114, 2007.

180. BATISTA, F. D. et al. The who, how and where of antigen presentation to B cells. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 9, p. 15-27, 2009.

181. MACKAY, F. et al. Cracking the BAFF source. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 9, p. 491-502, 2009.

182. CROTTY, S. et al. Follicular helper CD4 T cells (TFH). Annu. Rev. Immunol., v. 29, p. 621-663, 2011.

## ANEXOS

Anexo 1 – IFN-γ-induced priming maintains long-term straintranscending immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria

O Anexo 1 corresponde a um artigo publicado em 2013, no periódico *Journal of Immunology*.

DOI: 10.4049/jimmunol.1300462





This information is current as of October 18, 2013.

### IFN-γ–Induced Priming Maintains Long-Term Strain-Transcending Immunity against Blood-Stage *Plasmodium chabaudi* Malaria

Henrique Borges da Silva, Érika Machado de Salles, Raquel Hoffmann Panatieri, Silvia Beatriz Boscardin, Sérgio Marcelo Rodríguez-Málaga, José Maria Álvarez and Maria Regina D'Império Lima

*J Immunol* published online 16 October 2013 http://www.jimmunol.org/content/early/2013/10/16/jimmun ol.1300462

## Supplementary<br/>Materialhttp://www.jimmunol.org/content/suppl/2013/10/16/jimmunol.1300462.DC1.html

- **Subscriptions** Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at: http://jimmunol.org/subscriptions
  - **Permissions** Submit copyright permission requests at: http://www.aai.org/ji/copyright.html
  - **Email Alerts** Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at: http://jimmunol.org/cgi/alerts/etoc



### IFN-γ–Induced Priming Maintains Long-Term Strain-Transcending Immunity against Blood-Stage *Plasmodium chabaudi* Malaria

### Henrique Borges da Silva,\* Érika Machado de Salles,\* Raquel Hoffmann Panatieri,<sup>†</sup> Silvia Beatriz Boscardin,<sup>†</sup> Sérgio Marcelo Rodríguez-Málaga,\* José Maria Álvarez,\* and Maria Regina D'Império Lima\*

The mechanism by which protective immunity to *Plasmodium* is lost in the absence of continued exposure to this parasite has yet to be fully elucidated. It has been recently shown that IFN- $\gamma$  produced during human and murine acute malaria primes the immune response to TLR agonists. In this study, we investigated whether IFN- $\gamma$ -induced priming is important to maintain long-term protective immunity against *Plasmodium chabaudi* AS malaria. On day 60 postinfection, C57BL/6 mice still had chronic parasitemia and efficiently controlled homologous and heterologous (AJ strain) challenge. The spleens of chronic mice showed augmented numbers of effector/effector memory (T<sub>EM</sub>) CD4<sup>+</sup> cells, which is associated with increased levels of IFN- $\gamma$ -induced priming (i.e., high expression of IFN-inducible genes and TLR hyperresponsiveness). After parasite elimination, IFN- $\gamma$ -induced priming was no longer detected and protective immunity to heterologous challenge was mostly lost with >70% mortality. Spontaneously cured mice had high serum levels of parasite-specific IgG, but effector T/T<sub>EM</sub> cell numbers, parasite-driven CD4<sup>+</sup> T cell proliferation, and IFN- $\gamma$  production were similar to noninfected controls. Remarkably, the priming of cured mice with low doses of IFN- $\gamma$  rescued TLR hyperresponsiveness to parasites. Contribution of TLR signaling to the CD4<sup>+</sup> T cell responses in chronic mice was supported by data obtained in mice lacking the MyD88 adaptor. These results indicate that IFN- $\gamma$ -induced priming is required to maintain protective immunity against *P. chabaudi* and aid in establishing the molecular basis of strain-transcending immunity in human malaria. *The Journal of Immunology*, 2013, 191: 000–000.

alaria remains a major health issue, especially in the tropical and subtropical areas of the world. Despite efforts to develop vaccines and antimalarials, the *Plasmodium* species that cause malaria persist, with an increase in the incidence of the disease in endemic regions, spreading to areas where control or eradication had been achieved previously (1). Parasite resistance to antimalarial drugs, inefficiency of vector control policies, and absence of successful vaccination explain the failure to reduce the risks of infection. A complete understanding of the mechanisms underlying the acquisition of protective im-

The online version of this article contains supplemental material.

Copyright © 2013 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/13/\$16.00

munity is crucial to outline new strategies to eradicate malaria. For children living in holoendemic areas, naturally acquired immunity appears to be achieved after successive rounds of infection, protects against clinical manifestations of the disease in a strainspecific way, and does not elicit sterile protection against the parasite (2). In adults, acquired immunity can be achieved after a few rounds of infection and elicits strain-transcending, but still not sterile, clinical protection (3). In any case, protective immunity is usually lost in the absence of continued exposure to the parasites (4). This observation raises two important questions: What are the effector mechanisms of the immune system that are lost after removal of the residual parasitemia and why does this loss occur?

Mouse models of *Plasmodium* infection are widely used to investigate the protective immune response to malaria. Among them, Plasmodium chabaudi infection is a feasible model to study strain-specific and strain-transcending immunity because of the variety of well-characterized parasite clones and the similarities to the human disease caused by Plasmodium falciparum (5). Reinfection with homologous P. falciparum parasites in humans or P. chabaudi in mice results in significant parasite control, whereas limited protection to heterologous secondary infections has been observed in both cases (3, 6-8). A polymorphism in the merozoite surface protein-1 (MSP-1) gene mediates, to a large degree, strainspecific immunity in blood-stage P. chabaudi malaria (9, 10). This gene is also polymorphic among P. falciparum strains, possibly as a result of host immune selection pressure (11). In addition, as observed in P. falciparum infection (4), resistance to P. chabaudi malaria is optimized by an existing infection (12), particularly for strain-transcending immunity that is maintained by the low levels

<sup>\*</sup>Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 05508-000 São Paulo, Brazil; and <sup>†</sup>Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 05508-000 São Paulo, Brazil

Received for publication February 15, 2013. Accepted for publication September 16, 2013.

This work was supported by Grants 2011/24038-1, São Paulo Research Foundation (FAPESP), and 471869/2010-4, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil). H.B.d.S. received Ph.D. Fellowship 2009/08559-1, São Paulo Research Foundation (FAPESP).

Address correspondence and reprint requests to Dr. Henrique Borges da Silva and Dr. Maria Regina D'Império Lima, Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Avenida Professor Lineu Prestes, 1730, 05508-000 São Paulo, Brazil. E-mail addresses: henriborsilva@hotmail.com (H.B.d.S.) and relima@usp.br (M.R.D.L.)

Abbreviations used in this article: AMC, age-matched control; CD62L, L-selectin; DC, dendritic cell; iRBC, infected RBC; KO, knockout; MSP-1, merozoite surface protein-1; ODN, oligodeoxynucleotide; qPCR, quantitative PCR;  $T_E$ , effector T;  $T_{EM}$ , effector memory T;  $T_M$ , memory T.

of subpatent parasitemia encountered in chronic mice (13). On the basis of this finding, it has been suggested that sustained exposure to malarial Ags is required not only for the generation of memory and effector cells but also for their maintenance (14). In fact, the partial loss of protective immunity to homologous challenge observed after elimination of reminiscent parasitemia is related to a decline in the CD4<sup>+</sup> memory T ( $T_M$ ) cell response to parasites (15).

Although much is known about how innate immune recognition affects adaptive immune responses, the role of adaptive immune cells in shaping the innate immune system is largely unexplored. Dendritic cells (DCs) and macrophages are tightly regulated by cytokines to rapidly respond to infections and also to avoid the undesirable effects of excessive activation. The priming of DCs and macrophages by low concentrations of IFN-y is a potent mechanism by which the innate immune system is optimized, allowing an increased response to several extracellular stimuli, including TLR agonists (16, 17). IFN- $\gamma$ -induced priming does not actually activate cells but ensures rapid and strong responses to stimuli, which in excess can eventually cause deleterious consequences. The mechanisms underlying macrophage priming involves a complex network of IFN-inducible genes, whose understanding is still limited (18). Recently, it has been shown that the innate immune system is primed by IFN- $\gamma$  during acute *P. falciparum* and *P.* chabaudi infections and, in consequence, displays an enhanced response to TLR agonists (19), establishing a crucial role for this cytokine in immunity to malaria. However, the contribution of IFN- $\gamma$ -induced priming to the maintenance of acquired immunity to Plasmodium is still unclear. We wondered whether low levels of IFN- $\gamma$  produced by effector T (T<sub>E</sub>) cells and/or effector memory T (T<sub>EM</sub>) cells in response to chronic parasitemia in infected individuals could prime the innate immune system and, together with parasite-specific Ab, ensure strain-transcending immunity. To investigate this possibility, we evaluated the correlation between the spleen cell response to TLR agonists (LPS and CpG oligonucleotides) and protection against homologous (AS strain) and heterologous (AJ strain) challenge in C57BL/6 mice infected with P. chabaudi AS. Our data indicate that IFN-y-induced priming is required to maintain long-term strain-transcending protective immunity to P. chabaudi malaria, a process that optimizes TLR signaling and guarantees the generation/maintenance of  $T_{\mbox{\scriptsize E/EM}}$  cells.

#### **Materials and Methods**

#### Mice and parasites

Six- to 8-wk-old C57BL/6, RAG knockout (KO), and MyD88KO (with a C57BL/6 background) female mice (originally from The Jackson Laboratory) were bred under specific pathogen-free conditions at the Isogenic Mice Facility of the Instituto de Ciências Biomédicas at the Universidade de São Paulo. *P. chabaudi* (*PcAS* and *PcAJ* strains) was maintained as described elsewhere (20). Because the schizogonic cycle of these parasites depends on the host circadian rhythm (21), the mice were maintained under an inverted light/dark cycle for at least 15 d before infection to access the period adjacent to erythrocyte invasion.

#### Infections and clinical analysis

For the primary infections, the mice were inoculated i.p. with  $1 \times 10^{6}$  infected RBCs (iRBCs). The mice were challenged i.v. with  $1 \times 10^{8}$  iRBCs on days 60 and 200 postinfection (p.i.) and monitored daily to determine survival curves. To evaluate subpatent parasitemia, 100 µl blood from 60-, 200-, or 260-d infected mice were transferred i.v. into RAGKO mice. Parasitemias were quantified by microscopic examination of Giemsa-stained blood smears. Body weight, temperature, and hemoglobin concentration (Hemoglobin kit; Doles) also were assessed in the infected mice.

#### Ethics statement

All procedures were in accordance with the national regulations of the Conselho Nacional de Saúde and Colégio Brasileiro em Experimentação Animal, with respect to their ethical guidelines for mouse experimentation and welfare. The protocols were approved by the Comissão de Ética no Uso de Animais of the Instituto de Ciências Biomédicas at the Universidade de São Paulo (São Paulo, Brazil), with permit numbers 0019/2005 and 0036/2007.

#### Purification of mature iRBCs

Mature iRBCs were obtained from mice with 40–60% parasitemia and predominantly late trophozoites and schizonts. The pellets from 500 µl heparinized blood were resuspended in 1 ml PBS, pipetted over 5 ml 74% Percoll (GE Healthcare) and centrifuged ( $2500 \times g$ , acceleration/break of 5/0) for 30 min at room temperature. The top cell layers were collected and washed three times with complete RPMI 1640 medium (supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 50 µM 2-ME, 2 mM t-glutamine, and 1 mM sodium pyruvate). All supplements were purchased from Life Technologies. This purification technique yielded >95% of the purity of mature iRBCs.

#### In vivo erythrocyte reinvasion assay

Mice were infected i.v. with  $5 \times 10^8$  mature iRBCs. Blood samples were collected at 1 h intervals and stained with SYTO16 (Molecular Probes, Life Technologies) as described previously (22). Parasitemias were determined by flow cytometry (FACSCalibur; BD Biosciences) with FlowJo software (Tree Star) starting at 30 min p.i. (t<sub>0</sub>), when nearly all parasites were late trophozoites or schizonts. The reinvasion index was calculated as the ratio between the parasitemia percentages at the different time points and the t<sub>0</sub> values.

#### Parasite-specific ELISA

*Pc*AS-specific IgG1 and IgG2a serum levels were quantified by ELISA as described elsewhere (15). Briefly, 96-well flat-bottom microtest plates (Costar) were coated overnight (4°C) with a total *Pc*AS extract (10  $\mu$ g/ml). Plates were saturated with 1% BSA for 1 h. After washing, 100  $\mu$ l of the mouse serum samples (diluted from 1/50 to 1/12,800) were added and left for 2 h at room temperature. The assays were developed by adding a goat anti-mouse IgG1 or IgG2a peroxidase–conjugated Abs (Southern Biotechnology Associates) for 1 h. After washing, 100  $\mu$ l tetramethylbenzidine (Invitrogen Life Technologies) was added to each well, and 15 min later, the absorbance values were quantified using a Spectra Max 190 spectrophotometer (Molecular Devices) with a 650-nm wavelength filter. The Ab level in each serum sample is expressed as the reciprocal of the end-point titer, which we defined as the lowest dilution that equals the background OD.

#### Phenotypic analysis of spleen cells

Splenic cell suspensions were incubated in lysis buffer (40 mM NH<sub>4</sub>Cl and 4.2 mM Tris [pH 7.4]) for 5 min (4°C) to eliminate RBCs. The splenocytes  $(1 \times 10^{6})$  were stained using the appropriate combinations of FITC-, PE-, PE-Cy7-, PerCP-, or allophycocyanin-labeled mAbs. CD4<sup>+</sup> T cells were stained with mAbs against CD4 (H129.19 or GK1.5), CD27 (LG.3A10), CD44 (IM7), L-selectin (CD62L) (MEL-14), and CD127 (IL-7R $\alpha$ , SB/199). DCs, macrophages, monocytes, and neutrophils were stained with mAbs against CD11b (M1/70), CD11c (HL3), I-A<sup>b</sup> (AF6), F4/80 (BM8), Ly6C (AL-21), and Ly6G (1A8). All mAbs were purchased from BD Pharmingen with the exception of F4/80 mAb, which was purchased from eBioscience. The cells were analyzed by flow cytometry (FACSCanto; BD Biosciences) with FlowJo software.

#### CFSE proliferation assay

The proliferative CD4<sup>+</sup> T cell response to iRBCs was measured as described previously (15). Briefly,  $3 \times 10^7$  cells/ml (resuspended in PBS with 0.1% BSA) were incubated with CFSE (Molecular Probes) at a final concentration of 5  $\mu$ M for 20 min at 37°C. The cells ( $1 \times 10^6$ ) were then cultured in 96-well plates (Costar) with  $3 \times 10^6$  iRBCs, 10  $\mu$ g/ml of the recombinant 19-kDa fraction of MSP-1 from *PcAS* (MSP-1<sub>19</sub>, produced in our molecular biology facility) or medium alone for 72 h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After incubation, the cells were stained with an allophycocyanin-labeled mAb against CD4 and analyzed by flow cytometry (FACSCanto) with FlowJo software.

#### IFN- $\gamma$ detection

Splenocytes (10<sup>6</sup>) were cultured in 96-well plates (Costar) with  $3 \times 10^{6}$  iRBCs, 10 µg/ml MSP-1<sub>19</sub>, 1 µg/ml LPS (strain 0111:B4 from *Escherichia coli*; Sigma-Aldrich), 10 µg/ml CpG oligodeoxynucleotide (ODN) 1826 (Coley Pharmaceutical Group), or medium alone for 72 h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. IFN- $\gamma$  was quantified in the cell supernatants using the OptEIA IFN- $\gamma$  kit (BD Biosciences).

#### Anti–IFN-y treatment

Four doses (0.5 mg/mouse) of depleting mAbs against IFN- $\gamma$  (H22; eBioscience) or Armenian hamster IgG isotype control (eBioscience) were injected i.v. into C57BL/6 mice every 2 d starting 52 d p.i. This depletion strategy was based on a previous study (23).

#### DC purification

Spleen cells  $(1 \times 10^8)$  were incubated with anti-CD11c and anti-*Pan* DC microbeads (Miltenyi Biotec) diluted in PBS with 0.5% BSA and 2 mM EDTA (Invitrogen) for 30 min at 4°C. The cells were then sorted using LS columns (Midi MACS; Miltenyi Biotec). The positive fraction showed >90% CD11c<sup>+</sup>I-A<sup>b+</sup> cells.

#### Quantitative PCR for IFN-inducible genes

RNA was extracted from DCs  $(5 \times 10^6)$  with TRIzol (Invitrogen) (24) and quantified with a NanoDrop device (Eppendorf). cDNA was prepared with a High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). The quantitative PCR (qPCR) reactions were performed in an ABI 7500 Real-Time PCR device (Applied Biosystems) using the SyBR Green kit from Applied Biosystems. The expression of the stat3, irf7, ifnar, tlr2, tlr4, tlr9, md2, cd36, il1b, and  $\beta$ -actin genes was analyzed using the 2  $-\Delta\Delta$ threshold cycle algorithm. The primers used (stat3, 5'-GACCCGCCAA-CAAATTAAGA-3' [forward] and 5'-TCGTGGTAAACTGGACACCA-3' [reverse]; irf7, 5'-CCAGTTGATCCGCATAAGGT-3' [forward] and 5'-GAGCCCAGCATTTTCTCTTG-3' [reverse]; ifnar, 5'-GCCCTGCTGA-ATAAGACCAG-3' [forward] and 5'-GTGGGAAGCACACATGACAC-3 [reverse]; tlr2, 5'-TGCTTTCCTGCTGGAGATTT-3' [forward] and 5'-TGTAACGCAACAGCTTCAGG-3' [reverse]; tlr4, 5'-GCTTTCACCTC-TGCCTTCAC-3' [forward] and 5'-GAAACTGCCATGTTTGAGCA-3' [reverse]; tlr9, 5'-TTCCTGCCGCTGACTAATCT-3' [forward] and 5'-T-GAGGACACACGGGTATGAA-3' [reverse]; md2, 5'-CTCCATAGAGT-TGCCGAAGC-3' [forward] and 5'-GCGGTGAATGATGGTGAAAT-3' [reverse]; cd36, 5'-TCGGATCTGAAATCGACCTT-3' [forward] and 5'-CACAGGCTTTCCTTCTTTGC-3' [reverse]; illb, 5'-CAGGCAGGCAG-TATCACTCA-3' [forward] and 5'-TAATGGGAACGTCACACACC-3 [reverse]; and  $\beta$ -actin, 5'-CCTGAACCCTAAGGCCAAC-3' [forward] and 5'-GCCTGGATGGCTACGTACA-3' [reverse]) were designed using the Primer3 software (DOI: http://frodo.wi.mit.edu/primer3/) and purchased from Invitrogen.

#### IFN- $\gamma$ -induced priming

Four doses (15 ng/kg; 10,000 U/mouse) of rIFN- $\gamma$  (mouse rIFN- $\gamma$  expressed in *E. coli*; PeproTech) were injected i.v. into C57BL/6 mice every 2 d starting 192 d p.i. This IFN- $\gamma$  priming dose was established in a previous study (25).

#### Statistical analysis

Statistical significance was analyzed with Prism 5 software (GraphPad) using ANOVA and a Tukey's multiple comparison test or Student *t* test where appropriate. The existence of a normal distribution was confirmed using the Kolmogorov–Smirnov test. Differences were considered statistically significant at p < 0.05.

#### Results

## The clearance of residual parasitemia leads to partial loss in protective immunity to heterologous PcAJ parasites

The infection of C57BL/6 mice with *Pc*AS led to acute parasitemia and its subsequent control (Fig. 1A). After day 30 p.i., parasites were no longer detected in the blood smears, and subpatent parasitemia was assessed by blood transfer to RAGKO mice. Low levels of chronic parasitemia remained up to day 60 p.i., but parasites were not detected in the bloodstream on days 200 and 260 p.i. (Fig. 1B). To evaluate whether these mice maintained protective immunity to homologous and heterologous parasites, they were challenged i.v. with a high inoculum (1 × 10<sup>8</sup> iRBCs) of *Pc*AS or the lethal *Pc*AJ strain (10). Although mice on day 60 p.i. (mice<sub>60d</sub>) efficiently eliminated both parasite challenges and survived, mice on day 200 p.i. (mice<sub>200d</sub>) developed low parasitemias over the first 3 d following *Pc*AS reinfection and failed to control the growth of *Pc*AJ, resulting in >70% mortality (Fig. 1C, 1D and 1F, 1G). To evaluate whether long-term acquired immunity requires de novo activation of the immune system, we also analyzed the capacity of mice to inhibit the first round of erythrocyte invasion when challenged i.v. with purified late trophozoites and schizonts ( $5 \times 10^8$  iRBCs). For both *Pc*AS and *Pc*AJ, the generation of new ring forms was blocked in mice<sub>60d</sub> (Fig. 1E, 1H). In contrast, the efficiency of erythrocyte invasion by *Pc*AJ was similar in mice<sub>200d</sub> and naive controls. Because mice<sub>200d</sub> still retained the ability to inhibit erythrocyte invasion by *Pc*AS, we concluded that the clearance of chronic parasitemia is associated with the loss of immunological effector mechanisms that are particularly required for protection against heterologous *Pc*AJ parasites.

# The partial loss in protective immunity to heterologous PcAJ parasites may result from a reduction in $CD4^+$ $T_E/T_{EM}$ cell populations

The inactivation of the innate and/or acquired immune systems may account for the decline in protective immunity to heterologous PcAJ parasites following clearance of chronic parasitemia. Humoral immunity does not appear to be involved in the partial loss of protective immunity, because parasite-specific IgG1 and IgG2a serum titers were maintained or even increased on day 200 p.i. compared with day 60 p.i. (Fig. 2A). Therefore, we evaluated subsets of CD4<sup>+</sup> T cells from the spleens of these mice based on a recent study that defined  $CD4^+$   $T_E$  cells,  $CD4^+$   $T_{EM}$  cells, and CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> cells (26), as described in Supplemental Fig. 1. We found a significant increase in the CD4<sup>+</sup> T<sub>E</sub>/T<sub>EM</sub> cell numbers per spleen in mice<sub>60d</sub>, whereas these subsets had similar numbers per spleen in mice<sub>200d</sub> and the age-matched controls (AMCs); only  $T_{CM}$  cells were maintained at comparable numbers in mice<sub>60d</sub> and mice<sub>200d</sub> (Fig. 2B). Indeed, on day 60 p.i., most CD4<sup>+</sup> T<sub>M</sub> cells had an effector memory phenotype in which CD62L was expressed at low levels. The reduction of the  $CD4^+$   $T_{E/}T_{EM}$  cell populations observed after parasite elimination was accompanied by a loss of the ability of CD4+ T cells to proliferate and produce IFN- $\!\gamma$  in response to iRBCs and to proliferate in response to MSP-1<sub>19</sub> (Fig. 2C, 2D). The need for IFN- $\gamma$  to maintain the protection against heterologous parasites in chronic mice was investigated by treating mice<sub>60d</sub> with anti–IFN- $\gamma$  mAbs. A partial loss of the ability to control PcAJ challenge was observed in IFN-y-depleted mice<sub>d60</sub> when compared with mice<sub>d60</sub> who were treated with the isotype control (Fig. 2E). This effect was accompanied by a reduction in body temperature (Fig. 2F).

#### IFN- $\gamma$ -induced priming of the innate immune system subsides after the elimination of residual parasitemia

The impaired CD4<sup>+</sup> T cell response to iRBCs may not fully explain the partial loss of protective immunity to heterologous challenge observed after the elimination of chronic parasitemia. This is suggested by the fact that iRBC-stimulated CD4<sup>+</sup> T cells took a few days to secrete IFN- $\gamma$ , but chronic and cured mice differed in their ability to promptly inhibit the invasion of new erythrocytes (Fig. 1H). Therefore, we postulated that the clearance of residual parasitemia reduces the extent of IFN-y-induced priming, a potent mechanism by which the optimization of the innate immune system is achieved (17). Because the molecular pathways underlying IFN-y-induced priming involve the activation of TLRs and other IFN-inducible genes (18), we compared the expression of tlr2, tlr4, tlr9, md2, cd36, illb, stat3, irf7, and ifnar mRNAs in splenic DCs. This population is located in the red pulp of the spleen, where it is in direct contact with iRBCs, and also in the white pulp, contributing to both parasite clearance and T cell activation (27, 28). We observed a significant increase in the expression of these mRNAs in DCs from mice<sub>60d</sub>, with the exception of ifnar mRNA, whereas there was no difference between



**FIGURE 1.** Parasitemias and survival curves of C57BL/6 mice that were primarily infected with *Pc*AS and secondarily challenged on days 60 and 200 p.i. with *Pc*AS or *Pc*AJ. (**A**) Parasitemia curve for C57BL/6 mice infected i.p. with  $1 \times 10^6$  iRBCs. (**B**) Parasitemias for RAGKO mice transferred with 100 µl blood from C57BL/6 mice on days 60, 200, and 260 p.i. and monitored on days 7 and 14 after blood transfer. (**C**) Parasitemia curves for AMCs, mice<sub>60d</sub>, and mice<sub>200d</sub> challenged i.v. with  $1 \times 10^8$  *Pc*AS iRBCs. (**D**) Survival curves for mice described in (C). (**E**) Reinfection index for AMCs, mice<sub>60d</sub>, and mice<sub>200d</sub> challenged i.v. with  $5 \times 10^8$  *Pc*AS iRBCs (late trophozoites and schizonts). (**F**) Parasitemia curves for AMCs, mice<sub>60d</sub>, and mice<sub>200d</sub> challenged i.v. with  $1 \times 10^8$  *Pc*AS iRBCs (late trophozoites and schizonts). (**F**) Reinfection index for AMCs, mice<sub>60d</sub> and mice<sub>200d</sub> challenged i.v. with  $1 \times 10^8$  *Pc*AS iRBCs (late trophozoites and schizonts). (**F**) Reinfection index for AMCs, mice<sub>60d</sub> and mice<sub>200d</sub> challenged i.v. with  $1 \times 10^8$  *Pc*AS iRBCs (late trophozoites and schizonts). (**F**) Reinfection index for AMCs, mice<sub>60d</sub> and mice<sub>200d</sub> challenged i.v. with  $5 \times 10^8$  *Pc*AS iRBCs (late trophozoites and schizonts). (**F**) Reinfection index for AMCs, mice<sub>60d</sub> and mice<sub>200d</sub> challenged i.v. with  $5 \times 10^8$  *Pc*AS iRBCs (late trophozoites and schizonts). (**F**) Reinfection index for AMCs, mice<sub>60d</sub> and mice<sub>200d</sub> challenged i.v. with  $5 \times 10^8$  *Pc*AS iRBCs (late trophozoites and schizonts). (**F**) are sitemia curves for AMCs, mice<sub>60d</sub> and mice<sub>200d</sub> challenged i.v. with  $5 \times 10^8$  *Pc*AS iRBCs (late trophozoites and schizonts). (**F**) are sitemia curves for AMCs, mice<sub>60d</sub> and mice<sub>200d</sub> challenged i.v. with  $5 \times 10^8$  *Pc*AS iRBCs (late trophozoites and schizonts). (**A**–H) Data show the mean  $\pm$  SD (*n* = 4–6) of one representative experiment out of three. \**p* < 0.05, significant differences were analyzed between the indicated groups (C–H).

mice<sub>200d</sub> and the AMCs (Fig. 3A). Because the high expression of TLR mRNAs during acute PcAS malaria has been associated with augmented IFN- $\gamma$  production following stimulation with TLR agonists (19), we then analyzed the spleen cell response to TLR4 and TLR9 agonists (LPS and CpG, respectively). In fact, spleen cells from mice<sub>60d</sub> produced increased levels of IFN- $\gamma$  in response to LPS and CpG, whereas there was no significant response for mice<sub>200d</sub> and the AMCs (Fig. 3B).

# MyD88-mediated signaling is required for CD4<sup>+</sup> T cell responses and the IFN- $\gamma$ -induced priming of splenic DCs in chronic mice

Our previous results correlate the persistence of strain-transcending immunity to blood-stage *P. chabaudi* malaria with the maintenance of increased CD4<sup>+</sup> T<sub>E</sub>/T<sub>EM</sub> populations and TLR hyperresponsiveness. Thus, it is reasonable to speculate that TLR signaling contributes to generate and/or maintain CD4<sup>+</sup> T<sub>E</sub>/T<sub>EM</sub> cells and consequently to increase the IFN- $\gamma$ -induced priming of splenic DCs. In agreement with this hypothesis, mice lacking the TLR signaling MyD88 adaptor had higher chronic parasitemia than C57BL/6 mice (Fig. 4A). Despite the fact that similar numbers of CD4<sup>+</sup> T<sub>E</sub> cells were found in the spleens of C57BL/6 and MyD88KO mice<sub>60d</sub>, there was a reduction in the CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> cell population in the latter group (Fig. 4B). Accordingly, the CD4<sup>+</sup> T cell responses to parasites were impaired in MyD88KO mice<sub>60d</sub>, as shown by the diminished in vitro proliferation and IFN- $\gamma$  production following iRBC or MSP-1<sub>19</sub> stimulation (Fig. 4C, 4D). The absence of the MyD88 adaptor also led to reduced mRNA expression of the IFN-inducible genes *stat3*, *irf7*, and *ifnar* in splenic DCs (Fig. 4E), indicating that IFN- $\gamma$ -induced priming also was impaired. Thus, intact TLR signaling machinery appears to be crucial for maintaining CD4<sup>+</sup> T cell responses, which ultimately leads to IFN- $\gamma$ -induced priming and optimizes the control of chronic parasitemia.

## In vivo priming with IFN- $\gamma$ restores the protective immunity to heterologous PcAJ parasites in cured mice

Our previous results suggest that the elimination of chronic parasitemia leads to a reduction in the IFN- $\gamma$ -induced priming of the innate immune system and consequently to defective control of secondary infection, particularly with heterologous *Pc*AJ parasites. To investigate whether in vivo priming with IFN- $\gamma$  can restore the immune system activation status observed in the presence of residual parasitemia, starting on day 192 p.i., C57BL/6 mice were treated every 2 d with four suboptimal (priming) i.v. doses of rIFN- $\gamma$  (Fig. 5A), as established previously (25). To confirm that this treatment primes the innate immune system, spleen cells from IFN- $\gamma$ -primed mice<sub>200d</sub> produced significantly higher levels of IFN- $\gamma$  in response to LPS and CpG compared with unprimed mice<sub>200d</sub> (Fig. 5B). Accordingly, IFN- $\gamma$ -primed mice<sub>200d</sub>



**FIGURE 2.** Parasite-specific IgG, CD4<sup>+</sup> T cell subsets, CD4<sup>+</sup> T cell responses to iRBCs, and MSP-1<sub>19</sub> in chronic and cured C57BL/6 mice. Influence of IFN- $\gamma$  depletion in parasitemia and mouse temperature. C57BL/6 mice were analyzed on days 60 and 200 p.i. with 1 × 10<sup>6</sup> iRBCs in comparison with the AMCs. (**A**) Parasite-specific IgG1 and IgG2a serum titers, as determined by ELISA. (**B**) Numbers of CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>IL-7Ra<sup>+</sup>CD62L<sup>bi</sup>), and T<sub>E</sub> (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>IL-7Ra<sup>-</sup>CD62L<sup>lo</sup>) cells per spleen, as determined by flow cytometry. (**C**) Percentages of proliferating (CFSE<sup>low</sup>) CD4<sup>+</sup> T cells stimulated for 72 h with iRBCs (1 T cell/3 iRBCs) or MSP-1<sub>19</sub> (10 µg/ml), as determined by flow cytometry. (**D**) IFN- $\gamma$  concentrations in the supernatants of the cell cultures described in (C), as measured by ELISA. (**F**) Parasitemia curves for mice<sub>d60</sub> that were treated with anti–IFN- $\gamma$  mAbs or the isotype control, and subsequently challenged i.v. with 1 × 10<sup>8</sup> *Pc*AJ iRBCs. (**F**) Body temperatures in mice described in (E). (A–F) Data show the mean ± SD (*n* = 3–6) of one representative experiment out of three. \**p* < 0.05, significant differences were analyzed between anti–IFN- $\gamma$ –treated mice<sub>60d</sub> and control IgG-treated mice<sub>60d</sub> in (E) and (F). ND, Not detected.

showed an improved capacity to control a secondary infection with PcAS (Fig. 6A) and PcAJ (Fig. 5C). Moreover, in mice<sub>200d</sub> challenged with PcAJ, IFN- $\gamma$  treatment allowed 100% survival and attenuated the clinical manifestations of the disease (i.e., a reduction

in body temperature and blood hemoglobin concentration) (Fig. 5D–F). Other parameters, such as body weight and hepatic damage, were similar to the AMCs in both groups of challenged mice<sub>200d</sub> (data not shown). The IFN- $\gamma$ –primed AMCs presented with an in-



**FIGURE 3.** IFN-inducible gene expression and the IFN- $\gamma$  response to TLR agonists in chronic and cured C57BL/6 mice. C57BL/6 mice were analyzed on days 60 and 200 p.i. with  $1 \times 10^6$  iRBCs in comparison with AMCs. (**A**) Fold increase over control (0 d) samples of *stat3, ifnar, irf7, tlr2, tlr4, tlr9, md2, cd36,* and *il1b* mRNAs, as evaluated by qPCR in splenic DCs and analyzed by the  $2 -\Delta\Delta$  threshold cycle algorithm. (**B**) IFN- $\gamma$  concentrations measured by ELISA in supernatants from spleen cell cultures stimulated with LPS (10 µg/ml) or CpG ODN 1826 (10 µg/ml) for 72 h. Data show the mean  $\pm$  SD (*n* = 5–6) of one representative experiment out of three. \**p* < 0.05, significant differences were analyzed between mice<sub>60d</sub> and mice<sub>200d</sub> (**A**, **B**).



**FIGURE 4.** Parasitemias, CD4<sup>+</sup> T cell subsets, and CD4<sup>+</sup> T cell responses to iRBCs and MSP-1<sub>19</sub> and IFN-inducible gene expression in C57BL/6 and MyD88KO mice primarily infected with  $P_cAS$ . C57BL/6 and MyD88KO mice infected with  $1 \times 10^6$  iRBCs were analyzed in comparison with AMCs. (**A**) Parasitemia curves. (**B**) Numbers of CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> (CD3<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup>CD62L<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>), T<sub>EM</sub> (CD3<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup>CD62L<sup>lo</sup>) and T<sub>E</sub> (CD3<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>-</sup>CD62L<sup>lo</sup>) cells per spleen on day 60 p.i., as determined by flow cytometry. (**C**) Percentages of proliferating (CFSE<sup>low</sup>) CD4<sup>+</sup> T cells from the spleens of mice<sub>60d</sub> stimulated for 72 h with iRBCs (1 T cell/3 iRBCs) or MSP-1<sub>19</sub> (10 µg/ml), as determined by flow cytometry. (**D**) IFN- $\gamma$  concentrations measured by ELISA in the supernatants from the cell cultures described in (C). (**E**) Fold increase over control (0 d) samples of *stat3*, *irf7*, and *ifnar* mRNAs, as evaluated by qPCR and analyzed by the 2  $-\Delta\Delta$  threshold cycle algorithm. Data show the mean  $\pm$  SD (n = 4-6) of one representative experiment out of three. \*p < 0.05, significant differences were analyzed between the C57BL/6 and MyD88KO mice (A–E). ND, Not detected.

crease in spontaneous and LPS-stimulated IFN- $\gamma$  production (Fig. 6B), but these mice were not protected against primary infection with *PcAS* (Fig. 6C). These data indicate that IFN- $\gamma$ -induced priming restores strain-transcending immunity in mice that have been previously exposed to parasites.

## In vivo priming with IFN- $\gamma$ restores the CD4<sup>+</sup> T cell response to parasites in cured mice

The relevance of TLR signaling in the development of acquired immunity to *P. chabaudi* is suggested by our data showing that enhanced parasitemias in chronic MyD88KO mice are associated with low numbers of  $T_{EM}$  cells and reduced iRBC-driven CD4<sup>+</sup> T cell proliferation and IFN- $\gamma$  production. Because our previous results show that low doses of IFN- $\gamma$  restore both TLR hyper-responsiveness and strain-transcending immunity, we sought to investigate whether this treatment also improves CD4<sup>+</sup> T cell responses in mice<sub>200d</sub>. Our data show a decrease in CD62L expression in splenic CD4<sup>+</sup> T<sub>M</sub> cells from IFN- $\gamma$ -primed mice<sub>200d</sub>, indicating a shift from CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> cells to CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> cells (Fig. 7A). This shift resulted from an increase in the T<sub>EM</sub> cell population and a decrease in the T<sub>E</sub> cell population compared with unprimed mice<sub>200d</sub>, whereas the T<sub>E</sub> cell population was not modi-

fied (Fig. 7B). This effect was not associated with changes in the population dynamics of splenic phagocytes; IFN- $\gamma$ -primed mice<sub>200d</sub> and unprimed mice<sub>200d</sub> presented with similar numbers per spleen of DCs, red pulp F4/80<sup>+</sup> macrophages, inflammatory LyC6<sup>hi</sup> monocytes, and neutrophils (Supplemental Fig. 2). Furthermore, in vivo priming with IFN- $\gamma$  reestablished the CD4<sup>+</sup> T cell response to iRBCs and MSP-1<sub>19</sub> in terms of proliferation (Fig. 7C, 7D) and IFN- $\gamma$  production (Fig. 7E). The treatment of AMCs with IFN- $\gamma$  induced a slight increase in spontaneous CD4<sup>+</sup> T cell proliferation, but it had no effect on the CD4<sup>+</sup> T cell proliferation and IFN- $\gamma$  production in response to iRBCs (Supplemental Fig. 3). We conclude that IFN- $\gamma$ -induced priming restores the ability of CD4<sup>+</sup> T<sub>M</sub> cells to respond to parasites in mice that have already eliminated their chronic parasitemia.

#### Discussion

In this study, we took advantage of the experimental model of *P. chabaudi* infection to determine the reason why strain-transcending immunity against malaria is mostly lost in the absence of continued exposure to parasites. Our study confirms the notion that a decline in the  $CD4^+$  T<sub>M</sub> cell response to the parasite, but not in parasite-specific IgG, leads to failure to maintain long-term protective



**FIGURE 5.** TLR responsiveness, parasitemias, survival curves, and clinical manifestations of the disease in cured C57BL/6 mice primed with IFN- $\gamma$  and challenged with heterologous *PcAJ* parasites. Starting on day 192 p.i., C57BL/6 mice were treated every 2 d with four i.v. doses (15 ng/kg; 10,000 U/mouse) of rIFN- $\gamma$  and then challenged i.v. with 1 × 10<sup>8</sup> *PcAJ* iRBCs. IFN- $\gamma$ -primed mice were compared with unprimed mice and AMCs. (**A**) Experimental design. (**B**) IFN- $\gamma$  concentrations measured by ELISA in spleen cell supernatants of unchallenged mice stimulated with LPS (10 µg/ml) or CpG ODN 1826 (10 µg/ml) for 72 h. (**C**) Parasitemia curves. (**D**) Survival curves. (**E**) Mouse temperatures. (**F**) Hemoglobin concentrations. Data show the mean ± SD (*n* = 4–6) of one representative experiment out of three. \**p* < 0.05, significant differences were analyzed between IFN- $\gamma$ -primed and unprimed mice.

immunity to PcAS malaria (15). Furthermore, our results show that the immunological effector mechanism that ensures strain-

transcending immunity to *P. chabaudi* acts almost immediately after parasite challenge, inhibiting the first round of erythrocyte

**FIGURE 6.** Parasitemias and CD4<sup>+</sup> T cell responses in cured C57BL/6 mice and AMCs primed with IFN- $\gamma$ and challenged with homologous *Pc*AS parasites. Starting on day 192 p.i., C57BL/6 mice were treated every 2 d with four i.v. doses (15 ng/kg; 10,000 U/mouse) of rIFN- $\gamma$ . Noninfected AMCs were treated using the same protocol. IFN- $\gamma$ -primed mice were compared with unprimed mice. (**A**) Parasitemia curves for mice<sub>200d</sub> challenged i.v. with 1 × 10<sup>8</sup> *Pc*AS iRBCs. (**B**) LPSstimulated IFN- $\gamma$  production in noninfected AMCs. (**C**) Parasitemia curves for AMCs challenged i.p. with 1 × 10<sup>6</sup> *Pc*AS iRBCs. Data show the mean  $\pm$  SD (*n* = 4–6) of one representative experiment out of three. \**p* < 0.05, significant differences were analyzed between IFN- $\gamma$ -primed and unprimed mice (A–C).





**FIGURE 7.** CD4<sup>+</sup> T cell subsets and responses to iRBC and MSP-1<sub>19</sub> in cured C57BL/6 mice primed with IFN- $\gamma$ . Starting on day 192 p.i., C57BL/6 mice were treated every 2 d with four i.v. doses (15 ng/kg; 10,000 U/mouse) of rIFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$ -primed mice were analyzed on day 200 p.i. in comparison with unprimed mice and AMCs. (**A**) CD62L expression in splenic T<sub>M</sub> (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>IL-7R $\alpha^+$ ) cells, as determined by flow cytometry. (**B**) Numbers of CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>IL-7R $\alpha^+$ ) cells, as determined by flow cytometry. (**B**) Numbers of CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>IL-7R $\alpha^+$ ) cells, as determined by flow cytometry. (**B**) Numbers of CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>IL-7R $\alpha^+$ CD62L<sup>lo</sup>), and T<sub>E</sub> (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>IL-7R $\alpha^-$ CD62L<sup>lo</sup>) cells per spleen. (**C**) Representative histograms of CFSE staining of splenic CD4<sup>+</sup> T cells stimulated for 72 h with iRBCs (1 T cell/3 iRBCs), as obtained by flow cytometry. (**D**) Percentages of proliferating (CFSE<sup>low</sup>) CD4<sup>+</sup> T cells stimulated for 72 h with iRBCs (1 T cell/3 iRBCs) or MSP-1<sub>19</sub> (10 µg/ml), as determined by flow cytometry. (**E**) IFN- $\gamma$  concentrations measured by ELISA in the supernatants from the cell cultures described in (C). Data show the mean  $\pm$  SD (n = 5-6) of one representative experiment out of three. \*p < 0.05, significant differences were analyzed between IFN- $\gamma$ -primed and unprimed mice (**B**, D, E).

invasion prior to de novo T cell activation. Theoretically, CD4<sup>+</sup>  $T_M$  cells can activate the innate immune response via IFN- $\gamma$  or independent of this cytokine, as recently reported for influenza A virus infection (29). Our data corroborate the idea that persistence of the parasite maintains a pool of CD4<sup>+</sup>  $T_E/T_{EM}$  cells that is able to produce low levels of IFN- $\gamma$  (26). It also shows that the continuous priming of the innate immune system by IFN- $\gamma$ , a process that is evidenced in chronic mice by the increased expression of IFN-inducible genes in splenic DCs and TLR hyperresponsiveness in splenocytes, allows the control of the heterologous challenge and avoids the development of the clinical manifestations of the disease and consequent animal death. These results may explain why clinical and sterile immunity against malaria are likely to be excluding events.

The IFN- $\gamma$ -induced enhancement of TLR expression and function was previously shown during acute human and mouse malaria and was considered to be a booster for antimalarial responses when innate immunity plays a major role (19). This study reports a huge IFN- $\gamma$  response to TLR agonists by splenocytes 1 wk after *PcAS*  infection that subsides within 2 wk; the levels of IFN-y produced in the fourth week p.i. are comparable with those described in this study in chronic mice. These findings recapitulate the notion that the spleen  $CD4^+$  T cell response to *PcAS* malaria develops in two phases concomitantly with acute and chronic parasitemias, in which the early phase is intense and short lasting, rapidly providing large amounts of proinflammatory cytokines, and the late phase is characterized by small peaks of IFN- $\gamma$  production (30). Our data indicate that the continuity of IFN- $\gamma$ -induced priming of the innate immune system during the late infection is required to control heterologous parasites, against which humoral immunity is not optimized because of MSP-1 gene polymorphisms (9, 10). It is important to note that, in our study, in vivo priming with low doses of IFN-y protects against parasite challenge in only previously infected mice but not in naive mice, suggesting that cooperation with other immunological effector mechanisms, such as Ab against conserved epitopes in parasite Ags (5), is required to ensure strain-transcending immunity to P. chabaudi malaria.

The immunological effector mechanisms enhanced by IFN- $\gamma$ induced priming are vast, as indicated by the diversity of the IFNinducible genes that are highly expressed following macrophage treatment with low doses of IFN- $\gamma$  (17, 18). Our results that correlate the expression levels of tlr2, tlr4, tlr9, md2, and cd36 mRNAs in splenic DCs from chronic and cured mice with the ability to control heterologous challenge implicate these molecules in the maintenance of strain-transcending immunity to malaria. Considering the existence of several TLR ligands in Plasmodium, such as the GPI anchor, which is recognized by the TLR2/TLR1 complex with the contribution of TLR4 (31, 32), and parasite DNA, which is recognized by TLR9 (33), the long-lasting TLR hyperresponsiveness in chronic mice maintains the capacity of macrophages, DCs, and other TLR-bearing cells to recognize iRBCs and merozoites. In fact, it has been shown that DC activation not only requires direct cell-to-cell contact and internalization of iRBCs by DCs but also involves TLR4, TLR9, MyD88, and signaling via NF-KB (27). Moreover, TLR3 and TLR9 promote bacterial uptake by murine and human macrophages through the induction of a phagocytic gene program, which also is induced by TLR4 and TLR5 (34, 35). The class B scavenger receptor CD36, another molecule that shows enhanced mRNA expression in splenic DCs from chronic mice but not from cured mice, mediates the opsonin-independent phagocytosis of iRBCs by monocytes and DCs (36). The binding of iRBCs to these cells is thought to occur through the recognition of externalized phosphatidylserine or P. falciparum-encoded erythrocyte membrane protein 1 (37).

In contrast, the high expression of stat3 mRNA in splenic DCs from chronic mice indicates that IFN-y-induced priming of the innate immune system is a fine-tuned process that is regulated during the late infection by feedback inhibitory loops, such as those mediated by IL-10, STAT3, and suppressor of cytokine signaling 1 (18). It has been known for guite a long time that exposure to TLR agonists leads to the development of tolerance through a blockade of the corresponding signal transduction pathways (38-40). Tolerance almost certainly occurs in patients from holoendemic areas of malaria that do not exhibit the signs and symptoms of the disease despite the presence of blood parasites (41, 42). Likewise, body temperature and weight are normalized after the control of acute parasitemia in PcAS-infected mice (5). In agreement with the concept that stimulatory and regulatory molecular pathways coexist during PcAS malaria, CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> cells coexpressing IFN-y and IL-10 have a major role in both protection and the control of the clinical manifestations of the disease (43).

Another important feature of IFN-y-induced priming observed in this study is its effect on the CD4<sup>+</sup> T<sub>M</sub> cell subsets of cured mice, leading to a shift from CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> cells to CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> cells and restoring the proliferative and/or IFN- $\gamma$  responses to iRBCs and TLR agonists. The need for cognate Ag recognition for the maintenance and survival of CD4<sup>+</sup> T<sub>M</sub> cells has been discussed recently for malaria (14) as well as for other diseases (44, 45). It is possible that the persistence of parasite Ags maintains parasitespecific CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> cells in cured mice; IFN-γ-induced priming shifts this population to CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> cells that promptly respond to iRBCs and TLR agonists. Alternatively, the IFN-y-induced priming may rescue cross-reactive CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> cells that are driven by Ags from other microbes, as proposed in a model for development of severe P. falciparum malaria in nonimmune adults (46). Despite that both mechanisms can contribute to restore the CD4<sup>+</sup> T<sub>M</sub> cell responses following the IFN-y treatment, the CD4<sup>+</sup> T cell proliferation and IFN- $\gamma$  production in response to iRBCs are considerably improved in cured mice but not in AMCs. This finding supports the idea that parasite-specific CD4<sup>+</sup> T<sub>M</sub> cells are main participants in the proliferative and IFN-y responses that are restored by treating cured mice with IFN- $\gamma$ . A further indication of the parasite-specific nature of these CD4<sup>+</sup> T cells is that IFN- $\gamma$ treatment also increases the proliferative response to MSP-1<sub>19</sub> in cured mice. The exact mechanism by which IFN- $\gamma$  maintains CD4<sup>+</sup> T<sub>M</sub> cells in an effector–memory state is still not well understood. We hypothesize that the reestablishment of the CD4<sup>+</sup> T<sub>M</sub> cell response to iRBCs is, at least in part, an indirect effect of the IFN- $\gamma$ -induced TLR hyperresponsiveness of DCs. This possibility is supported by our data from MyD88KO mice indicating that TLR signaling also contributes to maintaining the CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> cell responses during chronic infection, which ultimately leads to IFN- $\gamma$ -induced priming and helps to control the reminiscent parasitemia. This increased chronic parasitemia in MyD88KO mice did not cause animal death in our study, as reported previously (26, 47).

Altogether, our study shows that sustained IFN- $\gamma$ -induced priming of the innate immune system is required to maintain host surveillance and consequently strain-transcending immunity to blood-stage P. chabaudi malaria. It also suggests that the loss of protection in spontaneously cured mice results from the interruption of a positive cycle in which continuous exposure to parasites maintains the pool of CD4<sup>+</sup> T<sub>E</sub>/T<sub>EM</sub> cells that are able to produce priming doses of IFN- $\gamma$  and IFN- $\gamma$ -induced priming of the innate immune system contributes to sustain the  $CD4^+ T_E/T_{EM}$  cell responses to the parasites. These results may help to explain why the immunity against *Plasmodium* is rapidly lost when the parasites are eliminated from the hosts, providing a molecular basis for strain-transcending immunity in human malaria. The knowledge that IFN-y-induced priming of the innate immune system contributes to maintain straintranscending immunity may have important implications in developing and boosting immunization strategies against malaria.

#### Acknowledgments

We thank Rogério Silva do Nascimento, Jéssica Cristina de Souza Carvalho, Mariana Franchi, Maria Áurea de Alvarenga, and Danilo Moreira for technical assistance.

#### Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

#### References

- World Health Organization. 2011. World Malaria Report. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Hafalla, J. C., O. Silvie, and K. Matuschewski. 2011. Cell biology and immunology of malaria. *Immunol. Rev.* 240: 297–316.
- Doolan, D. L., C. Dobaño, and J. K. Baird. 2009. Acquired immunity to malaria. Clin. Microbiol. Rev. 22: 13–36.
- Douradinha, B., and D. L. Doolan. 2011. Harnessing immune responses against *Plasmodium* for rational vaccine design. *Trends Parasitol*. 27: 274–283.
- Stephens, R., R. L. Culleton, and T. J. Lamb. 2012. The contribution of *Plasmodium chabaudi* to our understanding of malaria. *Trends Parasitol.* 28: 73–82.
- Jarra, W., and K. N. Brown. 1985. 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.* 7: 595–606.
- Cheesman, S., A. Raza, and R. Carter. 2006. Mixed strain infections and strainspecific protective immunity in the rodent malaria parasite Plasmodium chabaudi chabaudi in mice. *Infect. Immun.* 74: 2996–3001.
- McKenzie, F. E., D. L. Smith, W. P. O'Meara, and E. M. Riley. 2008. Strain theory of malaria: the first 50 years. *Adv. Parasitol.* 66: 1–46.
- Pattaradilokrat, S., S. J. Cheesman, and R. Carter. 2007. Linkage group selection: towards identifying genes controlling strain specific protective immunity in malaria. *PLoS One* 2: e857.
- Cheesman, S., E. O'Mahony, S. Pattaradilokrat, K. Degnan, S. Knott, and R. Carter. 2010. A single parasite gene determines strain-specific protective immunity against malaria: the role of the merozoite surface protein I. *Int. J. Parasitol.* 40: 951–961.
- Hughes, A. L. 1992. Positive selection and interallelic recombination at the merozoite surface antigen-1 (MSA-1) locus of *Plasmodium falciparum. Mol. Biol. Evol.* 9: 381–393.

- Achtman, A. H., R. Stephens, E. T. Cadman, V. Harrison, and J. Langhorne. 2007. Malaria-specific antibody responses and parasite persistence after infection of mice with *Plasmodium chabaudi chabaudi. Parasite Immunol.* 29: 435– 444
- Elliott, S. R., R. D. Kuns, and M. F. Good. 2005. Heterologous immunity in the absence of variant-specific antibodies after exposure to subpatent infection with blood-stage malaria. *Infect. Immun.* 73: 2478–2485.
- Langhorne, J., F. M. Ndungu, A. M. Sponaas, and K. Marsh. 2008. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat. Immunol.* 9: 725–732.
- Freitas do Rosário, A. P., S. M. Muxel, S. M. Rodríguez-Málaga, L. R. Sardinha, C. A. Zago, S. I. Castillo-Méndez, J. M. Álvarez, and M. R. D'Império Lima. 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: 8344–8355.
- Snijders, A., P. Kalinski, C. M. Hilkens, and M. L. Kapsenberg. 1998. High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *Int. Immunol.* 10: 1593–1598.
- Schroder, K., M. J. Sweet, and D. A. Hume. 2006. Signal integration between IFNγ and TLR signaling pathways in macrophages. *Immunobiology* 211: 511– 524.
- Hu, X., S. D. Chakravarty, and L. B. Ivashkiv. 2008. Regulation of interferon and Toll-like receptor signaling during macrophage activation by opposing feedforward and feedback inhibition mechanisms. *Immunol. Rev.* 226: 41–56.
- Franklin, B. S., P. Parroche, M. A. Ataíde, F. Lauw, C. Ropert, R. B. de Oliveira, D. Pereira, M. S. Tada, P. Nogueira, L. H. da Silva, et al. 2009. Malaria primes the innate immune response due to interferon-γ induced enhancement of Tolllike receptor expression and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 5789– 5794.
- Podoba, J. E., and M. M. Stevenson. 1991. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes both contribute to acquired immunity to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS. *In-fect. Immun.* 59: 51–58.
- Garcia, C. R., M. F. de Azevedo, G. Wunderlich, A. Budu, J. A. Young, and L. Bannister. 2008. *Plasmodium* in the postgenomic era: new insights into the molecular cell biology of malaria parasites. *Int Rev Cell Mol Biol* 266: 85–156.
- Jiménez-Díaz, M. B., T. Mulet, V. Gómez, S. Viera, A. Alvarez, H. Garuti, Y. Vázquez, A. Fernández, J. Ibáñez, M. Jiménez, et al. 2009. Quantitative measurement of *Plasmodium*-infected erythrocytes in murine models of malaria by flow cytometry using bidimensional assessment of SYTO-16 fluorescence. *Cytometry A* 75: 225–235.
- Rottman, M., C. Soudais, G. Vogt, L. Renia, J. F. Emile, H. Decaluwe, J. L. Gaillard, and J. L. Casanova. 2008. IFN-γ mediates the rejection of haematopoietic stem cells in IFN-γR1-deficient hosts. *PLoS Med.* 5: e26.
- Chomczynski, P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15: 532– 534, 536–537.
- Kole, L., L. Das, and P. K. Das. 1999. Synergistic effect of interferon-γ and mannosylated liposome-incorporated doxorubicin in the therapy of experimental visceral leishmaniasis. J. Infect. Dis. 180: 811–820.
- Stephens, R., and J. Langhorne. 2010. Effector memory Th1 CD4 T cells are maintained in a mouse model of chronic malaria. *PLoS Pathog.* 6: e1001208.
- Seixas, E., J. F. Moura Nunes, I. Matos, and A. Coutinho. 2009. The interaction between DC and *Plasmodium bergheilchabaudi*-infected erythrocytes in mice involves direct cell-to-cell contact, internalization and TLR. *Eur. J. Immunol.* 39: 1850–1863.
- Voisine, C., B. Mastelic, A. M. Sponaas, and J. Langhorne. 2010. Classical CD11c<sup>+</sup> dendritic cells, not plasmacytoid dendritic cells, induce T cell responses to *Plasmodium chabaudi* malaria. *Int. J. Parasitol.* 40: 711–719.
- Strutt, T. M., K. K. McKinstry, J. P. Dibble, C. Winchell, Y. Kuang, J. D. Curtis, G. Huston, R. W. Dutton, and S. L. Swain. 2010. Memory CD4<sup>+</sup> T cells induce innate responses independently of pathogen. *Nat. Med.* 16: 558–564, 1p, 564.

- 30. Muxel, S. M., A. P. Freitas do Rosário, C. A. Zago, S. I. Castillo-Méndez, L. R. Sardinha, S. M. Rodriguez-Málaga, N. O. Câmara, J. M. Álvarez, and M. R. Lima. 2011. The spleen CD4<sup>+</sup> T cell response to blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria develops in two phases characterized by different properties. *PLoS One* 6: e22434.
- 31. Naik, R. S., O. H. Branch, A. S. Woods, M. Vijaykumar, D. J. Perkins, B. L. Nahlen, A. A. Lal, R. J. Cotter, C. E. Costello, C. F. Ockenhouse, et al. 2000. Glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*: molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis. *J. Exp. Med.* 192: 1563–1576.
- 32. Krishnegowda, G., A. M. Hajjar, J. Z. Zhu, E. J. Douglass, S. Uematsu, S. Akira, A. S. Woods, and D. C. Gowda. 2005. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J. Biol. Chem.* 280: 8606–8616.
- 33. Parroche, P., F. N. Lauw, N. Goutagny, E. Latz, B. G. Monks, A. Visintin, K. A. Halmen, M. Lamphier, M. Olivier, D. C. Bartholomeu, et al. 2007. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 1919–1924.
- 34. Doyle, S. E., R. M. O'Connell, G. A. Miranda, S. A. Vaidya, E. K. Chow, P. T. Liu, S. Suzuki, N. Suzuki, R. L. Modlin, W. C. Yeh, et al. 2004. Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. *J. Exp. Med.* 199: 81– 90.
- Deng, T., X. Feng, P. Liu, K. Yan, Y. Chen, and D. Han. 2013. Toll-like receptor 3 activation differentially regulates phagocytosis of bacteria and apoptotic neutrophils by mouse peritoneal macrophages. *Immunol. Cell Biol.* 91: 52–59.
- Serghides, L., T. G. Smith, S. N. Patel, and K. C. Kain. 2003. CD36 and malaria: friends or foes? *Trends Parasitol.* 19: 461–469.
- Stevenson, M. M., and E. M. Riley. 2004. Innate immunity to malaria. Nat. Rev. Immunol. 4: 169–180.
- Favorite, G. O., and H. R. Morgan. 1942. Effects produced by the intravenous injection in man of a toxic antigenic material derived from *Eberthella typhosa*: clinical, hematological, chemical and serological tudies. J. Clin. Invest. 21: 589– 599.
- Miller, S. I., R. K. Ernst, and M. W. Bader. 2005. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 36–46.
- Takeda, K., and S. Akira. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. Int. Immunol. 17: 1–14.
- Gatton, M. L., and Q. Cheng. 2002. Evaluation of the pyrogenic threshold for *Plasmodium falciparum* malaria in naive individuals. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66: 467–473.
- Boutlis, C. S., T. W. Yeo, and N. M. Anstey. 2006. Malaria tolerance—for whom the cell tolls? *Trends Parasitol*. 22: 371–377.
- 43. Freitas do Rosário, A. P., T. Lamb, P. Spence, R. Stephens, A. Lang, A. Roers, W. Muller, A. O'Garra, and J. Langhorne. 2012. IL-27 promotes IL-10 production by effector Th1 CD4<sup>+</sup> T cells: a critical mechanism for protection from severe immunopathology during malaria infection. J. Immunol. 188: 1178–1190.
- McKinstry, K. K., T. M. Strutt, and S. L. Swain. 2010. The potential of CD4 T-cell memory. *Immunology* 130: 1–9.
- Taylor, J. J., and M. K. Jenkins. 2011. CD4<sup>+</sup> memory T cell survival. Curr. Opin. Immunol. 23: 319–323.
- Artavanis-Tsakonas, K., J. E. Tongren, and E. M. Riley. 2003. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin. Exp. Immunol.* 133: 145–152.
- 47. Franklin, B. S., S. O. Rodrigues, L. R. Antonelli, R. V. Oliveira, A. M. Gonçalves, P. A. Sales-Junior, E. P. Valente, J. I. Alvarez-Leite, C. Ropert, D. T. Golenbock, and R. T. Gazzinelli. 2007. MyD88-dependent activation of dendritic cells and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes mediates symptoms, but is not required for the immunological control of parasites during rodent malaria. *Microbes Infect.* 9: 881–890.

### Anexo 2 – Outros artigos publicados durante o Doutorado

O Anexo 2 corresponde à lista do restante dos artigos científicos publicados durante o Doutorado.

1. MOREIRA, V. ; TEIXEIRA, C. ; **Borges da Silva, H.** ; D'IMPÉRIO LIMA, M. R. ; DOS-SANTOS, M. C. . The crucial role of the MyD88 adaptor protein in the inflammatory response induced by Bothrops atrox venom. Toxicon (Oxford), p. 37-46, 2013. **DOI: 10.1016/j.toxicon.2013.02.010** 

2. **SILVA, H.B.**; AMARAL, E. P.; NOLASCO, E.; VICTO, N. C.; ATIQUE, R.; JANK, C. C.; ANSCHAU, V.; ZERBINI, L. F.; CORREA, R. G. . Dissecting Major Signaling Pathways throughout the Development of Prostate Cancer. Prostate Cancer, v. 2013, p. 1-23, 2013. **DOI: 10.1155/2013/920612** 

3. KOYAMA, F. ; CARVALHO, T. L. G. ; ALVES, E. ; **da Silva, Henrique Borges** ; AZEVEDO, M. F. ; HEMERLY, A. S. ; GARCIA, C. R. S. . The Structurally Related Auxin and Melatonin Tryptophan-Derivatives and their Roles in Arabidopsis thaliana and in the Human Malaria Parasite Plasmodium falciparum. The Journal of Eukaryotic Microbiology, p. n/a-n/a, 2013. **DOI: 10.1111/jeu.12080** 

4. MEDEIROS, M. M. ; **Borges da Silva, H.** ; BARBOZA, R. ; REIS, A. S. ; THOMPSON, J. ; D'IMPÉRIO LIMA, M. R. ; MARINHO, C. R. F. ; TADOKORO, C. E. . Liver Accumulation of Plasmodium chabaudi-Infected Red Blood Cells and Modulation of Regulatory T Cell and Dendritic Cell Responses. Plos One, v. 8, p. e81409, 2013. **DOI: 10.1371/journal.pone.0081409** 

5. SILVA, H.B.; CAETANO, S.; MONTEIRO, I.; CONDE, I. G.; HANSON, K.; PENHA-GONCALVES, C.; OLIVIERI, D.; MOTA, M. M.; MARINHO, C. R. F.; D'IMPÉRIO LIMA, M. R.; TADOKORO, C. E. . Early skin immunological disturbance after Plasmodium-infected mosquito bites. Cellular Immunology (Print), v. 277, p. 22-32, 2012. DOI: 10.1016/j.cellimm.2012.06.003

6. Moreira, Vanessa ; Dos-Santos, Maria Cristina ; Nascimento, Neide Galvà o ; da Silva, Henrique Borges ; Fernandes, Cristina Maria ; D'Impà rio Lima, Maria Regina ; Teixeira, Catarina . Local inflammatory events induced by Bothrops atrox snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. Toxicon (Oxford), v. 60, p. 12-20, 2012. DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.03.004