GENOILSON DE BRITO ALVES

**Efeitos das Moléculas Ativadoras e Inibidoras Presentes em Células T CD4⁺
Convencionais e Reguladoras na Modulação da Resposta Imune Durante a
Fase Aguda da Malária pelo *Plasmodium chabaudi* AS**

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

São Paulo
2013

GENOILSON DE BRITO ALVES

Efeitos das Moléculas Ativadoras e Inibidoras Presentes em Células T CD4+ Convencionais e Reguladoras na Modulação da Resposta Imune Durante a Fase Aguda da Malária pelo *Plasmodium chabaudi* AS

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

Área de concentração: Imunologia

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

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2013

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

© reprodução total

Alves, Genoilson de Brito.

Efeito das moléculas ativadores e inibidoras presentes em células T CD4⁺ convencionais e reguladoras na modulação da resposta imune durante a fase aguda da malária pelo *Plasmodium chabaudi* AS / Genoilson de Brito Alves. -- São Paulo, 2013.

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

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Estudo dos mecanismos envolvidos na ativação policlonal na resposta imune específica induzidas pelo *Plasmodium chabaudi*.

Versão do título para o inglês: Effects of activating and inhibitory molecules present in conventional and regulatory CD4⁺ T cells on the modulation of the immune response during the acute phase of malaria by *Plasmodium chabaudi* AS.

1. Malária 2. *Plasmodium chabaudi* 3. FoxP3 4. Células T CD4⁺
5. Regulação I. Lima, Profa. Dra. Maria Regina D'Império
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB081/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Genoilson de Brito Alves.

Título da Dissertação: Efeito das moléculas ativadores e inibidoras presentes em células T CD4+ convencionais e reguladoras na modulação da resposta imune durante a fase aguda da malária pelo *Plasmodium chabaudi* AS.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **020** nas fls. **100** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Maria Regina D`Império Lima**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "*Papel da IL-2 na estimulação e regulação de linfócitos T CD4+ durante a infecção pelo plasmodium chabaudi*" do qual participam o(s) alunos **Genoilson de Brito Alves**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **06.04.2011**, com validade de **3 anos**.

São Paulo, 11 de abril de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

RESUMO

ALVES, G. B. Efeitos das Moléculas Ativadoras e Inibidoras Presentes em Células T CD4⁺ Convencionais e Reguladoras na Modulação da Resposta Imune Durante a Fase Aguda da Malária pelo *Plasmodium chabaudi* AS. [dissertação (mestrado em imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

A malária está entre as doenças mais prevalentes no mundo, acometendo aproximadamente 500 milhões de indivíduos por ano. Sabe-se que a resposta pró-inflamatória proporciona o controle da parasitemia, mas também desencadeia as manifestações clínicas que estão diretamente relacionadas aos casos fatais da doença. A utilização de modelos experimentais contribui para o conhecimento dos mecanismos intrínsecos relacionados à imunidade do hospedeiro. As análises em camundongos infectados com 10⁶ eritrócitos parasitados pelo *Plasmodium chabaudi* AS mostram que, na fase aguda da malária, ocorre intensa proliferação com parasitemia detectável no dia 4 pós-infecção (p.i.), sendo o pico atingido no dia 7 p.i. e o declínio até o dia 10 p.i.. Acompanhando a cinética do parasita, observa-se o aumento no número de esplenócitos totais. A ativação do sistema imune caracteriza-se pelo perfil de resposta T_H1, com expansão da população de linfócitos T CD4⁺ convencionais e linfócitos T CD4⁺ Foxp3⁺ reguladores (T_{reg}) e produção predominante de IFN-γ. Nesse estudo, avaliamos em camundongos infectados com *P. chabaudi* AS: 1) O perfil de expressão das moléculas com papel fundamental na resposta imune nas células T CD4⁺ convencionais e T_{reg}; 2) Os efeitos decorrentes da inibição *in vitro* das moléculas ICOS e OX40 presentes em ambas as populações celulares na resposta proliferativa a eritrócitos parasitados; 3) A atividade supressora das células T_{reg}, sobre as células T CD4⁺ convencionais. Os resultados mostram que a partir do dia 4 p.i. ocorreu aumento na porcentagem de células T CD4⁺ convencionais e T_{reg}, que expressavam as moléculas estimuladoras GITR, OX40 e ICOS. Observamos também que houve correlação entre a maior expressão da molécula CD25 com o aumento das outras moléculas ativadoras presentes nas células T CD4⁺ convencionais, o mesmo não sendo tão acentuado nas células T_{reg}. Ao inibirmos a ação das moléculas ICOS e OX40, observamos que a inibição de ICOS interferiu de forma mais intensa na proliferação da população de células T_{reg}, enquanto a inibição da molécula OX40 reduziu drasticamente a proliferação das células T CD4⁺ convencionais e T_{reg}. Os ensaios de supressão indicaram que as células T_{reg} ICOS⁺ são mais eficientes para controlar a proliferação das células T CD4⁺ convencionais. Além disso, observamos que, no baço dos camundongos infectados pelo *P. chabaudi*, ocorreu aumento na porcentagem de células T CD4⁺ convencionais que expressavam PD-1 e PD-L1. No entanto, nas células T_{reg}, detectamos diminuição na expressão de PD-1 e aumento de PD-L1, fornecendo indícios sobre o mecanismo que pode estar envolvido no controle do número de células na fase aguda da infecção. Observamos ainda que, durante a expansão das células T CD4⁺, não houve modificações na porcentagem de células expressando a molécula CTLA-4 ou no nível de expressão desta molécula nos diferentes dias de

infecção. Considerando os dados em conjunto, podemos concluir que a modulação da resposta imune à malária causada pelo *P. chabaudi* requer a ação de várias moléculas ativadoras e reguladoras, que muitas vezes são expressas de forma concomitante. A expressão orquestrada de cada uma dessas moléculas permite o desenvolvimento das várias etapas da resposta imune na malária.

Palavras-chave: Malária. *Plasmodium chabaudi*. Foxp3. Células T CD4⁺. Regulação.

ABSTRACT

ALVES, G. B. Effects of Activating and Inhibitory Molecules Present in Conventional and Regulatory CD4⁺ T Cells on the Modulation of the Immune Response During the Acute Phase of Malaria by *Plasmodium chabaudi* AS. [Master's Thesis (immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2013.

Malaria is among the most prevalent diseases in the world, affecting approximately 500 million people per year. It is known that the pro-inflammatory response provides the control of parasitemia, but also triggers the clinical manifestations that are directly related to the fatal cases of the disease. The analyzes in mice infected with 10⁶ erythrocytes parasitized with *Plasmodium chabaudi* AS show that, in the acute phase of malaria, there is an intense proliferation with detectable parasitemia on day 4 post-infection (p.i.), being the peak attained at day 7 p.i. and the decline until day 10 p.i.. Following the kinetics of the parasite, there is an increase in the total number of splenocytes. The activation of the immune system is characterized by a Th1 profile, with expansion of the populations of conventional CD4⁺ T cells and CD4⁺Foxp3⁺ regulatory (T_{reg}) T cells and predominant production of IFN-γ. In this study, we evaluated in mice infected with *P. chabaudi* AS: 1) The expression profile of molecules with key roles in the immune responses of conventional CD4⁺ T cells and T_{reg} cells; 2) The effects of *in vitro* inhibition of ICOS and OX40 molecules in the proliferative responses both cell populations that were stimulated with parasitized erythrocytes; 3) The suppressive activity of T_{reg} cells on the conventional CD4⁺ T cells. The results showed that, from day 4 p.i. on, there was an increase in the percentages of conventional CD4⁺ T cells and T_{reg} cells that expressed stimulatory GITR, OX40 and ICOS molecules. We also observed a correlation between the higher expression of CD25 with the increase of other activation molecules that were present in conventional CD4⁺ T cells, a phenomenon less pronounced in T_{reg} cells. By inhibiting the activity of ICOS and OX40 molecules, we observed that ICOS inhibition interfered more intensely in the proliferation of the T_{reg} cell population, while the inhibition of OX40 dramatically reduced the proliferation of conventional CD4⁺ T cells and T_{reg} cells. The suppression assays indicated that ICOS⁺ T_{reg} cells were more effective to control the proliferation of conventional CD4⁺ T cells. Furthermore, we observed that, in the spleen of *P. chabaudi*-infected mice, there was an increase in the percentage of conventional CD4⁺ T cells expressing PD-1 and PD-L1. However, in T_{reg} cells, we detected a reduction in the expression of PD-1 and increase of PD-L1, providing evidence about the mechanism that may be involved in the control of cell numbers in the acute phase of infection. We also observed that, during the expansion of CD4⁺ T cells, there was no change in the percentage of cells expressing CTLA-4 or the level of expression of this molecule on the various days of infection. Considering the data together, we concluded that the modulation of the immune response to malaria caused by *P. chabaudi* requires the action of several activating and regulatory molecules, which are often expressed concomitantly. The

orchestrated expression of each of these molecules allows the development of the various stages of the immune response to malaria.

Keywords: Malaria. *Plasmodium chabaudi*. Foxp3. CD4+ T cells. Regulation.

Não é só uma dedicatória, este trabalho também é de vocês...

À minha amiga e esposa **Patrícia C. C. Amado** que indiretamente viveu comigo cada etapa deste mestrado, sempre me ofertando sua compreensão e apoio, me encorajando e apontando uma direção harmoniosa. Obrigado por me emprestar seus olhos, ouvidos e coração, por confiar em mim e compartilhar comigo seu conhecimento, seus dias e tudo que ainda há de vir.

À minha filha **Carolina** que veio para nós no início deste mestrado, enchendo nossas vidas de alegria, nos ensinando um amor incondicional. Agora na etapa final deste mestrado, Deus nos confiou mais um grande presente a **Fernanda**, irmãzinha da Carol que está a caminho, renovando nossas vidas e perspectivas, também a ela é dedicado este trabalho.

Aos meus pais **Manoel** e **Maria** pela presença, confiança e apoio, também nesta etapa da minha vida. Aos meus irmãos **Lucas**, pela sua amizade e atenção e **Ailton** pelo interesse e acompanhamento mesmo à distância.

Aos meus sogros **José** e **Célia**, que sempre estiveram disponíveis, apoiando e ajudando durante toda esta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** que com grande complacência possibilitou a realização deste sonho, durante 7 anos de espera. Ele preparou tudo, para que este sonho fosse possível... agradeço a querida **MTA** por toda condução e carinho incondicional.

Agradeço as famílias que estiveram unidas a minha, dando suporte, socorro e alegria. Apoiando-nos e contribuindo para o bom andamento deste trabalho. Encorajando com seus exemplos de vida e carinho. Muito obrigado! **José e Célia; José e Cida; Manoel e Maria, José Carlos e Pâmela.**

A minha orientadora Prof^a. Dra. **Maria Regina D'Império Lima**, pela orientação e ensino durante todo o processo de execução deste trabalho. Pela confiança e pela oportunidade única que me concedeu sem que eu tivesse como retribuir, seu gesto já mudou minha vida e refletirá positivamente no meu futuro e como consequência no futuro de minha família. Muito obrigado!!!

Agradeço ao professor Dr. **José Maria Alvarez Mosig** pela contribuição neste trabalho, pelas conversas e pela convivência durante todo este período.

Ao pessoal do laboratório de malária e de chagas: **Letícia, Eduardo, Érika, Sheyla, Henrique, Alexandra, Fernanda, Maria, Flávia, Christian, Beatriz, Giovana, Rafael, Raissa, Ana Paula** e aos técnicos, **Rogério, Mariana, Israel, Jéssica e Áurea**. Obrigado pelo companheirismo, pelas vivências de laboratório e durante as disciplinas, por todo apoio e aprendizado no dia-a-dia, por estarem sempre dispostos a ajudar. Agradeço especialmente ao **Eduardo** pela preocupação e apoio durante momentos difíceis, pela sua contribuição profissional e pela sua irmandade incalculável.

Aos professores do departamento de Imunologia que contribuíram com um conhecimento impar, forjando de certa forma um espírito investigativo e ousado, muito obrigado. Em especial ao Prof. Dr. **João Gustavo P. A. Mendes** e ao Prof. Dr. **Niels O. S. Câmara** pelos exemplos e prontidão. E a minha banca de qualificação: Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron; Dr. Renato Barboza e Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara, pelos apontamentos e conhecimentos a este dirigido.

Agradeço a Dra. **Silvia Massironi** e aos funcionários do biotério, pela disponibilidade e ajuda durante todo o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço a todos os **funcionários** do departamento de Imunologia e da biblioteca do ICB, pelo apoio institucional em diversos momentos.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia das Parasitoses do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, com o auxílio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), bolsa processo número 133300/2012-9.

*“Um médico mal instruído pode matar o corpo,
um professor mal instruído pode matar a alma”*

Willian Osler

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição mundial da transmissão de malária	19
Figura 2 - Ciclo biológico do <i>Plasmodium falciparum</i>	21
Figura 3 - Cinética da resposta imune em modelo murino contra o <i>P. chabaudi</i>	25
Figura 4 - Cinética da parasitemia e do número de células totais, T CD4 ⁺ convencionais e T _{reg} no baço durante a fase aguda da malária pelo <i>P. chabaudi</i>	42
Figura 5 - Determinação das populações de células T _{reg} e T CD4 ⁺ convencionais	43
Figura 6 - Tamanho das células T CD4 ⁺ convencionais e T _{reg} nos diferentes dias de infecção ao <i>P. chabaudi</i>	44
Figura 7 - Expressão das moléculas OX40, CD25, GITR e ICOS em células T CD4 ⁺ convencionais na fase inicial da malária causada pelo <i>P. chabaudi</i>	45
Figura 8 - Expressão das moléculas OX40, CD25, GITR e ICOS em células T _{reg} na fase inicial da malária causada pelo <i>P. chabaudi</i>	47
Figura 9 - Comparação entre a expressão das moléculas OX40, GITR, CD25 e ICOS nas populações de células T _{reg} (Tr) e T CD4 ⁺ convencionais (Tc)	49
Figura 10 - Coexpressão de moléculas estimuladoras em células T CD4 ⁺ convencionais nos dias 0, 4 e 5 p.i., com <i>P. chabaudi</i>	51
Figura 11 - Expressão simultânea das moléculas CD25, GITR, OX40 e ICOS pelas células T CD4 ⁺ convencionais	52
Figura 12 - Coexpressão de moléculas estimuladoras nas células T _{reg} nos dias 0, 4 e 5 p.i., pelo <i>P. chabaudi</i>	53
Figura 13 - Expressão simultânea das moléculas CD25, GITR, OX40 e ICOS pelas células T _{reg}	55
Figura 14 - Correlação entre a expressão de CD25 com as moléculas Foxp3, GITR, OX40 e ICOS nas células T CD4 ⁺ convencionais, nos dias 0, 4 e 5 de infecção	57
Figura 15 - Correlação entre a expressão de CD25 com a expressão das moléculas Foxp3, GITR, OX40 e ICOS nas células T _{reg} , nos dias 0, 4 e 5 de infecção	58

Figura 16 - Expressão das moléculas estimuladoras GITR, OX40 e ICOS em células T CD4 ⁺ convencionais e T _{reg} nos dias 0, 7 e 14 p.i.	60
Figura 17 - Expressão das moléculas inibidoras PD-1, PD-L1 e CTLA-4 em células T CD4 ⁺ convencionais durante a resposta de fase aguda ao <i>P. chabaudi</i>	61
Figura 18 - Expressão das moléculas inibidoras PD-1, PD-L1 e CTLA-4 nas células T _{reg} durante a resposta de fase aguda ao <i>P. chabaudi</i>	63
Figura 19 - Análise da expressão e coexpressão das moléculas inibidoras PD-1, PD-L1 nas células T CD4 ⁺ convencionais nos dia 0, 7 e 14 p.i. com o <i>P. chabaudi</i>	64
Figura 20 - Análise da expressão e coexpressão das moléculas inibidoras PD-1, PD-L1 nas células T _{reg} nos dia 0, 7 e 14 p.i. com o <i>P. chabaudi</i>	65
Figura 21 - Proliferação de células T CD4 ⁺ convencionais e T _{reg} com marcação intracelular para proliferação, com e sem inibição das moléculas ICOS e OX40.....	68
Figura 22 - Ensaio de proliferação das células T _{reg} mediado por células ICOS ⁺ e ICOS ⁻ marcadas com CellTrace Violet.....	70
Figura 23 - Quantificação de INF- γ após ensaio de inibição da proliferação pelas células T _{reg} ICOS ⁺ e ICOS ⁻	71
Figura 24 - Cinética das moléculas ativadoras e inibidoras presente em células T CD4 ⁺ convencionais e T _{reg}	72

LISTA DE ABREVIATURAS

α - anti (utilizado para se referir a anticorpos)

APC - do inglês, *Antigen Presenting Cell* (Célula apresentadora de antígeno)

CD – do inglês *Cluster of Differentiation* (Grupos de Diferenciação)

CTLA-4 - do inglês *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*

DC - do inglês *Dendritic Cell* (Célula Dendrítica)

d.i. – dia pós infecção

ELISA - do inglês *Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay* (Ensaio Imunoenzimático)

EP - Eritrócitos Parasitados

FACS – do inglês *Fluorescence-Activated Cell Sorter* (Ensaio de citometria de fluxo)

Foxp3 - do inglês *Forkhead box P3*

FSC – Forward Side Scatter

GFP – do inglês *Green Fluorescent Protein*

GPI - glicosilfosfatidilinositol

i.p. - Intraperitoneal

ICAM-1 - do inglês *Inter-cellular Adhesion Molecule 1*

IFN- γ - *Interferon-gamma*

Ig - Imunoglobulina

IL - Interleucina

T_{reg}I – Células T reguladoras induzidas

LAG-3 – do inglês *Lymphocyte-activation gene 3*

mAb – do inglês *Monoclonal Antibody* (Anticorpo monoclonal)

MFI – do inglês *Mean Fluorescence Intensity* (Média da Intensidade de Fluorescência)

MHC – do inglês *Major Histocompatibility Complex* (Complexo Principal de Histocompatibilidade)

MyD88 - do inglês *Myeloid Differentiation primary response gene 88*

NK - célula Natural Killer

NO – do inglês *Nitric Oxide* (Óxido Nítrico)

PBS – do inglês *Phosphate Buffered Saline* (Salina tamponada com fosfato)

PD-1 – do inglês *Programmed Death – 1*

PD-L1 – do inglês *Programmed Death – Ligant 1*

PECAM-1 - do inglês *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*

PI3K - do inglês *Phosphoinositide 3-Kinase*

RPMI - Meio McCoy de cultura modificado

RT-PCR - **do inglês** *Real Time Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real)

SFB - Soro fetal Bovino SPF – do inglês *Specific Pathogen-free*

TCR - do inglês *T Cell Receptor* (Receptor da célula T)

TGF- β - do inglês *Transforming Growth Factor- β*

T_h – do inglês *T helper* (T auxiliar)

TLR – do inglês *Toll-like Receptor* (Receptores tipo Toll)

TNF – do inglês *Tumoral Necrosis Factor*

T_{reg} – Células T reguladoras

VCAM-1 - do inglês *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*

WHO – do inglês *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

WT – do inglês *Wild Type* (tipo selvagem)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Malária	19
1.2 Infecção e ciclo do parasita	20
1.3 Aspectos principais da resposta imune ao <i>Plasmodium</i> no homem	22
1.4 Resposta Imune ao <i>Plasmodium chabaudi</i>	24
1.5 Fisiologia das células T reguladoras	27
1.6 Mecanismos de ação das células T reguladoras através das moléculas estimuladoras GITR, ICOS e OX40	29
1.6.1 Expressão da molécula GITR	30
1.6.2 Expressão da molécula ICOS	31
1.6.3 Expressão da molécula OX40	32
1.7 Mecanismos de ação das células T CD4 ⁺ convencionais e T _{reg} através das moléculas inibidoras CTLA-4, PD-1 e PD-L1	33
1.7.1 Expressão da molécula CTLA-4	34
1.7.2 Expressão das moléculas PD-1 e PD-L1	35
2 OBJETIVOS	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Camundongos, parasita e parasitemia	38
3.2 Obtenção e processamento dos esplenócitos	38
3.3 Marcação celular e citometria de fluxo	38
3.4 Ensaios de proliferação	39
3.5 Separação celular por citometria de fluxo e ensaio de inibição da proliferação	39
3.6 Produção de IFN- γ no sobrenadante de cultivo	39
3.7 Análise estatística	40
4 RESULTADOS	41
4.1 Cinética das populações de células T _{reg} e T CD4 ⁺ convencionais	41
4.2 Determinação do perfil de expressão de moléculas estimuladoras presentes nas células T _{reg} e células T CD4 ⁺ convencionais	42
4.3 Caracterização da coexpressão de moléculas estimuladoras na população de células T CD4 ⁺ convencionais durante a infecção pelo <i>P. chabaudi</i>	50

4.4 Caracterização da coexpressão das moléculas estimuladoras na população de células T _{reg} durante a infecção ao <i>P. chabaudi</i>	53
4.5 Correlação entre a expressão da molécula CD25 e a expressão das moléculas GITR, OX40 e ICOS	56
4.6 Expressão das moléculas estimuladoras durante o pico de parasitemia e após seu declínio	59
4.7 Determinação do perfil da expressão de moléculas inibidoras presentes nas células T CD4 ⁺ convencionais e células T _{reg}	61
4.8 Expressão de PD-1 e PD-L1 nos dias 0, 7 e 14 de infecção.....	63
4.9 Análise <i>in vitro</i> da proliferação de esplenócitos	66
4.10 Separação de células T _{reg} ICOS ⁺ e ICOS ⁻ e ensaio de inibição da proliferação de células T CD4 ⁺ convencionais	68
5 DISCUSSÃO	73
6 CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS.....	80

1. INTRODUÇÃO

1.1 Malária

A malária está entre as doenças infecciosas mais prevalentes no mundo acometendo cerca de 5% - 10% da população mundial com aproximadamente 300 milhões de casos anuais, (figura 1) (Fact sheets n°94 December 2012 World Health Organization). Dos casos registrados, em média 600 mil desenvolvem a forma mais severa de malária culminando em óbito. Casos fatais incidem principalmente em crianças africanas, atingindo a marca de um milhão de ocorrências (Garcia, 2010).

Figura 1 - Distribuição mundial da transmissão de malária.

Dados referentes a áreas endêmicas de malária segundo a Organização Mundial de Saúde.
Fonte: Adaptado de World Health Organization (2012).

A transmissão da doença ocorre através da picada da fêmea do mosquito *Anopheles* infectada por protozoários do gênero *Plasmodium*. Estudos indicam que existem cerca de 20 espécies diferentes de *Anopheles* ao redor do mundo, exercendo importância relevante para os casos de malária.

A malária humana é causada por cinco espécies diferentes de protozoários do gênero *Plasmodium*: o *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*. O *P. falciparum*, a espécie responsável pela forma mais severa de malária, geralmente está confinado a regiões tropicais, sendo endêmico em muitas áreas da África subsaariana. O *P. vivax* é a espécie mais amplamente disseminada através dos trópicos, zonas subtropicais e zonas temperadas com forte prevalência na Ásia e América do Sul, sendo responsável por 80% das infecções (Garcia, 2010). Estes parasitas causam febre aguda, mas raramente estão relacionados aos casos fatais. O *P. malariae* e *P. ovale* são menos frequentes e apresentam pouca morbidade. *P. knowlesi* usualmente infecta primatas, sendo emergente na espécie humana, mas, já foram relatados casos fatais decorrente desta espécie (Cox-Singh et al., 2008). As formas de trofozoíto, esquizonte e o estágio de gametócitos do *P. Knowlesi* são morfologicamente indistinguíveis do *P. malariae* nas análises microscópicas, podendo dificultar a sua identificação.

1.2 Infecção e Ciclo do Parasita

O ciclo do *Plasmodium* ocorre em dois hospedeiros distintos: no artrópode *Anopheles* e em mamíferos como os humanos. A fêmea de *Anopheles* é hematófaga e quando está infectada com estes parasitas inocula os esporozoítos na circulação do hospedeiro através da picada. Inicialmente, ocorre o tropismo para o fígado onde há intensa multiplicação e diferenciação para merozoítos (Stevenson, Riley, 2004). Os merozoítos eclodem dos hepatócitos infectados através de vesículas denominadas merossomos, que auxilia o escape do parasito à fagocitose pelas células de kupffer (Sturm et al., 2006), e se dirigem para circulação, iniciando o ciclo eritrocítico (figura 2). No ciclo eritrocítico, os merozoítos invadem os eritrócitos e se reproduzem de forma assexuada, assumindo morfologia variada. No sangue de indivíduos infectados com *P. falciparum* observam-se os vários estágios de desenvolvimento do parasita, como forma de anel (0-24 horas), trofozoíto (24-36 horas) e esquizonte (40-48 horas) (Maier et al., 2009). Esse processo gera em torno de 16-32 células filhas por unidade em aproximadamente 48 horas. A ruptura dos eritrócitos pelos esquizontes é acompanhada dos sintomas típicos da malária como

a febre, dor de cabeça e náusea, que parecem ser em grande parte derivados da produção de citocinas pró-inflamatórias secretadas pelas células do sistema imune inato (Stevenson e Riley, 2004).

Figura 2 - Ciclo biológico do *Plasmodium falciparum*.

Após a picada os esporozoítos invadem os hepatócitos e se diferenciam em merozoítos que ao eclodirem, invadem a circulação sanguínea e penetram nos eritrócitos, podendo aderir ao endotélio cerebral causando a forma mais grave de malária, em caso de gestantes pode ocorrer o sequestro pela placenta. Na fase eritrocítica os merozoítos realizam o estágio assexuado, com as formas de anel e esquizonte. Grande parte dos merozoítos desenvolve-se em gametócitos que é a forma capaz de se multiplicar dentro do *Anopheles*. Fonte: Adaptado de Schofield, Grau (2005).

Após a invasão dos eritrócitos, uma pequena parcela dos merozoítos se diferenciam em gametócitos. Estes gametócitos masculinos e femininos são ingeridos pelos mosquitos *Anopheles* durante o repasto sanguíneo, onde ocorre fusão dos gametas e através de esquizogonia a formação de oocistos contendo novos esporozoítos (Hafalla et al., 2011), realizando assim o ciclo sexuado do parasita. Os esporozoítos migram do intestino para as glândulas salivares do mosquito para iniciar um novo ciclo (Garcia, 2010).

1.3 Aspectos principais da resposta imune ao *Plasmodium* no homem

A resposta imune desencadeada na malária pode ser dirigida a diversas etapas desenvolvidas durante o ciclo do parasita. A resposta pode se desenvolver contra os esporozoítos que infectam os hepatócitos, caracterizando a fase pré-eritrocítica da patologia, aos merozoítos que participam na fase eritrocítica da infecção (McCall e Sauerwein, 2010) e aos eritrócitos parasitados (EP). A resposta direcionada aos hepatócitos infectados é realizada em grande parte pelas células T CD8⁺ efectoras (CD do inglês: *Cluster Differentiation*), mas há ativação também de células T CD4⁺ (Tsuji e Zavala, 2003). As citocinas são moléculas secretadas por diversas células imunes, com capacidade de induzir ativação e/ou inibição da célula alvo, contribuindo para o desenvolvimento da resposta imunológica.

Na resposta desenvolvida para fase pré-eritrocítica, ocorre a produção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-12 (IL-12), interferon- γ (IFN- γ) e mediadores como o óxido nítrico (NO, do inglês: *Nitric Oxide*) (Hafalla et al., 2006). A produção de citocinas pró-inflamatórias é primeiramente induzida pelas âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) do parasita. O GPI é uma glicoproteína conservada constitutiva na membrana de vários eucariotos (Zhu et al., 2011) e induz a ativação de células dendríticas, células B e macrófagos via TLR (do inglês: *Toll-like Receptor*)-1/TLR-2 e TLR-4 (Krishnegowda et al., 2005). Os TLRs foram descritos inicialmente em estudos relacionados à diferenciação celular na embriologia da *drosophila* (mosca de fruta), e posteriormente foi descoberto que os TLRs estavam envolvidos em repostas contra fungos (Lemaitre et al., 1996). Com relação a malária pode ainda ocorrer a ativação de células dendríticas pela via do TLR-9, através da interação com o DNA do parasita associado com a hemozoína (Coban et al., 2005) o que ainda não é definitivo. A hemozoína é um cristal insolúvel formado a partir do fagossoma e pode inibir a ação dos macrófagos, modulando mecanismos de supressão como a produção de IL-10.

Os EP ou os produtos gerados pelo parasita interagem com os TLRs e podem associar-se com receptores de adesão à superfície como VCAM-1 (do inglês: *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*), ICAM-1 (do inglês: *Inter-cellular Adhesion Molecule 1*), E-selectina, PECAM-1 (do inglês: *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*) e CD36 (Schwenk e Richie, 2011). Estas moléculas são positivamente

reguladas por citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α do inglês: *Tumor Necrosis Factor- α*). Grande parte dos efeitos maléficos observados nas infecções por malária, á exemplo do *P. falciparum*, parece ser relacionado com a aderência do EP nas células endoteliais e a grande produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α (Barnwell et al., 1989), IL-1 β e IL-6 (Day et al., 1999). Análises de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR do inglês: *Real Time Polymerase Chain Reaction*) do cérebro de pacientes com óbito decorrente de malária cerebral indicaram altos níveis locais de TNF- α e IL-1 β (Brown et al., 1999).

Foi demonstrado que a proteína de membrana 1 do *P. falciparum* (PfEMP-1 do inglês: *P. falciparum membrane protein-1*), está presente na superfície dos eritrócitos parasitados e medeia a interação com endotélio vascular (D'Ombra et al., 2007). A ocorrência de citoaderência para microvascularização da pele, músculos e outros tecidos auxilia na evasão do *P. falciparum* à fagocitose, impedindo sua eliminação no baço (Serghides et al., 2003). A citoaderência é a principal causa de severidade nas complicações decorrentes da malária cerebral.

Com base na literatura, no momento o mais promissor antígeno para o desenvolvimento de vacinas é a proteína do circunsporozoíto CSP (Sarr et al., 2012), que confere ao parasita a habilidades de invasão aos hepatócitos (Vaughan, Kappe, 2012). Verificou-se que inoculando extrato da forma esquizonte do *P. falciparum* ou proteínas CSP em humanos, ocorre indução de resposta humoral com aumento de imunoglobulinas (Ig) do isotipo IgG1 e IgG3. Foi demonstrado também que os níveis de IgG1 e IgG3 de crianças infectadas pelo *P. falciparum* estão aumentados quando comparados com o soro de crianças não infectadas (Sarr et al., 2012), e que nas áreas onde as crianças eram frequentemente expostas à infecção, os níveis de IgG1 eram significativamente menores.

As citocinas pró-inflamatórias são fundamentais no controle da parasitemia, mas, também resultam na piora do quadro clínico do hospedeiro. Por isso, é importante à ação de mecanismos para controlar a intensidade da resposta e modular o padrão de citocinas restaurando a homeostase. Citocinas anti-inflamatórias, como o fator de crescimento e transformação (TGF- β do inglês: *transforming growth factor- β*) e a IL-10, podem ser reguladas positivamente durante a infecção. As células T Foxp3⁺ (do inglês: *forkhead box P3*) podem diminuir a

intensidade da resposta após o controle da parasitemia, auxiliando na reconstituição do sistema imune para o nível basal. Mesmo os indivíduos que foram expostos à malária por repetidas vezes não se tornam totalmente refratários aos parasitas, mas desenvolvem imunidade clínica que previne a doença sintomática (Miller et al., 2002).

1.4 Resposta Imune ao *Plasmodium chabaudi*

As complicações nos casos letais de malária estão fortemente associadas à ação em conjunto das citocinas como o TNF- α e o IFN- γ (Langhorne et al., 2004). Diferentes linhagens de camundongos e espécies de *Plasmodium* têm sido utilizadas para mimetizar o desenvolvimento de malária em humanos, contribuindo para elucidar os mecanismos intrínsecos da relação parasita e hospedeiro. O *P. chabaudi* é um bom modelo para estudar a malária, pois mimetiza a infecção mais severa em humanos, causada pelo *P. falciparum* (Stephens et al., 2012). Estudos com *P. chabaudi* auxiliaram na elucidação dos mecanismos imunológicos envolvidos nos estágios iniciais da infecção, melhorando o conhecimento a respeito dos eventos ocorridos durante o ciclo eritrocítico do parasita (Figura 3).

Figura 3 - Cinética da resposta imune em modelo murino contra o *P. chabaudi*.

Conforme aumenta a parasitemia, ocorre ativação e aumento no número de células T CD4⁺ convencionais e T_{reg}. A resposta inicialmente policlinal desenvolve-se para uma resposta específica com formação de células de memória.

Fonte: Adaptado de Muxel (2011).

A imunidade inata exerce importante papel no reconhecimento do parasito durante a fase aguda da malária, uma vez que as células matadoras naturais (NK do inglês: *natural killer*), células $\gamma\delta$ e NKT, juntamente com macrófagos e monócitos, auxiliam no controle da parasitemia (Sponaas et al., 2009). A resposta imune ao *P. chabaudi* é caracterizada por esplenomegalia com grande ativação e morte de células do sistema imune (Helmby et al., 2000). Nas infecções causadas pelo *P. chabaudi*, o número de esplenócitos aumenta significativamente, a partir do dia 4 pós infecção (p.i.), acompanhando o aumento da parasitemia que atinge o pico no dia 7 p.i., nos camundongos inoculados com 1×10^6 EP (Zago et al., 2012).

Nas fases iniciais da resposta imune, as células T CD4⁺ exercem função determinante no controle da parasitemia. Foi demonstrado que camundongos timectomizados e tratados com anticorpos monoclonais anti-CD4 apresentavam uma

taxa de mortalidade entre 75 e 90% no intervalo de 20 dias quando eram infectados com *P. chabaudi* (Taylor-Robinson et al., 1993), enquanto os sobreviventes apresentavam uma parasitemia alta e constante, quando comparados com o controle.

No início da infecção a resposta das células T CD4⁺ é polarizada para um perfil do tipo T auxiliar 1 (T_h1, do inglês: *T helper 1*) com alta produção de IFN- γ . A principal fonte de IFN- γ nos primeiros momentos da infecção é secretado pela população de células NK (Roland et al., 2006). Entretanto, já foi descrito que nas infecções pelo *P. chabaudi*, as células T CD4⁺ são as principais produtoras de IFN- γ antes do pico da parasitemia (Helmby et al., 2000; Su, Stevenson, 2000). Esta alta produção de IFN- γ , somada com a produção de óxido nítrico pelos macrófagos, torna-se o principal mecanismo efetor no controle do parasita realizado pela imunidade inata (Doolan, Hoffman, 2000; Su, Stevenson, 2000).

O aumento no número de células mielóides no baço, decorrente da infecção pelo *Plasmodium*, contribui para o controle da parasitemia e para a ativação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, iniciando uma resposta imune específica e protetora. São requeridos dois sinais para efetiva ativação das células T, o primeiro sinal é derivado da interação entre o receptor da célula T (TCR do inglês: *T cells Receptor*) com o peptídeo ligado a molécula de MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) presente na superfície das células.

O complexo MHC comunica eventos celulares através da exposição de peptídeos na membrana das células, auxiliando no reconhecimento do que é próprio do organismo ou algo estranho à ele. O MHC de classe I está presente em todas as células nucleadas, e com auxílio de moléculas apresenta peptídeos derivados do citosol, expondo-os na membrana da célula. O MHC de classe II está presente em células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs do inglês: *Antigen Present Cells*), as moléculas de classe II são encontradas em células dendríticas, linfócitos B, macrófagos e células epiteliais do timo. O MHC de classe II apresenta peptídeos derivados do ambiente extracelular através de vesículas endossomais.

O segundo sinal para ativação das células T, é gerado pela interação de moléculas co-estimuladoras presente na superfície das células APCs, por exemplo, a expressão da molécula CD28. A presença da molécula CD28 diminui o número de interações necessárias entre o TCR e o peptídeo ligado ao complexo MHC para

efetiva ativação celular. A interação entre o co-receptor CD28 presente nas células T CD4⁺ com a molécula coestimuladora B7 na superfície das APCs induz a expressão de CD40L na superfície das células T CD4⁺, resultando na ativação das células B.

Estudos realizados com camundongos nocautes para molécula CD28 (CD28^{-/-}) infectados com *P. chabaudi* revelaram que o CD28 é importante no controle da parasitemia, pois, diminui o número de células secretoras de IgM para 80% enquanto o número de células secretoras de IFN-γ e IgG2a são reduzidas para 50% e 25%, respectivamente (Elias et al., 2005). Os níveis de RNAm para IFN-γ e a expressão de proteína estão relacionados com a resistência as infecções causadas pelo *P. chabaudi* em camundongos resistentes C57BL/6 e susceptíveis A/J (Su, Stevenson, 2000). Nas infecções pelo *P. chabaudi*, as células B são fundamentais para a total eliminação do parasita no sangue, uma vez que camundongos deficientes de células B não eliminam de forma eficiente os parasitas circulantes (van der Heyde et al., 1997).

Estudos mostram que além da resposta imune mediada por células, a imunidade humoral possui um papel fundamental na fase eritrocítica, pois, as moléculas de MHC I e II não estão presentes nos eritrócitos (Langhorne et al., 2008), dificultando a sinalização para efetiva ativação da imunidade celular.

Na fase eritrocítica do ciclo, os anticorpos desempenham ação efetora no combate à infecção quando: ligam-se a moléculas induzidas na superfície dos EP e facilitam a sua remoção (Blackman et al., 1990), bloqueiam a invasão dos eritrócitos pelos merozoítos, e causam a morte celular anticorpo-dependente. Foi demonstrado que as células B e os anticorpos desenvolvidos sob estímulo do antígeno da malária são mantidos estáveis na ausência de re-infecção (Wipasa et al., 2010) em diferentes períodos da infecção (Freitas do Rosario et al., 2008).

1.5 Fisiologia das células T reguladoras

Atualmente linhas de pesquisas apontam a importância da sinalização realizada pelos diversos tecidos na influência de homeostase e regulação do sistema imune. Já foi demonstrado que peptídeos próprios ou alergênicos injetados repetidas vezes resultam na diminuição da inflamação (Sabatos-Peyton et al., 2010). Além de detectar organismos estranhos e buscar mecanismos de para subvertê-los, o organismo pode se proteger diminuindo o impacto sobre a microbiota própria. A

capacidade de tolerar um patógeno pode fornecer subsídios para se entender melhor os mecanismos da relação parasita:hospedeiro (Medzhitov et al., 2012). A resolução em tecidos danificados após o tratamento com drogas, é mediado pelas células T_{reg} , que apresenta expressão aumentada nos tecidos e cuja depleção aumenta a produção de IL-17 e IFN- γ (Rosenblum et al., 2011).

Durante o desenvolvimento no timo, é gerado um grande repertório de TCR- $\alpha\beta$, incluindo alguns com potencial para reconhecer antígenos próprios (Haribhai et al., 2007; Ohkura, Sakaguchi, 2010). Foi demonstrado que alterações moleculares que afetam o bom funcionamento do TCR durante a ativação, resulta em alterações na seleção tímica e nas funções das células T_{reg} (Tanaka et al., 2010). Na seleção tímica, as células epiteliais medulares (mTECs) expressando o gene AIRE apresentam uma ampla gama de antígenos próprios, através das moléculas de MHC de classe II (Anderson et al., 2005). Se o TCR interagir com alta avidéz com o complexo MHC:peptídeo ocorre a eliminação do timócito. No entanto, algumas células escapam da seleção negativa e se tornam reguladoras, com capacidade de suprimir a ação de células T efetoras, contribuindo para a tolerância ao próprio (Ohkura, Sakaguchi, 2010; Pacholczyk, Kern, 2008). As células T_{reg} são determinadas pela expressão do fator de transcrição forkhead box P3 (Foxp3), a deleção deste gene reprograma a célula para um perfil de célula T_h (Komatsu et al., 2009; Williams, Rudensky, 2007).

O TGF- β secretado por várias células do sistema imune influencia na proliferação e diferenciação celular (Huehn et al., 2009), alterando também a fisiologia das células T_{reg} . Estudos *in vitro* demonstraram que células T $CD4^+$ na presença de TGF- β passam a expressar a molécula Foxp3 assumindo um papel supressor (Zheng et al., 2007). Porém, este fenótipo é perdido quando se repete o estímulo com antígeno na ausência de TGF- β . O papel do TGF- β na indução de células T_{reg} no timo ainda não foi totalmente esclarecido (Huehn et al., 2009). O TGF- β ativa na célula alvo, a transcrição de STAT3, NFAT e SMADs que são moléculas requeridas para indução do gene Foxp3. Experimentos *in vivo* demonstram que o bloqueio de TGF- β resulta em diminuição da tolerância oral (Mucida et al., 2005).

Enquanto as células T_{reg} naturais se desenvolvem no timo, as células T_{reg} induzidas (T_{regi}) são diferenciadas na periferia, por exemplo, nos linfonodos

mesentéricos e na lâmina própria do intestino . As células que expressam a molécula Foxp3 contribuem para a tolerância ao próprio, na rejeição de tumores e na tolerância à microbiota (Cambos et al., 2008; Sakaguchi et al., 2009a). Além disso, previnem de inflamações exacerbadas, como na diabetes do tipo 1, esclerose múltipla, artrite reumatóide e lupus eritematoso sistêmico, alergias e infecções virais e bacterianas (Campbell, Koch, 2011).

Estudos realizados com *P.vivax*, relatam que durante a infecção o aumento no número de células T_{reg} está diretamente relacionado com o grau de parasitemia (Bueno et al., 2010). Foi demonstrado que em gestantes portadoras de malária causada pelo *P. falciparum*, células T_{reg} presentes no sangue do cordão umbilical podem induzir imunossupressão no neonato, que persiste após o nascimento e que a depleção das células CD25^{hi} induzia aumento na produção de INF- γ em 69% dos pacientes (Mackroth et al., 2011). Análises por sorologia e citometria de fluxo apontam que o número de células T_{reg} são similares durante a fase de convalescença, comparando o sangue de pacientes com malária grave e o sangue de pacientes com um tipo de malária mais branda (Walther et al., 2009).

1.6 Mecanismos de ação das células T CD4⁺ convencionais e T_{reg} através das moléculas estimuladoras GITR, ICOS e OX40

Tanto nas células T_{reg} naturais como nas células T_{reg} induzidas (T_{regi}), a expressão do gene Foxp3 aumenta a expressão de CD25, e induz a expressão de genes que resultam na expressão de moléculas associadas à membrana, como receptor glucocorticóide induzido da família TNFR (GITR do inglês: *glucocorticoid-induced TNFR-related gene*), e o antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4 do inglês: *cytotoxic T lymphocyte-associated 4*) (Sakaguchi et al., 2009a). Tanto em humanos como em camundongos normais, as células T_{reg} executam funções de homeostase, e a depleção desta população resulta em doença inflamatória intestinal (IBD do inglês: *inflammatory bowel disease*). Isso se deve à indução da resposta imune contra bactérias da microbiota (Ohkura e Sakaguchi, 2010). Indivíduos que não possuem o gene foxp3 funcional, desenvolvem uma doença denominada Síndrome da Imunodesregulação, poliendócrina e enteropatia ligada ao X (IPEX do inglês: *Immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy*

X-linked syndrome), enquanto camundongos Scurfy (camundongos com mutação natural ou deleção do gene para Foxp3) desenvolvem doenças autoimunes com linfoproliferação (Vignali et al., 2008). Evidências indicam que as células T_{reg} utilizam diferentes mecanismos para regular a resposta imune nos tecidos linfoides e não linfoides, porém, estes mecanismos são complexos e não estão totalmente elucidados (Campbell, Koch, 2011).

1.6.1 Expressão da molécula GITR

A molécula GITR é expressa em várias células constituintes do sistema imune inato e adaptativo, desencadeando atividade efetora em células T (Nocentini et al., 2007). A molécula GITR é expressa em altos níveis nas células T_{reg}, sendo regulado positivamente em células T CD4⁺ convencionais após ativação. Já foi demonstrado que células apresentadoras obtidas de animais nocautes para molécula GITR, apresentam falhas no processo de ativação das células T CD4⁺ (Ronchetti et al., 2010). Outro fato interessante é que animais nocautes para molécula GITR são mais resistentes a infecções por *candida albicans*, artrite induzida por colágeno e lesões pulmonares agudas ou crônicas (Kamimura et al., 2009).

O ligante de GITR (GITRL) é constitutivamente expresso em células B1 do peritônio, APCs, macrófagos e células endoteliais (Kim et al., 2010). A molécula GITRL é induzida na APC após a estimulação por TLRs, sendo regulada negativamente após 48 horas de estimulação *in vitro* (Kim et al., 2010). Estudos utilizando anticorpos agonistas anti-GITR, ou GITRL solúvel demonstraram que a via GITR-GITRL induz sinais de co-estimulação ativando células T_{reg}, T CD4⁺ efetoras e T CD8⁺, mesmo estas células apresentando funções antagônicas (Kamimura et al., 2009). Em trabalhos que avaliavam falência múltiplas de órgãos, a molécula GITR mostrou-se importante nos mecanismos de morte tecidual (Galuppo et al., 2011).

Estudos *in vivo* reforçam a ideia de estimulação de células efetoras e reguladoras pela via GITR, pois a ativação de GITR induz doença autoimune exacerbada e inflamação por injúria tissular (Sonawane et al., 2009). A depleção de células T_{reg} com uso de anticorpos anti-GITR (DTA-1) é estudada como alternativa para alvo de uma nova terapia antitumoral (Coe et al., 2010). Em contra partida, descobertas de perfis celulares específicos como células T_{reg} GITR⁺ com expressão baixa de CD25, encontradas na circulação humana, desempenham importante

atividade de regulação, com alta produção de IL-10 e TGF- β (Bianchini et al., 2011). Podemos perceber que a molécula GITR exerce papel antagônico com influência em vários ambientes de regulação e ação do sistema imunológico.

1.6.2 Expressão da molécula ICOS

A molécula ICOS pertence à família de moléculas coreceptoras como o CD28, desempenhando papel importante na estimulação, proliferação e sobrevivência de células T (Kornete et al., 2012). O ICOS foi inicialmente caracterizado como uma molécula facilitadora da diferenciação de células T para a produção de IL-4 e IL-10. Assim, modelos *in vitro* sugerem que o ICOS está associado à diferenciação de células T_H2 (Rojo et al., 2008). A molécula ICOS liga-se a molécula ICOS-L e a molécula B7, que é expressa constitutivamente em baixos níveis nas APCs. A molécula B7 também é ligante das moléculas CD28 e CTLA-4.

A molécula ICOS é induzida no período de 48 h após a ativação com a coestimulação da molécula CD28 nas células T CD4⁺ e T CD8⁺. As moléculas ICOS e CD28 exercem papéis distintos na diferenciação de células T. Enquanto a molécula CD28 é responsável por primar a célula, o ICOS regula a ação efetora (Harada et al., 2003). Estudos demonstram que a proliferação de células T_{reg} é influenciada pela molécula ICOS e que há diferenças na proliferação *in vitro* e *in vivo* (Chen et al., 2012).

A expressão de ICOS é mais acentuada em respostas com perfil Th2, quando comparadas àquelas que polarizam para o perfil T_H1 (Kornete et al., 2012). Entretanto, a coestimulação por ICOS também pode aumentar a secreção de IFN- γ ou TNF *in vitro*. O bloqueio da interação entre ICOS e ICOS ligante (ICOSL), que é outro ligante para ICOS, durante a indução de encefalomielite autoimune experimental pelas células efetoras, determina a exacerbação da doença com aumento na produção de IFN- γ (Rojo et al., 2008). Estudos em modelos de diabetes tipo 1 demonstram que a perda da expressão de ICOS nas ilhotas do pâncreas está relacionada com o desenvolvimento da doença (Kornete et al., 2012). Quanto a geração de linfócitos T, estes se desenvolvem normalmente no timo de camundongos deficientes em ICOS, exibindo populações normais de células T nos linfonodos e baço (Dong, et al. 2001). Estes dados indicam que ICOS não é

requerido para o desenvolvimento direto de células T, sendo requerido nos processos efetores.

Analises em células T CD4⁺ convencionais demonstraram que o papel da molécula ICOS é determinante para desenvolver uma resposta efetora ou tolerogênica. Foi demonstrado que a expressão da molécula ICOS, está diretamente relacionada com a resposta imune e não só à ativação celular, com massiva expansão de células T CD4⁺ convencionais e permanência basal das células T_{reg} (Lischke et al., 2012). A molécula ICOS exerce papel importante para os mecanismos supressores das células T_{reg}. Analises de proliferação celular *in vitro* demonstraram que células T_{reg} ICOS⁺ são mais eficientes no controle da proliferação de células T CD4⁺ ativadas, do que as células T_{reg} ICOS⁻ (Lischke et al., 2012). A aplicação de antígenos respiratórios induz aumento no número de células T_{reg} no pulmão de camundongos do tipo selvagem (WT do inglês: *wild type*), porém, o número de células T_{reg} não é alterado nos pulmões de animais nocautes para ICOS e os níveis de produção de IL-10 são inferiores aos do animal WT (Busse et al., 2012). Estes dados demonstram que a sinalização da molécula ICOS desempenha um papel importante para a qualidade da resposta tolerogênica ou efetora das células T CD4⁺.

1.6.3 Expressão da molécula OX40

A molécula OX40 faz parte do grupo de receptores membros da família TNF, que são potentes ativadores da resposta efetora das células T, regulando a ação das células T CD4⁺ e T CD8⁺. Nas células T_{reg}, a molécula OX40 é expressa constitutivamente, enquanto nas T efetoras esta expressa apenas após a ativação (Gramaglia et al., 1998).

O OX40 passa a ser expresso nas células naives que se tornaram ativadas entre 12 e 24 h (So e Croft, 2007), e possui pico de expressão em 48 h, com declínio após 72 e 96 h após a estimulação via TCR (Valzasina et al., 2005). O estímulo via OX40 não induz proliferação das células T_{reg} *in vitro*, mas *in vivo* pode resultar em uma diminuição da tolerância a antígenos. Além disso, o bloqueio da coestimulação por OX40 pode permitir a sobrevivência de aloenxertos (Vu et al., 2007). Está descrito na literatura, que células T CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁻ podem ser diferenciadas em

células T CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺, e que a coestimulação por OX40 pode regular este mecanismo (So, Croft, 2007), fato que reforça a ambiguidade de função desta molécula. Foi demonstrado que camundongos deficientes em OX40 apresentam redução no número de células T_{reg} no baço, enquanto camundongos que possuem alta expressão da molécula, desenvolvem números elevados de células T_{reg} no baço (Takeda et al., 2004) evidenciando a importância da molécula OX40 nas atividades das células T_{reg}.

As interações do sistema gastrointestinal com a microbiota exigem um balanço preciso e constante do sistema imunológico. Com relação à arquitetura imune intestinal, a molécula OX40 é altamente expressa nas células T_{reg}, apresentando menor expressão nas células T CD4⁺ convencionais, isto promovendo acúmulo de células reguladoras no cólon, suprimindo a formação de colite (Griseri et al., 2010). Estudos demonstram que a expressão de OX40 está relacionada com a proliferação, homeostase e sobrevivência das células T (Ishii et al., 2010).

Animais OX40 nocautes não apresentam mudanças morfológicas em seus tecidos e possuem níveis de expressão da molécula FoxP3 semelhantes aos níveis encontrados nos animais do tipo selvagem (WT do inglês : *wild type*), (Xiao et al., 2012). Camundongos com malária cerebral possuem alta expressão de OX40 em seus tecidos cerebrais, gerando indícios que a expressão desta molécula exerça função na caracterização da patologia (Oakley et al., 2009). Realizando tratamentos com anticorpo α -OX40 os camundongos passam a expressar níveis mais baixos da expressão de FoxP3 (Xiao et al., 2012), corroborando com os trabalhos que demonstram a importância da molécula OX40 na regulação do sistema imune.

1.7 Mecanismos de ação das células T CD4⁺ convencionais e T_{reg} através das moléculas inibidoras CTLA-4, PD-1 e PD-L1

Após reconhecimento, ativação e expansão das células do sistema imune, faz-se necessário o retorno aos níveis basais, garantindo a integridade dos tecidos adjacentes e possíveis células de memória. Na transição entre a fase aguda e crônica da infecção ocorre eliminação de grande parte das células T ativada através do processo de apoptose (Muxel et al., 2011). O retorno ao número basal de células pode ser desencadeado por diversas vias de sinalizações, utilizando grupos

diferentes de moléculas inibidoras, para este estudo focaremos em três moléculas CTLA-4, PD-1 e PD-L1.

1.7.1 Expressão da molécula CTLA-4

Um dos mecanismos supressores das células T_{reg} está associado à molécula CTLA-4 que interage com as moléculas CD80 e CD86 (receptores B7-1 e B7-2 respectivamente) presentes na superfície das células dendríticas. Esta interação estimula as células dendríticas a expressarem a enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), que converte o aminoácido essencial triptofano em quinurenina, que é tóxico para as células T vizinhas, esta atividade também pode matar as células dendríticas (Sakaguchi et al., 2009b; Ohkura e Sakaguchi, 2010; Campbell e Koch, 2011).

Camundongos deficientes em CTLA-4 nas células T_{reg} não sofrem alterações na produção de células T_{reg} $Foxp3^+$ no timo (Bour-Jordan e Bluestone, 2009). Entretanto, a função supressora fica debilitada, ocasionando o desenvolvimento de doença linfoproliferativa e esplenomegalia associada ao acúmulo de células T efectoras (Sakaguchi et al., 2009a). Estudos relacionados ao sistema gastrointestinal indicam que a molécula CTLA-4 é importante na regulação realizada pelas células T_{reg} no local, diminuindo as inflamações observadas nos animais nocautes para CTLA-4 (Barnes et al., 2013).

Em humanos foi observado que pacientes com malária apresentam maior expressão de CTLA-4 nas células T_{reg} independente da espécie causadora da infecção (Goncalves et al., 2010). A inibição da molécula CTLA-4 com uso de anticorpos monoclonais causa diminuição na sobrevivência de camundongos e aumenta a incidência de malária cerebral em modelo susceptível (Hafalla et al., 2012). Em modelos experimentais com *P. bergue ANKA* foi demonstrado que as células T_{reg} são dependentes da molécula CTLA-4 para realizar proteção à malária cerebral (Haque et al., 2010).

reunimos as informações relativas à porcentagem de células expressando cada molécula: ativadora ou inibidora (Figura 24) nas células T CD4⁺ convencionais e T_{reg}.

Figura 24 - Cinética das moléculas ativadoras e inibidoras presente em células T CD4⁺ convencionais e T_{reg}.

Demonstração da distribuição cinética do número de células do dia 0 ao dia 14 p.i., pelo *P. chabaudi*, seguido pela ilustração das moléculas ICOS, OX40, GITR, CD25, PD-1, PD-L1 e CTLA-4, presentes em células T CD4⁺ Foxp3⁻ e células T CD4⁺ Foxp3⁺ durante os mesmos períodos.

6. CONCLUSÕES

- As células T_{reg} são estimuladas a proliferarem já nos primeiros dias de infecção ao *P. chabaudi*;
- As moléculas estimuladoras GITR, OX40, ICOS são induzidas precocemente em resposta ao parasita, tanto em células T $CD4^+$ convencionais como nas células T_{reg} ;
- As células T $CD4^+$ convencionais estimuladas com EP em cultura sob inibição da molécula OX40, apresentaram menor capacidade de proliferação do que as células inibidas com α -ICOS;
- As células T_{reg} que expressam a molécula ICOS exercem maior supressão sobre as células que estão em expansão durante a fase aguda da malária induzida pelo *P. chabaudi*.
- As moléculas inibidoras PD-1 e PD-L1 são expressas nas células T $CD4^+$ convencionais e T_{reg} , já no início do desenvolvimento da resposta aguda desencadeada pelo *P. chabaudi*.
- Através do exposto parece que as células T_{reg} não modulam a resposta aguda ao *P. chabaudi*, pela ativação da molécula CTLA-4.

1.7.2 Expressão das moléculas PD-1 e PD-L1

A molécula inibitória PD-1 (CD-279) pertence à superfamília B7-CD28 e é expressa em células T logo após a ativação do TCR. A molécula PD-L1 (CD274) é o principal ligante de PD-1 e está constitutivamente expresso em diversas células (Yamazaki et al., 2002). Outro ligante de PD-1 é a molécula PD-L2 (CD273), que está presente em macrófagos e células dendríticas (Latchman et al., 2001).

Após ativação, as células aumentam seu metabolismo para suprir a energia necessária para realizar as sínteses proteicas, sendo a análise de glicose uma alternativa para verificar a efetiva ativação celular. Estudos demonstram que a presença de PD-1 e também da molécula CTLA-4, reduzem a demanda de glicose pelas células T, com redução efetiva na capacidade de proliferação (Parry et al., 2005).

Estudos com modelos murinos de malária cerebral demonstraram que camundongos PD-1 e PD-L1 nocautes, desenvolviam a forma mais severa da doença, com aumento de citocinas pró-inflamatórias, comparados aos camundongos *WT* e aos PD-L2 nocautes (Carter et al., 2007). Estes dados sugerem que a interação de PD-1 com o ligante PD-L1 é mais importante para atenuar a resposta das células T efectoras no modelo de malária experimental. Em contra partida, a inibição realizada pela via PD-1/PD-L1 pode favorecer a ação do parasita. Experimentos realizados com *Toxoplasma gondii*, apontam que o bloqueio de PD-L1 eleva a produção de IFN- γ , aumentando também a proliferação de células T CD8⁺, diminuindo a reatividade do parasita (Bhadra et al., 2011). Estudos sobre câncer apontam algumas terapias inibindo a sinalização PD-1/PD-L1, pois a expressão de PD-L1 é alta em uma gama variada de tumores murinos e humanos, funcionando como uma ferramenta de evasão do sistema imune (Blank et al., 2005).

A plasticidade da resposta imune vinculada ao reconhecimento do meio e do parasita, é efetivada através de ferramentas minuciosas, podendo desencadear em uma resposta efetiva ou na facilitação da evasão do parasita pela mesma via de reconhecimento. Este delicado balanço entre as interações do meio e o reconhecimento imune, trás a necessidade de atualizações constantes, visando o entendimento sobre o surgimento e a fisiologia das moléculas expressas durante o processo imune. Sendo assim o estudo das moléculas expressas nas células T

CD4⁺ convencionais e T_{reg} na fase inicial da malária é importante para reconhecer os mecanismos do processo inflamatório e determinarmos se a ação das células reguladoras, de fato é mais importante sobre o parasita ou o hospedeiro.

2 OBJETIVOS

Com base no exposto anteriormente, o objetivo central desse estudo é avaliar na resposta aguda à malária pelo *P. chabaudi* AS, o papel das moléculas coestimuladoras ICOS, GITR, OX40, CTLA-4, PD-1 e PD-L1 presentes em células T CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁻ (convencionais) e T CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ (T_{reg}), naíves e ativadas. Para efetuar as análises utilizaremos um modelo murino susceptível C57BL/6 FoxP3⁺GFP⁺.

1- Cinética da expressão das populações de células T CD4⁺ convencionais e T_{reg} no baço de camundongos infectados

Analisar e comparar a expansão das células T CD4⁺ convencionais e T_{reg}, de animais C57BL/6 FoxP3⁺ GFP⁺ controles e infectados com *P. chabaudi* em diferentes dias de infecção.

2- Determinação do perfil de expressão das moléculas coestimuladoras presentes nas células T CD4⁺ convencionais e das células T_{reg} após a infecção pelo *P. chabaudi*.

Verificar a expressão das moléculas GITR, ICOS, OX40, CD25, PDL-1, PD-1 e CTLA-4 nas células T_{reg} e células T CD4⁺ convencionais após a infecção. Analisar a coexpressão de determinadas molécula sem ambas as populações.

3- Avaliar a proliferação das células T CD4⁺ convencionais e células T_{reg} *in vitro*.

Realizar cultura das células com estímulo de α-CD3 e EP. Inibir a ação das moléculas ICOS e OX40 com uso de anticorpos específicos.

4- Realizar ensaio de inibição da proliferação

Separar a população de células T_{reg} ICOS⁺ e T_{reg} ICOS⁻ e avaliar a capacidade de supressão destas moléculas sobre a proliferação das células T CD4⁺ convencionais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Camundongos, parasita e parasitemia

Os camundongos foram obtidos do Biotério de Animais Isogênicos da Universidade de São Paulo (USP, São Paulo, SP, Brasil). Fêmeas isogênicas da linhagem C57BL/6 Foxp3GFP foram inoculadas com 1×10^6 EP com *P. chabaudi* AS pela via intra-peritoneal (i.p.). A parasitemia foi acompanhada através de esfregaço sanguíneo corado com Giemsa e contagem de 300 eritrócitos em microscópio óptico.

3.2 Obtenção e processamento dos esplenócitos

Os camundongos foram sacrificados com 500 µl de halotano em câmara fechada. O baço foi extraído e colocado em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 3% e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) inativado, estreptomicina (100 µg/ml), penicilina (100 U/ml), L-glutamina (2mM), 2-mercaptoethanol (50 µM) obtidos da Invitrogen (InvitrogenTM, São Paulo, SP, Brasil), e piruvato de sódio (1mM), os reagentes foram obtidos da Sigma (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil). As células obtidas foram centrifugas à 1200 rpm, durante 5 minutos à 4 °C, os esplenócitos foram isolados com auxílio de tampão de lise 1ml por baço durante 4 minutos.

3.3 Marcação celular e citometria de Fluxo

Células esplênicas provenientes de camundongos da linhagem C57BL/6Foxp³GFP foram lisadas para separação dos leucócitos. Células esplênicas (1×10^6) foram incubadas com anticorpos monoclonais marcados com os fluorocromos; FITC (do inglês Fluorescein Isothiocyanate), PE (Phycoerythrin) ou PeCy7 (cy-chrome), PercP, APC, Pacific Blue na diluição de 1:100. Os anticorpos anti-CD4, anti-CD25 (cadeia α do receptor para IL-2), anti-ICOS (CD278), anti-GITR (TNFRS18 ou CD357), anti-PD1 (CD 279), anti- PDL-1 (CD 274), anti-CTLA-4 (CD 152), anti-FAS (CD 90), anti-FAS-L (CD95) e streptavidina foram adquiridos da empresa BD Pharmingen (BD Pharmingen, Curitiba, PR, Brasil). O anticorpo biotinizado

Immunosorbent Assay), através de kit de detecção *Mouse IFN- γ ELISA set* (BD OptEIA, BD Biosciences) seguindo o protocolo do fabricante.

3.7 Análise estatística

A análise estatística foi obtida através do teste One-way ANOVA, seguido por análise do Teste de Bonferroni. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do Software GraphPad Prism 5. Os asteriscos acima das linhas representam as diferenças significativas entre as barras indicadas com * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4 RESULTADOS

4.1 Cinética das populações de células T_{reg} e $T\ CD4^+$ convencionais

Para iniciar o estudo das moléculas envolvidas na expansão e diferenciação das células $T\ CD4^+$ convencionais e T_{reg} na malária aguda, determinamos a quantidade destas células nos dias 0, 4, 5, 7, e 14 p.i., sendo a parasitemia acompanhada até o dia 21 p.i. (figura 4A). O número de esplenócitos totais aumenta até o dia 7 p.i., ocorrendo uma estabilização no dia 14p.i.(figura4B).

Os números de células $T\ CD4^+$ convencionais e T_{reg} encontram-se significativamente aumentados no dia 7 p.i., acompanhando a cinética de crescimento dos esplenócitos, mas ambas as populações celulares mostram uma redução no dia 14 p.i. (figuras 4C-D). Ao compararmos o peso do baço (esplenomegalia) dos animais infectados, observamos um aumento no decorrer da infecção, que se torna mais acentuado no dia 14 p.i. (figura4E).

Figura 4 - Cinética da parasitemia e dos números de células totais, T CD4⁺ convencionais e T_{reg} no baço durante a fase aguda da malária pelo *P. chabaudi*.

Os camundongos C57BL/6Foxp3GFP foram infectados com 10⁶ EP e em diferentes dias de infecção, a parasitemia foi monitorada por esfregaços sanguíneos corados com Giemsa e os baços foram retirados e processados para a contagem de células e análise por citometria de fluxo. (A) Parasitemia dos camundongos durante os dias de infecção. Os valores diários obtidos de parasitemia se referem às porcentagens de eritrócitos infectados observados no esfregaço sanguíneo. (B) Números de células totais no baço dos camundongos infectados em diferentes dias de infecção. Após serem processadas, as células do baço foram contadas em câmara de Neubauer e o número total de células do baço foi calculado. (C-D) A partir da contagem das células do baço e aquisição no citômetro de fluxo, as células foram analisadas através do software Flowjo. Através de janelas foi possível determinarmos a quantidade de células T CD4⁺ convencionais (CD4⁺FoxP3⁻) e T_{reg} (CD4⁺FoxP3⁺) nos diferentes dias de infecção. (E) O baço dos camundongos foram pesados para avaliar a esplenomegalia. Os gráficos são representativos de 4 experimentos (n≥3). Os asteriscos acima das linhas representam as diferenças significantes entre as barras indicadas com *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

4.2 Determinação do perfil de expressão de moléculas estimuladoras presentes nas células T_{reg} e células T CD4⁺ convencionais

As células do baço foram marcadas com anticorpos monoclonais e analisadas por citometria de fluxo. Para determinação das populações celulares uma janela foi construída utilizando os parâmetros FSC (do inglês: *Forward scatter*) altura por área, para exclusão dos *doublets* (Figura: 5A). A partir da janela de exclusão dos *doublets* fizemos uma janela para separar a população de linfócitos (Figura: 5B) e a partir desta janela selecionamos as células CD4⁺ (Figura 5C).

Figura 5 - Determinação das populações de células T_{reg} e das células T CD4⁺ convencionais.

Camundongos C57BL/6 Foxp3GFP foram infectados com 10^6 EP e em diferentes dias de infecção, após remoção e processamento do baço, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais e analisadas por citometria de fluxo. Para caracterizar melhor o perfil celular os *doublets* foram excluídos (5A). A seguir foi feita uma janela para captação dos linfócitos (5B). Dentro da janela dos linfócitos separamos a população de células que expressam a molécula CD4 (5C) e distinguimos as células convencionais das reguladoras através da expressão de Foxp3 (5C). Em todas as figuras as janelas superiores são originárias do camundongo controle e as janelas logo abaixo são representações do camundongo infectado de 5 dias. Os dados representam 3 experimentos realizados (n=3).

Na população de células T CD4⁺ selecionamos as células que expressam a molécula Foxp3⁺ para determinação das células T_{reg} e das células T CD4⁺ convencionais que não expressam Foxp3 (Figura: 5D).

Após constatar que o baço de animais infectados com *P. chabaudi* apresentam aumentos no número de esplenócitos totais e no número de células T_{reg} e T CD4⁺ convencionais já nos primeiros dias de infecção, utilizamos um parâmetro geral para caracterizarmos o grau de ativação das células T CD4⁺ convencionais e T_{reg} com auxílio de citometria de fluxo, utilizando como parâmetro o FSC, que reflete o tamanho da célula. Nos camundongos infectados pelo *P. chabaudi*, ocorre aumento dos valores de FSC durante os dias de infecção, tanto nas células T CD4⁺ convencionais como nas T_{reg}, sendo os valores máximos observados no dia 7 p.i. - (Figura 6).

Figura 6 - Tamanho das células T CD4⁺ convencionais e T_{reg} nos diferentes dias de infecção ao *P. chabaudi*.

Camundongos C57BL/6Foxp3GFP foram infectados com 10^6 EP e após remoção do baço e processamento das células, avaliamos a ativação das células T CD4⁺ convencionais e T_{reg}, através da expressão de FSC. Os histogramas são representativos de 5 experimentos referentes ao dia 4 e 5 p.i. e de 3 experimentos para os dias 7 e 14 p.i..

Após a seleção destas populações celulares foi possível verificar e quantificar a expressão de moléculas que estão envolvidas na ativação dos linfócitos T, através de histogramas e das médias de fluorescência (MFI). Determinamos a expressão das moléculas OX40, GITR, ICOS e a molécula CD25 nas células T CD4⁺ convencionais (Figura 7).

Figura 7 - Expressão das moléculas OX40, CD25, GITR e ICOS em células T CD4⁺ convencionais na fase inicial da malária causada pelo *P. chabaudi*.

Camundongos C57BL/6Foxp3GFP foram infectados com 10^6 EP e após remoção do baço e processamento das células, avaliamos as células T CD4⁺ convencionais por citometria de fluxo, em relação à expressão das moléculas OX40 (A), CD25 (B), GITR (C) e ICOS (D) nos dias iniciais da resposta imune ao *P. chabaudi*. Os histogramas são representativos de 3 experimentos (n=3). Os asteriscos acima das linhas representam as diferenças significativas entre as barras indicadas com *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Nos camundongos infectados pelo *P. chabaudi* as células T CD4⁺ convencionais passam a expressar níveis mais elevados da molécula OX40 em

comparação aos camundongos controles. Verificamos que a expressão da molécula OX40 é maior no dia 7 p.i. (Figura 7A). A expressão da molécula CD25 é aumentada significativamente nas células T CD4⁺ convencionais dos camundongos infectados, sendo que a expressão é maior já no início da infecção apresentando pico no dia 5 p.i. (Figura 7B). A expressão da molécula GITR aumenta em decorrência da infecção ao *P. chabaudi*, dobrando a expressão no dia 5 p.i. e apresentando níveis três vezes maiores nos animais infectados no dia 7 p.i., quando comparados ao controle (Figura 7C). No início da malária causada pela infecção com *P. chabaudi*, as células T CD4⁺ convencionais dos animais infectados expressam altos níveis da molécula ICOS (Figura 7D), e estes níveis permanecem altos até o dia 7 p.i., quando comparamos com o controle.

Nos primeiros dias de infecção da malária causada pelo *P. chabaudi*, as células T_{reg} dos camundongos infectados apresentam aumentos na expressão das moléculas estimuladoras. A expressão da molécula OX40 aumenta abruptamente no dia 4 p.i., com expressão 6 vezes maior do que os níveis encontrados nas células T_{reg} dos animais controles (Figura 8A). Este aumento da molécula OX40 na superfície das células T_{reg} persiste até o dia 7 p.i. A molécula CD25 tem sua expressão dobrada no dia 4 p.i., a partir deste ponto o nível de expressão não se altera até o dia 7 p.i. (Figura 8B). A expressão da molécula GITR nas células T_{reg} é aumentada no início da infecção e apresenta um pico de expressão no dia 7 p.i. com expressão 2 vezes maior do que os níveis encontrados nas células T_{reg} dos animais controles (Figura 8C). Observamos que a expressão da molécula ICOS apresenta aumento de 4 vezes no dia 4 p.i., quando comparado com animais controles. O aumento de expressão progride nos dias 5 e 7 p.i., tanto que há diferença estatística entre o dia 4 e 7 p.i. (Figura 8D).

Com base nos dados obtidos verificamos que nos animais infectados, a expressão de moléculas estimuladoras encontra-se aumentada nas duas populações celulares. Estas populações passam a expressar moléculas de ativação já nos primeiros dias de infecção causada pelo *P. chabaudi*. Vimos que grande parte destas moléculas apresentam pico de expressão no dia 7 p.i., coincidindo com o pico de parasitemia (Figura 4A).

Figura 8 - Expressão das moléculas OX40, CD25, GITR e ICOS em células T_{reg} na fase inicial da malária causada pelo *P. chabaudi*.

Camundongos C57BL/6Foxp3GFP foram infectados com 10^6 EP e após remoção do baço e processamento das células, avaliamos as células T CD4⁺ convencionais por citometria de fluxo, através da expressão das moléculas OX40 (A), CD25 (B) e GITR (C) nos dias iniciais da resposta imune ao *P. chabaudi*. Medimos o MFI destas moléculas, mensuramos a expressão basal de cada molécula comparando com os níveis expressos em células dos camundongos infectados. Os histogramas são representativos de 3 experimentos realizados (n=3). Os asteriscos acima das linhas representam as diferenças significativas entre as barras indicadas com *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Exceções ocorrem quanto à expressão da molécula CD25 e ICOS com pico de expressão no dia 5 p.i., nas células T CD4⁺ convencionais e o fato das células

T_{reg} apresentarem expressão constante da molécula CD25 nos dias de infecção analisados.

Para ter uma melhor compreensão sobre os níveis constitutivos e induzidos das moléculas GITR, OX40, CD25 e ICOS expressos durante a fase aguda de malária, comparamos o MFI destas moléculas entre as populações de células T_{reg} e T CD4⁺ convencionais nos diferentes dias de infecção (Figura 9). Realizando a análise comparativa entre as células T_{reg} e T CD4⁺ convencionais, verificamos que a expressão da molécula OX40 não apresenta diferença significativa em animais não infectados. A partir do dia 4 p.i., a expressão da molécula OX40 nas células T_{reg} é 3 vezes maior do que a expressão das células TCD4⁺ convencionais (Figura 9A). No dia 7 p.i., a diferença de expressão da molécula OX40 é diminuída entre as duas populações sugerindo que a molécula OX40 possa ser importante na resposta efetora das células convencionais na fase aguda da malária induzida pelo *P. chabaudi*.

Analisando a expressão da molécula GITR verificamos que as células T_{reg} apresentam níveis elevados de expressão em todos os dias de infecção, por ser este um marcador constitutivo nesta população, tanto que as células dos camundongos controles apresentam expressão 5 vezes maior quando comparada com os níveis de GITR expresso nas células T CD4⁺ convencionais (Figura 9B). A expressão de GITR nas células T CD4⁺ convencionais aumenta gradualmente, conforme o tempo de infecção (Figura 9B). A molécula CD25 também é uma molécula que apresenta alta expressão nas células T_{reg}, as células dos camundongos controles apresentam uma expressão 6 vezes maior do que a expressão nas células TCD4⁺ convencionais (Figura 9C). Nas células T CD4⁺ convencionais a média de expressão da molécula CD25 em relação às células T_{reg} é 4 vezes menor nos dias 4, 5 e 7 p.i. Quanto a expressão da molécula ICOS, observamos uma diferença estatística pequena entre as duas populações celulares nos animais não infectados. No dia 4 p.i. a expressão da molécula ICOS nas células T_{reg} é 2 vezes maior do que os níveis observados nas células T CD4⁺ convencionais e esta diferença aumenta conforme os dias de infecção (Figura 9D). No dia 7 p.i. a diferença de expressão da molécula ICOS é 3 vezes maior nas células T_{reg} quando comparados com a expressão do dia 7 p.i. das células T CD4⁺ convencionais.

Figura 9 - Comparação entre a expressão das moléculas OX40, GITR, CD25 e ICOS nas populações de células T_{reg} (Tr) e T CD4⁺ convencionais (Tc).

Camundongos C57BL/6Foxp3GFP foram infectados com 10^6 EP e após remoção do baço e processamento das células, analisamos as células T CD4⁺ convencionais e T_{reg} por citometria de fluxo, quantificando a expressão das moléculas OX40, GITR, CD25 e ICOS nos dias 0, 4, 5 e 7 de infecção com *P. chabaudi*. Os dados são representativos de 3 experimentos realizados (n=3). Os asteriscos acima das linhas representam as diferenças significativas entre as barras indicadas com *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Em termos gerais observamos que nas células T CD4⁺ convencionais as moléculas OX40 e GITR apresentam cinéticas semelhantes de expressão entre os controles e infectados, o mesmo ocorrendo entre as moléculas CD25 e ICOS. Nas células T_{reg} a indução das moléculas estimuladoras ocorre de forma abrupta e permanece com poucas variações entre o dia 4 e 7 p.i., com exceção à molécula ICOS que apresenta um aumento gradual durante a resposta imune ao *P. chabaudi*.

4.3 Caracterização da coexpressão de moléculas estimuladoras na população de células T CD4⁺ convencionais durante a infecção pelo *P. chabaudi*

Com base nos dados que mostram um aumento na parasitemia a partir do dia 4 p.i., e após constataremos a maior expressão de moléculas estimuladoras na fase inicial da malária, verificaremos a coexpressão das moléculas ICOS, OX40, e CD25 com a molécula GITR em células do baço de camundongos C57BL/6 Foxp3GFP não infectados e infectados com 10⁶ EP nos dias 4 e 5 p.i., nas células T CD4⁺ convencionais (Figura 10).

Observamos que as moléculas ICOS e GITR coexpressam, apresentando aumentos de 6 e 11 vezes nos dias 4 e 5 p.i., respectivamente quando comparados com os controles (Figura 10 A). Observamos que a coexpressão da molécula OX40 com a molécula GITR apresenta aumento de 5 vezes no dia 4 p.i. e aumento de 7 vezes no dia 5 p.i. em relação aos controles (Figura 10 B). A molécula CD25 também coexpressa com GITR apresentando significância estatística no dia 5 p.i., com expressão aumentada em 13 vezes, em relação aos controles (Figura 10 C).

Figura 10 - Coexpressão das moléculas estimuladoras em células T CD4⁺ convencionais nos dias 0, 4 e 5 p.i. com *P. chabaudi*.

Camundongos C57BL/6 Foxp3GFP foram infectados com 10^6 EP e após remoção do baço e processamento das células por citometria de fluxo, as células foram analisadas com auxílio do software FlowJo, possibilitando a separação da população de células T CD4⁺ Foxp3⁻ (T convencionais). E obtivemos a coexpressão porcentagem de células que estão coexpressando a molécula ICOS (A), OX40 (B) e CD25 (C) com a molécula GITR no curso da infecção. Os gráficos representam a média de fluorescência da coexpressão das moléculas. Os dados representam 2 experimentos realizados (n=3). Os asteriscos acima das linhas representam as diferenças significantes entre as barras indicadas com *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Para confirmar a coexpressão das moléculas e inferir que as células T CD4⁺ convencionais estão expressando simultaneamente as moléculas GITR, OX40, ICOS e CD25 delimitamos o campo da coexpressão, e a partir deste investigamos a presença das moléculas estimuladoras, tendo como controle células negativas para coexpressão (Figura 11 A). Avaliamos também a expressão de Foxp3 como controle negativo para as células T CD4⁺ convencionais (Figura 11 B). A análise individual de cada molécula mostra que estas estão presentes na mesma população celular, e

com diferenças estatísticas em relação aos controles CD25, GITR, OX40 e ICOS (Figura 11 D – F).

A partir dos dados obtidos até aqui, podemos inferir que no início da infecção causada pelo *P. chabaudi*, as células respondedoras possuem um perfil de célula T CD4⁺ Foxp3⁻ CD25⁺ GITR⁺ OX40⁺ ICOS⁺. As células parecem requerer estas moléculas estimuladoras com maior intensidade já no dia 4 p.i., como mostram os histogramas referentes às moléculas CD25, GITR, OX40 e ICOS.

Figura 11 - Expressão simultânea das moléculas CD25, GITR, OX40 e ICOS pelas células T CD4⁺ convencionais.

Através do software Flowjo foram determinadas janelas para células T CD4⁺ convencionais obtidas do baço de camundongos controles e infectados com 10⁶ EP com *P. chabaudi*. Fizemos duas janelas de análise (A) para obter a expressão das moléculas CD25 (B), Foxp3 (C), GITR (D), OX40 (E) e ICOS (F). Os dados representam 2 experimentos realizados (n=3). Os asteriscos acima das linhas representam as diferenças significantes entre as barras indicadas com *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

4.4 Caracterização da coexpressão das moléculas estimuladoras na população de células T_{reg} durante a infecção ao *P. chabaudi*

Analisando a expressão das moléculas estimuladoras nas células T_{reg} na malária de fase aguda, verificamos que a porcentagem de células que coexpressam a molécula GITR com a molécula ICOS aumenta em 4 vezes no dia 4 p.i., e prossegue até o dia 5 p.i. (Figura 12 A). A porcentagem de células que coexpressam GITR e OX40 é semelhante entre os animais controles e infectados (Figura 12 B). A porcentagem de células que coexpressam GITR e CD25 é semelhante entre os animais controles e infectados (Figura 12 C).

Figura 12 - Coexpressão de moléculas estimuladoras nas células T_{reg} nos dias 0, 4 e 5 p.i. com *P. chabaudi*.

Camundongos C57BL/6 Foxp3GFP foram infectados com 10^6 EP e após remoção do baço e processamento das células por citometria de fluxo, as células foram analisadas com auxílio do software FlowJo, possibilitando a separação da população de células T CD4⁺ Foxp3⁺ (T_{reg}). Os gráficos representam a média de fluorescência da coexpressão da molécula GITR com a molécula ICOS (A), OX40 (B) e CD25 (C). Os dados representam 2 experimentos realizados (n=3). Os asteriscos acima das linhas representam as diferenças significantes entre as barras indicadas com *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001(n=3).

A porcentagem de células que coexpressam as moléculas GITR e CD25 aumenta significativamente nos animais infectados (Figura 12 C), este aumento que ocorre no dia 4 p.i., não sofre alteração até o dia 5 p.i..

Para verificar se a coexpressão das moléculas ICOS, GITR, OX40 e CD25 ocorre de forma simultânea na superfície das células T_{reg} , foram determinados parâmetros iguais às análises realizadas na população de células T $CD4^+$ convencionais. Delimitamos uma janela de análise dentro da população de células T_{reg} que expressam as moléculas ICOS e GITR (Figura 13 A). Verificamos que as células que coexpressam as moléculas GITR e ICOS também expressam a molécula CD25 com aumento de 3 vezes no dia 4 p.i. e aumento de 2,5 vezes no dia 5 p.i. (Figura 13 B). A expressão da molécula Foxp3 foi mensurada para confirmar o perfil celular (Figura 13 C). A expressão da molécula GITR dobrou nos animais infectados em comparação a expressão nos animais controles (Figura 13 D). As células que coexpressam ICOS e GITR apresentam uma expressão 3 vezes maior da molécula OX40 (Figura 13 E). Comparamos a expressão da molécula ICOS com as células negativas para esta molécula. Verificamos que entre o dia 4 e 5 p.i., há aumento significativo na expressão da molécula durante a infecção causada pelo *P. chabaudi* (Figura 13 F).

Figura 13 - Expressão simultânea das moléculas CD25, GITR, OX40 e ICOS nas células T_{reg} .

Através do software Flowjo foram determinadas janelas para células T_{reg} obtidas do baço de camundongos controles e infectados com 10^6 EP com *P. chabaudi* nos dias 4 e 5. Fizemos duas janelas de análise (A) para obter a expressão das moléculas CD25 (B), Foxp3 (C), GITR (D), OX40 (E) e ICOS (F). Os dados representam 2 experimentos realizados ($n=3$). Os dados representam 2 experimentos realizados ($n=3$). Os asteriscos acima das linhas representam as diferenças significantes entre as barras indicadas com * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

A partir dos dados obtidos, podemos sugerir que as células T_{reg} na fase inicial da malária induzida pelo *P. chabaudi* possuem um perfil de expressão celular: $T_{reg} CD4^+ Foxp3^+ CD25^+ ICOS^+ GITR^+ OX40^+$.

4.5 Correlação entre a expressão da molécula CD25 e a expressão das moléculas GITR, OX40 e ICOS

A molécula CD25 indiretamente sinaliza a captura de IL-2 do meio onde a célula está inserida. Tendo confirmado a expressão da molécula CD25 tanto em células T CD4⁺ convencionais como em células T_{reg} em resposta de fase aguda à malária, verificamos se o nível de expressão de CD25 poderia correlacionar com a expressão aumentada ou diminuída das moléculas GITR, OX40 e ICOS nas células TCD4⁺ convencionais (figura 14).

Para analisarmos a expressão das moléculas estimuladoras e correlacioná-las com a molécula CD25 foi construída uma janela de análise separando as células T CD4⁺ com alta e baixa expressão de CD25 (Figura 14 A). Dentro da janela de alta expressão da molécula CD25 foi requerido o histograma para as moléculas GITR, ICOS e OX40 (Figura 14 D-F) e como controle os histogramas para molécula CD25 e Foxp3 (Figura 14 B e C), os mesmos parâmetros foram aplicados para a janela com baixa expressão de CD25.

Ao compararmos os níveis de expressão dos animais controles com os infectados observamos maior diferença significativa das moléculas GITR, OX40 e ICOS no grupo de células com alta expressão de CD25 (Figura 14 D-F). Podemos sugerir com base neste experimento que as células T CD4⁺ convencionais que respondem na fase aguda da malária possui um perfil CD25^{hi}. As análises realizadas nas células T CD4⁺ convencionais com baixa expressão de CD25 verificamos que a partir do dia 5 p.i., parece surgir uma população com grande aumento na expressão da molécula ICOS (Figura 14 F), o que fornece indício de que esta molécula exerça um papel importante neste período de infecção.

Os dados até aqui fornecem indícios de que as células respondedoras à infecção pelo *P. chabaudi* que possuem maior expressão de CD25 apresentam maior expressão de moléculas estimuladoras. Talvez esta expressão aumentada de moléculas estimuladoras possa de alguma forma selecionar parte destas células para sobrevivência após o declínio da parasitemia e assim iniciar a manutenção de uma resposta mais específica.

Figura 14 - Correlação entre a expressão de CD25 com as moléculas Foxp3, GITR, OX40 e ICOS nas células T CD4⁺ convencionais, nos dias 0, 4 e 5 de infecção.

Após remoção e processamento do baço de camundongos C57BL/6 Foxp3⁺, os esplenócitos obtidos foram incubados com anticorpos monoclonais e analisados através de citometria de fluxo. Com auxílio do software FlowJo as moléculas foram quantificadas. Uma janela foi construída para separarmos as células com baixa e alta expressão da molécula CD25 (A). Dentro do parâmetro de baixa expressão foram requeridos histogramas para medirmos a expressão das moléculas CD25 (B), Foxp3 (C), GITR (D), OX40 (E) e ICOS (F). A mesma metodologia foi aplicada para o parâmetro de alta expressão da molécula CD25. Os dados obtidos representam 3 experimentos (n=3). Os asteriscos acima das linhas representam as diferenças significantes entre as barras indicadas com *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Tendo verificado a correlação entre a expressão da molécula CD25 com as moléculas estimuladoras presentes em células T CD4⁺ convencionais, partimos para análise do mesmo perfil nas células T_{reg} durante a resposta aguda ao *P. chabaudi* (Figura 15).

Figura 15 - Correlação entre a expressão de CD25 com a expressão das moléculas Foxp3, GITR, OX40 e ICOS nas células T_{reg}, nos dias 0, 4 e 5 de infecção.

Após remoção e processamento do baço de camundongos C57BL/6 Foxp3⁺, os esplenócitos obtidos foram incubados com anticorpos monoclonais e analisados através de citometria de fluxo. Com auxílio do software FlowJo as moléculas foram quantificadas. Uma janela foi construída para separarmos as células com baixa e alta expressão da molécula CD25 (A). Dentro do parâmetro de baixa expressão foram requeridos histogramas para medirmos a expressão das moléculas CD25 (B), Foxp3 (C), GITR (D), OX40 (E) e ICOS (F) a expressão de ICOS é demonstrada a partir do 0. A mesma metodologia foi aplicada para o parâmetro de alta expressão da molécula CD25. Os dados representam 3 experimentos (n=3). Os asteriscos acima das linhas representam as diferenças significantes entre as barras indicadas com *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 (n=3).

A molécula CD25 é utilizada como marcador de células T_{reg}, em diversos trabalhos de investigação, entretanto queremos verificar se há correlação significativas entre o nível de expressão desta molécula com a expressão das moléculas estimuladoras ICOS, GITR e OX40. Analisando as janelas de alta e baixa

expressão da molécula CD25 notamos que não há uma diferença tão acentuada no nível de expressão desta molécula, como ocorre nas células T CD4⁺ convencionais de camundongos controles e infectados (Figura 15A). Quantificamos o MFI das moléculas CD25 e Foxp3 como parâmetros para análise e controle positivo para as células T_{reg} respectivamente (Figura 15 B-C). Dentro das janelas de alta e baixa expressão de CD25 avaliamos a molécula GITR e verificamos que há diferença significativa entre os níveis de expressão nas células dos animais infectados com alta expressão de CD25 em relação às células com baixa expressão de CD25 (Figura 15 D). O mesmo ocorreu com relação à expressão da molécula OX40 (Figura 15 E). A molécula ICOS apresenta cinética de expressão semelhante entre as células T_{reg} com alta e baixa expressão da molécula CD25, porém, observamos que a expressão da molécula ICOS é maior nas células com maior expressão de CD25 (Figura 15 F). Os dados até aqui apontam que, apesar de haver uma diferença estatística entre os pontos esta se deve mais ao fato do curso da doença como a parasitemia do que a correlação com a expressão da molécula CD25 nas células T_{reg}.

4.6 Expressão das moléculas estimuladoras durante o pico de parasitemia e após seu declínio

No intuito de obter maior compreensão do efeito das moléculas estimuladoras ICOS, OX40 e GITR no modelo de infecção causada pelo *P. chabaudi*, analisamos a expressão destas moléculas no dia 7 p.i. e no dia 14 p.i.. A expressão da molécula GITR aumenta em 2 vezes no dia 7 p.i., e continua aumentada no dia 4 p.i. nas células T CD4⁺ convencionais e não apresenta diferença significativa nas células T_{reg} (Figura 16 A).

A cinética de expressão da molécula OX40 apresenta parâmetros semelhantes nas células T CD4⁺ convencionais e T_{reg}, porém a expressão nas células T_{reg} é aproximadamente 4 vezes maior do que os níveis encontrados nas células T CD4⁺ convencionais (Figura 16 B). A expressão da molécula ICOS está aumentada no dia 7 p.i., tanto nas células TCD4⁺ convencionais quanto nas células T_{reg}, em ambas as populações ocorre redução na expressão do dia 14 p.i. (Figura 16

C). Podemos observar que a média de expressão da molécula ICOS é semelhante entre as duas populações celulares estudadas, principalmente no dia 14 p.i..

Figura 16 - Expressão das moléculas estimuladoras GITR, OX40 e ICOS em células T CD4⁺ convencionais e T_{reg} nos dias 0, 7 e 14 p.i..

Após remoção e processamento do baço de camundongos C57BL/6 Fcγp3⁺ os esplenócitos obtidos foram incubados com anticorpos monoclonais e analisados através de citometria de fluxo. Com auxílio do software FlowJo as moléculas foram quantificadas. Uma janela foi construída para separarmos as células Fcγp3⁺ e Fcγp3⁻. Dentro de cada perfil celular foi requisitado o histograma para as moléculas GITR (A), OX40 (B) e ICOS (C). Os dados representam 4 experimentos (n=3). Os asteriscos acima das linhas representam as diferenças significantes entre as barras indicadas com *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

4.7 Determinação do perfil da expressão de moléculas inibidoras presentes nas células T CD4⁺ convencionais e células T_{reg}

Com o intuito de adquirir uma melhor compreensão sobre a biologia das células T CD4⁺ convencionais e T_{reg} na resposta de fase aguda à infecção causada pelo *P. chabaudi*, analisamos a expressão das moléculas inibidoras PD-1, PD-L1 e CTLA-4 (Figura 16). Junto à análise das moléculas inibidoras, avaliamos indiretamente a capacidade de migração das células respondedoras através da expressão da moléculas CD62-L.

Figura 17 - Expressão das moléculas inibidoras PD-1, PD-L1 e CTLA-4 nas células T CD4⁺ convencionais durante a resposta de fase aguda ao *P. chabaudi*.

Camundongos C57BL/6 Foxp3GFP foram infectados com 10⁶ EP e após remoção do baço e processamento das células por citometria de fluxo, as células foram analisadas com auxílio do software FlowJo. Os gráficos representam a porcentagem de células que coexpressam as moléculas PD-1 (A), PD-L1 (B) e CTLA-4 (C) em associação ou não com a molécula CD62-L. Os dados são representativos de 2 experimentos (n=2). Os asteriscos acima das linhas representam as diferenças significantes entre as barras indicadas com *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

A molécula CD62-L é expressa com maior intensidade nas células que estão efetuando migração para os órgãos linfoides, que indiretamente indica que esta célula não está sendo requerida no local da infecção. Verificamos que no início da infecção há aumento da expressão da molécula PD1 e há diferença significativa no número de células que coexpressam CD62-L e as que são negativas para esta molécula (Figura 17 A). Ao avaliarmos a expressão de PD-L1, notamos que a maior parte das células T CD4⁺ convencionais que expressam PD-L1 também expressa a molécula CD62-L na fase inicial da malária (Figura 17 B). A expressão da molécula CTLA-4 não apresentou diferença estatística entre as células do camundongo controle e do infectado, o mesmo ocorrendo em relação à porcentagem de células que coexpressam CTLA-4 e CD62-L (Figura 17 C).

Após verificarmos os níveis de expressão das moléculas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 nas células T CD4⁺ convencionais durante a malária de fase aguda, utilizamos os mesmos parâmetros para analisarmos as células T_{reg}. A expressão de PD-1 nas células T_{reg} que coexpressam a molécula CD62-L é equivalente nos camundongos controles e naqueles do dia 5 p.i.. Enquanto as células T_{reg} que expressam PD-1 e são negativas para CD62-L são mais frequentes nos animais controles em relação aos camundongos no dia 5 p.i. (Figura 18 A). Isso parece ocorrer devido ao aumento das porcentagens das células T_{reg} que expressam CD62-L nessa fase da infecção, diferentemente do que ocorre com as células T CD4⁺ convencionais que apresentam redução da expressão de CD62-L no mesmo período.

Semelhante aos dados encontrados nas células T CD4⁺ convencionais, a porcentagem das células T_{reg} que expressam PD-L1 se mostrou aumentada nas células dos animais infectados com *P. chabaudi*, isto vale para as células que coexpressam CD62-L e as que são negativas para esta molécula (Figura 18 B). A expressão da molécula CTLA-4 não apresentou significância estatística entre as células dos animais controles e infectados (Figura 18 C).

Figura 18 - Expressão das moléculas inibidoras PD-1, PD-L1 e CTLA-4 nas células T_{reg} durante a resposta de fase aguda ao *P. chabaudi*.

Camundongos C57BL/6 Foxp3GFP foram infectados com 10^6 EP e após remoção do baço e processamento das células por citometria de fluxo, as células foram analisadas com auxílio do software FlowJo, possibilitando a separação da população de células T_{reg}. Os gráficos representam a porcentagem de células que coexpressam as moléculas PD-1 (A), PD-L1 (B) e CTLA-4 (C) em associação ou não com a molécula CD62-L. Os dados representam 2 experimentos (n=2). Os asteriscos acima das linhas representam as diferenças significantes entre as barras indicadas com *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

4.8 Expressão de PD-1 e PD-L1 nos dias 0, 7 e 14 de infecção

Após constatar a diferença estatística entre a expressão das moléculas PD-1 e PD-L1 no início da infecção causada pelo *P. chabaudi*, analisamos a expressão destas moléculas nas células T CD4⁺ convencionais durante o pico da parasitemia e após seu declínio (Figura 19).

Figura 19 - Análise da expressão e coexpressão das moléculas inibidoras PD-1, PD-L1 nas células T CD4⁺ convencionais nos dia 0, 7 e 14 p.i. com o *P. chabaudi*.

Camundongos C57BL/6 Foxp3GFP foram infectados com 10^6 EP e após remoção do baço e processamento das células por citometria de fluxo, as células foram analisadas com auxílio do software FlowJo, possibilitando a separação da população de células T CD4⁺ Foxp3⁻ (T convencionais). Mensuramos a porcentagem de células que expressam PD-1 (A), PD-L1 (B) e a expressão simultânea de PD-1 e PD-L1 (C). Os dados são representativos de 3 experimentos (n=3). Os asteriscos acima das linhas representam as diferenças significantes entre as barras indicadas com *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Verificamos que a molécula PD-1 apresenta uma cinética de expressão com aumento de 3 vezes das porcentagens de células PD1⁺PD-L1⁻ no dia 7 p.i. e de 5 vezes no dia 14 p.i., quando comparados com os controles (Figura 19 A). Durante o pico da parasitemia verificamos que grande parte das células T CD4⁺ convencionais estão expressando a moléculas PD-L1, com porcentagem de células PD1⁻PD-L1⁺ 8 vezes maior do que os camundongos controles (Figura 19 B). Após o declínio da parasitemia e do número de células (Figura 4 D), essa porcentagem é o dobro da observada no controle (Figura 19 B). Ao analisarmos a coexpressão das moléculas

PD-1 e PD-L1 verificamos que no dia 7 p.i., a porcentagem de células com este fenótipo aumenta em 6 vezes com relação ao controle (Figura 19 C). Mesmo após o declínio da parasitemia e redução no número de células (Figura 4 D), verificamos que grande parte das células remanescentes continua coexpressando estas moléculas no dia 14 p.i., pois não há diferença estatística entre o dia 7 e 14 p.i. (Figura 19 C).

Figura 20 - Análise da expressão e coexpressão das moléculas inibidoras PD-1, PD-L1 nas células T_{reg} nos dia 0, 7 e 14 p.i. com o *P. chabaudi*.

Camundongos C57BL/6 Foxp3GFP foram infectados com 10⁶ EP e após remoção do baço e processamento das células por citometria de fluxo, as células foram analisadas com auxílio do software FlowJo, possibilitando a separação da população de células T_{reg}. Mensuramos a porcentagem de células que expressam PD-1 (A), PD-L1 (B) e a expressão simultânea de PD-1 e PD-L1 (C). Os dados são representativos de 3 experimentos (n=3). Os asteriscos acima das linhas representam as diferenças significantes entre as barras indicadas com *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 (n=3).

Após verificarmos a expressão das moléculas PD-1 e PD-L1 nas células T CD4⁺ convencionais, utilizamos os mesmos parâmetros para analisarmos este perfil de moléculas inibidoras nas células T_{reg}. Observamos que as porcentagens de células T_{reg} que possuem alta expressão da molécula PD-1 são maiores nos

camundongos controles quando comparadas com aquelas dos animais infectados (Figura 20 A).

A porcentagem de células que expressam apenas PD-1 é diminuída em 5 vezes durante o pico da parasitemia, tendo uma pequena elevação no dia 14 p.i., com expressão 2,8 vezes menor (Figura 20 A), sugerindo que a sinalização via PD-1 x PD-L1 possa ser um dos mecanismos efetores para queda do número de células TCD4⁺ convencionais e T_{reg} vistos na fase inicial destes experimentos (Figura 4 C e D). Em comparação com as células dos camundongos controles, a porcentagem de células que expressam apenas PD-L1 é 6 vezes maior durante o pico da parasitemia, e sofre uma redução na expressão do dia 14 p.i. (Figura 20 B).

Observando a coexpressão das moléculas PD-1 e PD-L1 nas células T_{reg}, constatamos que animais controles apresentam um nível basal de coexpressão. Este nível de coexpressão aumenta em 3 vezes no dia 7 p.i., e reduz pela metade no dia 14 p.i. (Figura 20 C).

4.9 Análise *in vitro* da proliferação de esplenócitos

Com base nos dados *in vivo* da expressão das moléculas estimuladoras no início da infecção pelo *P. chabaudi*, verificamos *in vitro* a influência da inibição das moléculas ICOS e OX40 na proliferação das células T CD4⁺ convencionais e T_{reg} na fase inicial da malária. As células foram retiradas da cultura após 48 e 72 h de estímulo e as populações de células T CD4⁺ convencionais e T_{reg} foram avaliadas separadamente (Figura 21 A-B). Após 48h de proliferação observamos que a inibição da molécula ICOS interferiu de forma semelhante nas duas populações celulares, quando comparado à proliferação na presença de EP sem inibição (Figura 21 A-B). Após 72 h de estímulo a proliferação das células T_{reg} com a inibição da molécula ICOS, apresenta redução de 2 vezes no número de células (Figura 21 B). Quando comparamos os dados da proliferação das células T CD4⁺ convencionais após 72 h com os dados da proliferação das células T_{reg} no mesmo período, verificamos que as células T_{reg} têm a proliferação mais reduzida pela inibição da molécula ICOS (Figura 21 A-B).

A inibição da molécula OX40 interferiu de forma acentuada nas duas populações celulares, nas células T CD4⁺ convencionais observamos uma redução

de mais de 4 vezes no número de células já nas 48 h (figura 21 A), enquanto no mesmo período a as células T_{reg} apresentam redução de mais de 5 vezes no número de células com a inibição (Figura 21 B). Com 72 h de proliferação e inibição da molécula OX40 as T CD4⁺ convencionais apresentam uma redução de 3 vezes no número de células, enquanto as células T_{reg} apresentam o número de células reduzido em até 7 vezes (Figura 21 A-B).

Com base nos dados até aqui podemos verificar que as moléculas estimuladoras ICOS e OX40 estão expressas nos primeiros dias da infecção causada pelo *P. chabaudi*, e são importantes para os mecanismos de proliferação das células T CD4⁺ convencionais e T_{reg} estimuladas com EP (Figura 21).

Figura 21 - Proliferação de células T CD4⁺ convencionais e T_{reg} com marcação intracelular para proliferação, com e sem inibição das moléculas ICOS e OX40.

Camundongos C57BL/6 Foxp3⁺ foram infectados com 10⁶ EP e após remoção do baço e processamento das células em ambiente estéril, as células foram colocadas em cultura por 48 e 72h sem e com inibição de moléculas. As células cultivadas com os inibidores foram estimuladas com EP na proporção de 3 EP para cada linfócito (3:1). Após o período de cultura, as células foram processadas e analisadas por citometria de fluxo para avaliar a perda da fluorescência da marcação intracelular pelo CellTrace™ Violet Cell Proliferation. Com auxílio do software FlowJo foram feitas janelas para separar as duas populações e analisar a proliferação nas células T efectoras (A) e nas células T_{reg} (B) com 48 e 72h de estímulo. Dados representativos de 3 experimentos (n=3).

4.10 Separação de células T_{reg} ICOS⁺ e ICOS⁻ e ensaio de inibição da proliferação de células T CD4⁺ convencionais

Células T CD4⁺ convencionais e células T_{reg} foram separadas através de citometria de fluxo. As células T_{reg} foram separadas nas populações T_{reg} ICOS⁺ e T_{reg} ICOS⁻ e todas as células foram submetidas à marcação nuclear com o kit CellTrace

Violet para avaliar a multiplicação celular. Células T CD4⁺ convencionais colocadas em cultura sob estímulo de α -CD3 apresentam taxa de proliferação aumentada em relação às células não estimuladas (Figura 22 A). Para avaliar a capacidade de inibição das células T_{reg} ICOS⁺ e T_{reg} ICOS⁻ sobre as células T CD4⁺ convencionais estimuladas com α -CD3, adicionamos os dois perfis de células T_{reg} em diferentes concentrações.

Podemos observar que as culturas com células T_{reg} ICOS⁺ apresentam menor atividade de divisão das células T CD4⁺ convencionais, na proporção 1:2, 1:4 e 1:8 os resultados encontrados são menores do que os dados do controle. À medida que aumentamos o número de células T CD4⁺ convencionais para cada célula T_{reg} a capacidade de inibir a proliferação é proporcionalmente reduzida (Figura 22 B). Quando células T_{reg} ICOS⁻ são adicionadas nas culturas constatamos que a capacidade de inibição é menor quando comparada com os dados das células T_{reg} ICOS⁺. Observamos que na proporção 1:2 das células T_{reg} ICOS⁻ a taxa de proliferação é maior do que a encontrada na proporção 1:8 das células T_{reg} ICOS⁺ (Figura 22 C-B).

Podemos deduzir que as células T_{reg} ICOS⁺ exercem poder de supressão sobre as células respondedoras na malária de fase aguda causada pelo *P. chabaudi* e que a proporção no número de células T_{reg} em relação às células T CD4⁺ convencionais é importante neste mecanismo.

Figura 22 - Ensaio de proliferação das células T_{reg} mediado por células $ICOS^+$ e $ICOS^-$ marcadas com CellTrace Violet.

Estes resultados foram obtidos em colaboração com Érika Machado de Salles. Camundongos C57BL/6 $Foxp3^+$ foram infectados e sacrificados no dia 4 p.i. os esplenócitos obtidos foram incubados em placa e marcados com o kit CellTrace Violet. Os esplenócitos em cultura estavam sem e com estímulo de anti-CD3 (A). Os esplenócitos estimulados com anti-CD3 receberam quantidades diferentes de células T_{reg} $ICOS^+$ (B) e T_{reg} $ICOS^-$ (C), obtendo as concentrações 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16. Dados representativos de 1 experimento (n=3).

Após verificar o perfil de proliferação das células T $CD4^+$ convencionais sob a inibição das células T_{reg} $ICOS^+$ e $ICOS^-$ analisamos o sobrenadante destas culturas para verificarmos os níveis de IFN- γ produzido (Figura 23). Os níveis de IFN- γ produzido pelas células estimuladas com α -CD3 é 12 vezes maior do que os níveis produzidos pelas células não estimuladas com α -CD3. Mensurando os níveis de IFN- γ obtidos pelas células estimuladas sob inibição das células T_{reg} $ICOS^+$ verificamos uma redução de 7,5 vezes na proporção 1:1, redução de 5,5 vezes na proporção 1:2, redução de 2 vezes na proporção 1:4 e redução de 1 vez na proporção 1:8 quando comparados com o controle.

Ao mensurarmos os níveis de IFN- γ do sobrenadante das células estimuladas sob a inibição de células T_{reg} ICOS⁻ verificamos que na proporção 1:1 ocorre redução nos níveis de IFN- γ em 1,5 vezes, comparado com o controle. E nas demais proporções à média dos níveis de IFN- γ é uma redução em 1 vez, comparado com o controle.

Ao compararmos a produção de IFN- γ pelas células que estavam sob a inibição das células T_{reg} ICOS⁻ com os níveis de IFN- γ encontrados pela inibição das células T_{reg} ICOS⁺, podemos deduzir que as células T_{reg} que expressam a molécula ICOS exercem um papel importante na resolução dos efeitos de fase aguda decorrentes da grande ativação de células T CD4⁺ convencionais.

Figura 23 - Quantificação de IFN- γ após ensaio de inibição da proliferação pelas células T_{reg} ICOS⁺ e ICOS⁻.

Estes resultados foram obtidos em colaboração com Érika Machado de Salles. Utilizando o método de ELISA para quantificarmos a expressão de IFN- γ observamos que as células T CD4⁺ em cultura com células APCs apresentam produção de IFN- γ na ordem de 600 pg/ml, e quando adicionamos o estímulo de α -CD3 na cultura a produção de IFN- γ chega a 8500 pg/ml aproximadamente. As células T_{reg} ICOS⁺ reduzem a produção de IFN- γ quase para o nível basal na proporção 1:1. A produção de IFN- γ aumenta quando aumentamos o número de células T CD4⁺ convencionais para cada T_{reg} na cultura. Dados representativos de 1 experimento (n=3).

No intuito de integrar as informações obtidas pelas análises das diferentes moléculas estudadas no decorrer das infecções causadas pelo *P. chabaudi*,

reunimos as informações relativas à porcentagem de células expressando cada molécula: ativadora ou inibidora (Figura 24) nas células T CD4⁺ convencionais e T_{reg}.

Figura 24 - Cinética das moléculas ativadoras e inibidoras presente em células T CD4⁺ convencionais e T_{reg}.

Demonstração da distribuição cinética do número de células do dia 0 ao dia 14 p.i., pelo *P. chabaudi*, seguido pela ilustração das moléculas ICOS, OX40, GITR, CD25, PD-1, PD-L1 e CTLA-4, presentes em células T CD4⁺ Foxp3⁻ e células T CD4⁺ Foxp3⁺ durante os mesmos períodos.

5 DISCUSSÃO

Na malária causada pelo *P. chabaudi* ocorre um aumento significativo da parasitemia a partir do dia 4 p.i., que atinge o pico de aproximadamente 50% de EP no dia 7 p.i., sendo que entre esse período também se observa intensa multiplicação de células T CD4⁺ do baço (Zago et al., 2012). A expansão dessa população inclui tanto as células T CD4⁺ convencionais como as células T_{reg} (Zago et al., 2012). Confirmando esses estudos, observamos que nos primeiros dias de infecção ao *P. chabaudi* ocorre o aumento no número de células T CD4⁺ convencionais e células T_{reg} no baço dos camundongos. Além disso, como descrito anteriormente (Muxel et al., 2011; Zago et al., 2012), os números de células T CD4⁺ de ambas subpopulações sofrem grande redução após o pico da parasitemia. Evidenciamos também o aumento do número de esplenócitos totais no decorrer da infecção. Este aumento foi descrito em estudos anteriores (Helmby et al., 2000), e parece ser devido principalmente ao crescimento da população de células fagocíticas do sistema imune inato que contribuem para reduzir a parasitemia (Sponaas et al., 2009).

Para compreender melhor os mecanismos envolvidos no aumento dos números de células T CD4⁺ convencionais e T_{reg} nos primeiros dias de infecção na malária aguda causada pelo *P. chabaudi*, investigamos a contribuição das moléculas ativadoras: GITR, ICOS, OX40 e CD25, e das moléculas inibidoras: PD-1, PD-L1 e CTLA-4 durante este processo.

Os nossos resultados mostram que as células T CD4⁺ convencionais apresentam uma expressão aumentada das moléculas ICOS, OX40, CD25 e GITR nos primeiros dias da infecção causada pelo *P. chabaudi*. Em relação a esta população, as células dos animais do dia 4 p.i. apresentam maior expressão da molécula ICOS, quando comparadas com as células dos animais controles. Os experimentos apontam que o pico de expressão da molécula ICOS é precoce ocorrendo no dia 5 p.i.. Entretanto, quando inibimos esta molécula em cultura, notamos que não houve redução tão drástica na porcentagem de células T CD4⁺ convencionais que proliferam em resposta a EP. Este fato pode estar relacionado com o papel central da molécula ICOS na interação das células T com as células B (Mahajan et al., 2007). Isto é, na malária, a interação ICOS-ICOSL pode não ser

essencial para a proliferação inicial das células T CD4⁺ convencionais que é estimulada pelas células dendríticas, mas pode estar particularmente envolvida com a ativação das células B. De fato, trabalhos do nosso laboratório relacionados à interação das células T:B mostram que a interação ICOS-ICOSL é fundamental para a proliferação das células B e para a produção de anticorpos (Castillo-Méndez, *et al.*, dados não publicados).

Constatamos ainda que diferente da molécula ICOS, a expressão da molécula OX40 não apresenta diferença significativa entre as células T CD4⁺ convencionais dos animais controles e dos infectados do dia 4 p.i., com pico de expressão ocorrendo no dia 7 p.i.. Entretanto, quando inibimos a molécula OX40 *in vitro*, observamos que a ausência de sinalização via OX40 resultou em grande redução no número de células T CD4⁺ convencionais que proliferam em resposta a EP. Estes dados fornecem indícios de que a molécula OX40 é essencial para a expansão da população de células T CD4⁺ convencionais que é observada na fase aguda da resposta imune ao *P. chabaudi*.

Esta diferença substancial entre as moléculas ICOS e OX40 pode estar relacionada às vias de sinalização celular. Assim, na literatura encontramos diversos trabalhos relacionados à ativação de células pela transmissão de sinais intracelulares através da molécula fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), resultando em uma vasta gama de efeitos biológicos, síntese de citocinas e proliferação celular (Vanhaesebroeck et al., 2010). A sinalização através das moléculas ICOS e OX40 converge para essa via de sinalização. A via da PI3K pode ser super estimulada quando acionada através de diferentes receptores. Assim, na resposta *in vitro* das células T CD4⁺ convencionais a EP, é possível que mesmo inibindo uma via, o reforço oriundo de outro sinal compense a ausência do primeiro, e talvez por isso a inibição da molécula ICOS não tenha surtido tanto efeito sobre a proliferação. Por outro lado, os nossos dados indicam que a estimulação através da molécula OX40 é particularmente importante nesse processo, não podendo ser compensada por outras vias de sinalização. Apoiando esses resultados, foi mostrado anteriormente que o tratamento *in vivo* com anticorpos anti-OX40 inibe substancialmente a produção de IFN- γ na fase da infecção pelo *P. chabaudi* (Franklin et al., 2007).

Trabalhos realizados no laboratório mostram a existência de proliferação celular na ausência de sinais importantes durante a resposta imune ao *P. chabaudi*.

Assim, inibindo a ação da IL-2 com uso de anticorpos específicos, as células T CD4⁺ efectoras exerciam atividades normais sem alterações na proliferação e na produção de IFN- γ (Zago et al., 2012). A ausência da molécula CD28, utilizando camundongos nocautes, demonstrou que no baço destes animais, as células T e B estão em números normais, com formação de resposta humoral policlonal IgM eficiente e IgG2a parcialmente reduzida (Elias et al., 2005). Porém, a resposta humoral específica IgG2a e IgG1 era praticamente ausente nos camundongos CD28 nocautes. Com isso vemos que a molécula CD28 é essencial para a maturação da afinidade dos anticorpos e também auxilia na mudança de classe, mas não exerce função determinante na proliferação das células T CD4⁺ durante a fase aguda da infecção. Além disso, de acordo com os dados obtidos em nosso laboratório, a molécula ICOS exerce forte influência na ativação das células B (Castillo Méndez et al., dados não publicados) e que a inibição da sinalização via PD-1-PD-L1 aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias (Pereira-Severi, *et al.* dados não publicados).

Com isso sugerimos que a sinalização via OX40 exerce papel fundamental na proliferação das células T CD4⁺ convencionais. Pois a ausência desta sinalização parece não ser substituída totalmente por uma sinalização derivada de outro sinal. Na literatura foi demonstrado que o coestímulo da molécula OX40 em células T CD4⁺ estimuladas por antígeno, é importante para a fosforilação das moléculas PI3K e AKT (Song et al., 2004). Já foi demonstrado que a expressão da molécula OX40 é importante para sobrevivência de células T CD4⁺ após terapia para depleção policlonal em estudos de transplantes, sendo importante também para a proliferação das células T CD4⁺ efectoras (Kroemer et al., 2007). Estudos relacionados a dermatites mostram que ocorre aumento na expressão da molécula OX40 e OX40L nos locais com dermatite atópica e psoríase, mas, não há correlação entre a severidade da doença e a expressão das moléculas (Ilves, Harvima, 2013).

É interessante que juntamente com a molécula OX40 a expressão da molécula GITR se mantenha elevada após a queda da parasitemia e redução no número de células. Este dado fornece novas ferramentas de investigação para avaliar melhor a importância desta molécula durante a resposta aguda ao *P. chabaudi*, já que a molécula GITR apresenta uma cinética de aumento até o dia 14 p.i..

Quanto à expressão de moléculas com efeitos inibidores, observamos maior aumento na expressão da molécula PD-1 no dia 14 p.i., sendo este o dia com menor número de células T CD4⁺ convencionais nos animais infectados. Este dado sugere que a via PD-1/PD-L1, seja um mecanismo supressor importante no baço durante a resposta desencadeada pela infecção pelo *P. chabaudi*. Dados obtidos no laboratório sugerem que a expressão de PD-1 pode não controlar a proliferação, mas, quando a molécula é inibida ocorre maior produção de IFN- γ (Pereira-Severi et al., dados não publicados). As análises realizadas mensurando a porcentagem de células expressando a molécula CTLA-4 em diferentes dias de infecção mostraram não haver diferença significativa entre os animais controles e infectados. Mensuramos em diferentes períodos da infecção nos dias 3, 6, 10, 12 e 14 (dados não mostrados), obtendo resultados semelhantes aos descritos no trabalho, tanto para as células T CD4⁺ convencionais como T_{reg}. Na literatura muitos trabalhos mostram níveis aumentados da molécula CTLA-4 intracelular, persistimos na marcação extracelular com o intuito de averiguarmos quais moléculas estimuladoras ou inibidoras estão modulando a resposta através de sua expressão na superfície das células T CD4⁺ convencionais e T_{reg}.

Analisando as células T_{reg}, observamos alta expressão das moléculas ICOS e OX40 já no dia 4 p.i., ambas as moléculas apresentam pico de expressão no dia 7 p.i. Quando inibimos a molécula OX40 *in vitro* observamos grande redução na capacidade proliferativa das células T_{reg}. Entretanto este fato pode ser reflexo de uma supressão indireta, relacionado à disponibilidade de IL-2 no meio, devido a redução da proliferação das células T CD4⁺ convencionais mediada pela inibição de OX40. Os resultados mostram que as células T_{reg} aumentam a expressão da molécula CD25 em 3 vezes após a infecção e estas dependem da IL-2 produzida pelas células T CD4⁺ convencionais, como mostrado anteriormente (Zago et al., 2012). Então, mesmo que a redução no número de células T CD4⁺ convencionais não seja tão acentuado quanto o apresentado pelas células T_{reg} através da inibição da molécula OX40, pode acarretar em um desequilíbrio na proporção de células T_{reg}, podendo ser uma causa provável para os resultados obtidos.

Ao inibirmos a molécula ICOS observamos redução na proliferação das células T_{reg} mas, sem o mesmo impacto observado pela inibição de OX40. Há trabalhos que mostram a importância da molécula ICOS para a proliferação das

células T_{reg} na presença de antígeno, enquanto camundongos nocautes para molécula ICOS não apresentam aumento no número de células T_{reg} após estímulo (Busse et al., 2012). Tendo este questionamento a respeito da inibição da molécula ICOS, buscamos avaliar a capacidade efetora em células T_{reg} ICOS⁺ em teste de supressão da proliferação. As células T_{reg} ICOS⁺ na relação 1:8 com as células T CD4⁺ convencionais exerceram a sua atividade supressora com níveis de proliferação menores do que os níveis encontrados pelas células T_{reg} ICOS⁻ na proporção 1:2. Os dados sugerem que as células T_{reg} ICOS⁺ são importantes para regulação da proliferação das células T CD4⁺ convencionais.

Esta atividade supressora aumentada das células T_{reg} ICOS⁺, corrobora com estudos que demonstram a ação da molécula ICOS como indutora de regulação (Chen et al., 2012). Os dados relacionados à produção de IFN- γ confirmam a capacidade inibidora das células T_{reg} ICOS⁺, ressaltando a importância do número adequado de células T_{reg} para que ocorra efetiva regulação da resposta imune. Com relação à molécula GITR observamos que ela é constitutivamente expressa nas células T_{reg} apresentando níveis de expressão aumentados mesmo nas células dos camundongos controles, de forma semelhante à molécula CD25, e não apresenta mudança expressiva no decorrer da fase aguda da infecção. Enquanto a expressão da molécula GITR nas células T CD4⁺ convencionais aumenta progressivamente e mantém nível elevado mesmo no dia 14 p.i.

Verificamos que na população de células T_{reg} ocorre aumento na porcentagem de células expressando a molécula PD-L1 no dia 7 p.i., enquanto as porcentagens de células com simples expressão de PD-1 encontram-se significativamente reduzidas em relação aos controles. Podemos sugerir que a interação entre o ligante PD-L1 expresso nas T_{reg} esteja interagindo com a molécula PD-1 nas células T CD4⁺ convencionais. Isso, poderia favorecer a morte celular que se inicia a partir do dia 8 p.i. (Zago et al., 2012). Talvez a diminuição da molécula PD-1 aumente a probabilidade de sobrevivência das células T_{reg} por incapacitá-las de interagir com os ligantes expressos pelas células apresentadoras. Os níveis de PD-L1 também estão altos nas células T CD4⁺ convencionais, fornecendo indícios de que o baço seja um ambiente regulatório para malária induzida pelo *P. chabaudi*.

Foi demonstrado na literatura que as células T_{reg} presentes nos tecidos aceleram a reconstituição deste, sendo que em caso de reincidência as células T_{reg}

possuem diversas características de células efetoras de memória, com crescimento sem presença do antígeno, permanência em órgãos não linfoides e moléculas de superfície que resultam em ativação. (Rosenblum et al., 2011). Talvez a diminuição da expressão da molécula PD-1 nas células T_{reg} ativadas tenha uma correlação com a regulação e manutenção do ambiente onde a resposta é desenvolvida.

Com base nos dados obtidos, observamos que durante a infecção causada pelo *P. chabaudi*, ocorre expansão das populações de células T CD4⁺ convencionais e células T_{reg} a partir do dia 4 de infecção, com aumento na expressão de moléculas semelhantes em ambas populações, com distinção no tempo de expressão durante toda a resposta de fase aguda desencadeada pelo *P. chabaudi*. Considerando os dados em conjunto, podemos concluir que a modulação da resposta imune à malária causada pelo *P. chabaudi* requer a ação de várias moléculas ativadoras e reguladoras, que muitas vezes são expressas de forma concomitante. A expressão orquestrada de cada uma dessas moléculas permite o desenvolvimento das várias etapas da resposta imune na malária.

6. CONCLUSÕES

- As células T_{reg} são estimuladas a proliferarem já nos primeiros dias de infecção ao *P. chabaudi*;
- As moléculas estimuladoras GITR, OX40, ICOS são induzidas precocemente em resposta ao parasita, tanto em células T $CD4^+$ convencionais como nas células T_{reg} ;
- As células T $CD4^+$ convencionais estimuladas com EP em cultura sob inibição da molécula OX40, apresentaram menor capacidade de proliferação do que as células inibidas com α -ICOS;
- As células T_{reg} que expressam a molécula ICOS exercem maior supressão sobre as células que estão em expansão durante a fase aguda da malária induzida pelo *P. chabaudi*.
- As moléculas inibidoras PD-1 e PD-L1 são expressas nas células T $CD4^+$ convencionais e T_{reg} , já no início do desenvolvimento da resposta aguda desencadeada pelo *P. chabaudi*.
- Através do exposto parece que as células T_{reg} não modulam a resposta aguda ao *P. chabaudi*, pela ativação da molécula CTLA-4.

REFERÊNCIAS*

- Anderson MS, Venanzi ES, Chen Z, Berzins SP, Benoist C, Mathis D. The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity*. 2005;23(2):227-39.
- Barnes MJ, Griseri T, Johnson AM, Young W, Powrie F, Izcue A. CTLA-4 promotes Foxp3 induction and regulatory T cell accumulation in the intestinal lamina propria. *Mucosal Immunol*. 2013;6(2):324-34.
- Barnwell JW, Asch AS, Nachman RL, Yamaya M, Aikawa M, Ingravall P. A human 88-kD membrane glycoprotein (CD36) functions in vitro as a receptor for a cytoadherence ligand on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Clin Invest*. 1989;84(3):765-72.
- Bhadra R, Gigley JP, Weiss LM, Khan IA. Control of *Toxoplasma* reactivation by rescue of dysfunctional CD8+ T-cell response via PD-1-PDL-1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(22):9196-201.
- Bianchini R, Bistoni O, Alunno A, Petrillo MG, Ronchetti S, Sportoletti P, Bocci EB, Nocentini G, Gerli R, Riccardi C. CD4(+) CD25(low) GITR(+) cells: a novel human CD4(+) T-cell population with regulatory activity. *Eur J Immunol*. 2011;41(8):2269-78.
- Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *J Exp Med*. 1990;172(1):379-82.
- Blank C, Gajewski TF, Mackensen A. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2005;54(4):307-14.
- Bour-Jordan H, Bluestone JA. Regulating the regulators: costimulatory signals control the homeostasis and function of regulatory T cells. *Immunol Rev*. 2009;229(1):41-66.
- Brown H, Turner G, Rogerson S, Tembo M, Mwenechanya J, Molyneux M, Taylor T. Cytokine expression in the brain in human cerebral malaria. *J Infect Dis*. 1999;180(5):1742-6.
- Bueno LL, Morais CG, Araujo FF, Gomes JA, Correa-Oliveira R, Soares IS, Lacerda MV, Fujiwara RT, Braga EM. *Plasmodium vivax*: induction of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells during infection are directly associated with level of circulating parasites. *PLoS One*. 2010;5(3):e9623.
- Busse M, Krech M, Meyer-Bahlburg A, Hennig C, Hansen G. ICOS mediates the generation and function of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells conveying respiratory tolerance. *J Immunol*. 2012;189(4):1975-82.
- Cambos M, Belanger B, Jacques A, Roulet A, Scorza T. Natural regulatory (CD4+CD25+FOXP+) T cells control the production of pro-inflammatory cytokines during *Plasmodium chabaudi* adami infection and do not contribute to immune evasion. *Int J Parasitol*. 2008;38(2):229-38.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(2):119-30.

Carter LL, Leach MW, Azoitei ML, Cui J, Pelker JW, Jussif J, Benoit S, Ireland G, Luxenberg D, Askew GR, Milarski KL, Groves C, Brown T, Carito BA, Percival K, Carreno BM, Collins M, Marusic S. PD-1/PD-L1, but not PD-1/PD-L2, interactions regulate the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 2007;182(1-2):124-34.

Chen Y, Shen S, Gorentla BK, Gao J, Zhong XP. Murine regulatory T cells contain hyperproliferative and death-prone subsets with differential ICOS expression. *J Immunol.* 2012;188(4):1698-707.

Coban C, Ishii KJ, Kawai T, Hemmi H, Sato S, Uematsu S, Yamamoto M, Takeuchi O, Itagaki S, Kumar N, Horii T, Akira S. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med.* 2005;201(1):19-25.

Coe D, Begom S, Addey C, White M, Dyson J, Chai JG. Depletion of regulatory T cells by anti-GITR mAb as a novel mechanism for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2010;59(9):1367-77.

Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ, Singh B. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis.* 2008;46(2):165-71.

D'Ombra MC, Voss TS, Maier AG, Pearce JA, Hansen DS, Cowman AF, Schofield L. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1 specifically suppresses early production of host interferon-gamma. *Cell Host Microbe.* 2007;2(2):130-8.

Day NP, Hien TT, Schollaardt T, Loc PP, Chuong LV, Chau TT, Mai NT, Phu NH, Sinh DX, White NJ, Ho M. The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. *J Infect Dis.* 1999;180(4):1288-97.

Doolan DL, Hoffman SL. The complexity of protective immunity against liver-stage malaria. *J Immunol.* 2000;165(3):1453-62.

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

Franklin BS, Rodrigues SO, Antonelli LR, Oliveira RV, Goncalves AM, Sales-Junior PA, Valente EP, Alvarez-Leite JI, Ropert C, Golenbock DT, Gazzinelli RT. MyD88-dependent activation of dendritic cells and CD4(+) T lymphocytes mediates symptoms, but is not required for the immunological control of parasites during rodent malaria. *Microbes Infect.* 2007;9(7):881-90.

Freitas do Rosario AP, Muxel SM, Rodriguez-Malaga SM, Sardinha LR, Zago CA, Castillo-Mendez SI, Alvarez JM, D'Imperio Lima MR. Gradual decline in malaria-specific memory T cell responses leads to failure to maintain long-term protective immunity to *Plasmodium chabaudi* AS despite persistence of B cell memory and circulating antibody. *J Immunol.* 2008;181(12):8344-55.

Galuppo M, Nocentini G, Mazzon E, Ronchetti S, Esposito E, Riccardi L, Di Paola R, Bruscoli S, Riccardi C, Cuzzocrea S. GITR gene deletion and GITR-FC soluble protein administration inhibit multiple organ failure induced by zymosan. *Shock.* 2011;36(3):263-71.

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

Goncalves RM, Salmazi KC, Santos BA, Bastos MS, Rocha SC, Boscardin SB, Silber AM, Kallas EG, Ferreira MU, Scopel KK. CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells, dendritic cells, and circulating cytokines in uncomplicated malaria: do different parasite species elicit similar host responses? Infect Immun. 2010;78(11):4763-72.

Gramaglia I, Weinberg AD, Lemon M, Croft M. Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. J Immunol. 1998;161(12):6510-7.

Griseri T, Asquith M, Thompson C, Powrie F. OX40 is required for regulatory T cell-mediated control of colitis. J Exp Med. 2010;207(4):699-709.

Hafalla JC, Claser C, Couper KN, Grau GE, Renia L, de Souza JB, Riley EM. The CTLA-4 and PD-1/PD-L1 inhibitory pathways independently regulate host resistance to Plasmodium-induced acute immune pathology. PLoS Pathog. 2012;8(2):e1002504.

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

Hafalla JC, Silvie O, Matuschewski K. Cell biology and immunology of malaria. Immunol Rev. 2011;240(1):297-316.

Haque A, Best SE, Amante FH, Mustafah S, Desbarrieres L, de Labastida F, Sparwasser T, Hill GR, Engwerda CR. CD4+ natural regulatory T cells prevent experimental cerebral malaria via CTLA-4 when expanded in vivo. PLoS Pathog. 2010;6(12):e1001221.

Harada H, Salama AD, Sho M, Izawa A, Sandner SE, Ito T, Akiba H, Yagita H, Sharpe AH, Freeman GJ, Sayegh MH. The role of the ICOS-B7h T cell costimulatory pathway in transplantation immunity. J Clin Invest. 2003;112(2):234-43.

Haribhai D, Lin W, Relland LM, Truong N, Williams CB, Chatila TA. Regulatory T cells dynamically control the primary immune response to foreign antigen. J Immunol. 2007;178(5):2961-72.

Helmby H, Jonsson G, Troye-Blomberg M. Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage Plasmodium chabaudi chabaudi AS. Infect Immun. 2000;68(3):1485-90.

Huehn J, Polansky JK, Hamann A. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? Nat Rev Immunol. 2009;9(2):83-9.

Ilves T, Harvima IT. OX40 ligand and OX40 are increased in atopic dermatitis lesions but do not correlate with clinical severity. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2013;27(2):e197-205.

Ishii N, Takahashi T, Soroosh P, Sugamura K. OX40-OX40 ligand interaction in T-cell-mediated immunity and immunopathology. Adv Immunol. 2010;105:63-98.

Kamimura Y, Iwai H, Piao J, Hashiguchi M, Azuma M. The glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein (GITR)-GITR ligand pathway acts as a mediator of cutaneous dendritic cell migration and promotes T cell-mediated acquired immunity. J Immunol. 2009;182(5):2708-16.

Kim JI, Sonawane SB, Lee MK, Lee SH, Duff PE, Moore DJ, O'Connor MR, Lian MM, Deng S, Choi Y, Yeh H, Caton AJ, Markmann JF. Blockade of GITR-GITRL interaction maintains Treg function to prolong allograft survival. *Eur J Immunol.* 2010;40(5):1369-74.

Komatsu N, Mariotti-Ferrandiz ME, Wang Y, Malissen B, Waldmann H, Hori S. Heterogeneity of natural Foxp3⁺ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(6):1903-8.

Kornete M, Sgouroudis E, Piccirillo CA. ICOS-dependent homeostasis and function of Foxp3⁺ regulatory T cells in islets of nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 2012;188(3):1064-74.

Krishnegowda G, Hajjar AM, Zhu J, Douglass EJ, Uematsu S, Akira S, Woods AS, Gowda DC. 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.* 2005;280(9):8606-16.

Kroemer A, Xiao X, Vu MD, Gao W, Minamimura K, Chen M, Maki T, Li XC. OX40 controls functionally different T cell subsets and their resistance to depletion therapy. *J Immunol.* 2007;179(8):5584-91.

Langhorne J, Albano FR, Hensmann M, Sanni L, Cadman E, Voisine C, Sponaas AM. Dendritic cells, pro-inflammatory responses, and antigen presentation in a rodent malaria infection. *Immunol Rev.* 2004;201:35-47.

Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas AM, Marsh K. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat Immunol.* 2008;9(7):725-32.

Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Boussiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol.* 2001;2(3):261-8.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 1996;86(6):973-83.

Lischke T, Hegemann A, Gurka S, Vu Van D, Burmeister Y, Lam KP, Kershaw O, Mollenkopf HJ, Mages HW, Hutloff A, Kroczeck RA. Comprehensive analysis of CD4⁺ T cells in the decision between tolerance and immunity in vivo reveals a pivotal role for ICOS. *J Immunol.* 2012;189(1):234-44.

Mackroth MS, Malhotra I, Mungai P, Koech D, Muchiri E, King CL. Human cord blood CD4⁺CD25^{hi} regulatory T cells suppress prenatally acquired T cell responses to *Plasmodium falciparum* antigens. *J Immunol.* 2011;186(5):2780-91.

Mahajan S, Cervera A, MacLeod M, Fillatreau S, Perona-Wright G, Meek S, Smith A, MacDonald A, Gray D. The role of ICOS in the development of CD4 T cell help and the reactivation of memory T cells. *Eur J Immunol.* 2007;37(7):1796-808.

Maier AG, Cooke BM, Cowman AF, Tilley L. Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(5):341-54.

McCall MB, Sauerwein RW. Interferon-gamma--central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria. *J Leukoc Biol.* 2010;88(6):1131-43.

Medzhitov R, Schneider DS, Soares MP. Disease tolerance as a defense strategy. *Science.* 2012;335(6071):936-41.

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

Mucida D, Kutchukhidze N, Erazo A, Russo M, Lafaille JJ, Curotto de Lafaille MA. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J Clin Invest.* 2005;115(7):1923-33.

Muxel SM, Freitas do Rosario AP, Zago CA, Castillo-Mendez SI, Sardinha LR, Rodriguez-Malaga SM, Camara NO, Alvarez JM, Lima MR. The spleen CD4+ T cell response to blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria develops in two phases characterized by different properties. *PLoS One.* 2011;6(7):e22434.

Nocentini G, Ronchetti S, Cuzzocrea S, Riccardi C. GITR/GITRL: more than an effector T cell co-stimulatory system. *Eur J Immunol.* 2007;37(5):1165-9.

Oakley MS, Majam V, Mahajan B, Gerald N, Anantharaman V, Ward JM, Faucette LJ, McCutchan TF, Zheng H, Terabe M, Berzofsky JA, Aravind L, Kumar S. Pathogenic roles of CD14, galectin-3, and OX40 during experimental cerebral malaria in mice. *PLoS One.* 2009;4(8):e6793.

Ohkura N, Sakaguchi S. Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. *Semin Immunopathol.* 2010;32(2):95-106.

Pacholczyk R, Kern J. The T-cell receptor repertoire of regulatory T cells. *Immunology.* 2008;125(4):450-8.

Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, Linsley PS, Thompson CB, Riley JL. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol.* 2005;25(21):9543-53.

Rojo JM, Pini E, Ojeda G, Bello R, Dong C, Flavell RA, Dianzani U, Portoles P. CD4+ICOS+ T lymphocytes inhibit T cell activation 'in vitro' and attenuate autoimmune encephalitis 'in vivo'. *Int Immunol.* 2008;20(4):577-89.

Roland J, Soulard V, Sellier C, Drapier AM, Di Santo JP, Cazenave PA, Pied S. NK cell responses to *Plasmodium* infection and control of intrahepatic parasite development. *J Immunol.* 2006;177(2):1229-39.

Ronchetti S, Nocentini G, Petrillo MG, Bianchini R, Sportoletti P, Bastianelli A, Ayroldi EM, Riccardi C. Glucocorticoid-Induced TNFR family Related gene (GITR) enhances dendritic cell activity. *Immunol Lett.* 2010;135(1-2):24-33.

Rosenblum MD, Gratz IK, Paw JS, Lee K, Marshak-Rothstein A, Abbas AK. Response to self antigen imprints regulatory memory in tissues. *Nature.* 2011;480(7378):538-42.

Sabatos-Peyton CA, Verhagen J, Wraith DC. Antigen-specific immunotherapy of autoimmune and allergic diseases. *Curr Opin Immunol.* 2010;22(5):609-15.

Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol.* 2009a;21(10):1105-11.

Sakaguchi S, Wing K, Yamaguchi T. Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. *Eur J Immunol*. 2009b;39(9):2331-6.

Sarr JB, Samb B, Sagna AB, Fortin S, Doucoure S, Sow C, Senghor S, Gaayeb L, Guindo S, Schacht AM, Rogerie F, Hermann E, Dia I, Konate L, Riveau G, Remoue F. Differential acquisition of human antibody responses to *Plasmodium falciparum* according to intensity of exposure to *Anopheles* bites. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012.

Schwenk RJ, Richie TL. Protective immunity to pre-erythrocytic stage malaria. *Trends Parasitol*. 2011;27(7):306-14.

Serghides L, Smith TG, Patel SN, Kain KC. CD36 and malaria: friends or foes? *Trends Parasitol*. 2003;19(10):461-9.

So T, Croft M. Cutting edge: OX40 inhibits TGF-beta- and antigen-driven conversion of naive CD4 T cells into CD25+Foxp3+ T cells. *J Immunol*. 2007;179(3):1427-30.

Sonawane SB, Kim JI, Lee MK, Lee SH, Duff PE, Moore DJ, Lian MM, Deng S, Choi Y, Yeh H, Caton AJ, Markmann JF. GITR blockade facilitates treg mediated allograft survival. *Transplantation*. 2009;88(10):1169-77.

Song J, Salek-Ardakani S, Rogers PR, Cheng M, Van Parijs L, Croft M. The costimulation-regulated duration of PKB activation controls T cell longevity. *Nat Immunol*. 2004;5(2):150-8.

Sponaas AM, Freitas do Rosario AP, Voisine C, Mastelic B, Thompson J, Koernig S, Jarra W, Renia L, Mauduit M, Potocnik AJ, Langhorne J. Migrating monocytes recruited to the spleen play an important role in control of blood stage malaria. *Blood*. 2009;114(27):5522-31.

Stephens R, Culleton RL, Lamb TJ. The contribution of *Plasmodium chabaudi* to our understanding of malaria. *Trends Parasitol*. 2012;28(2):73-82.

Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(3):169-80.

Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R, Heussler VT. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*. 2006;313(5791):1287-90.

Su Z, Stevenson MM. Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *Infect Immun*. 2000;68(8):4399-406.

Takeda I, Ine S, Killeen N, Ndhlovu LC, Murata K, Satomi S, Sugamura K, Ishii N. Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells. *J Immunol*. 2004;172(6):3580-9.

Tanaka S, Maeda S, Hashimoto M, Fujimori C, Ito Y, Teradaira S, Hirota K, Yoshitomi H, Katakai T, Shimizu A, Nomura T, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Graded attenuation of TCR signaling elicits distinct autoimmune diseases by altering thymic T cell selection and regulatory T cell function. *J Immunol*. 2010;185(4):2295-305.

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

Tsuji M, Zavala F. T cells as mediators of protective immunity against liver stages of *Plasmodium*. *Trends Parasitol.* 2003;19(2):88-93.

Valzasina B, Guiducci C, Dislich H, Killeen N, Weinberg AD, Colombo MP. Triggering of OX40 (CD134) on CD4(+)CD25+ T cells blocks their inhibitory activity: a novel regulatory role for OX40 and its comparison with GITR. *Blood.* 2005;105(7):2845-51.

van der Heyde HC, Pepper B, Batchelder J, Cigel F, Weidanz WP. The time course of selected malarial infections in cytokine-deficient mice. *Exp Parasitol.* 1997;85(2):206-13.

Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(5):329-41.

Vaughan AM, Kappe SH. Malaria vaccine development: persistent challenges. *Curr Opin Immunol.* 2012;24(3):324-31.

Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(7):523-32.

Vu MD, Xiao X, Gao W, Degauque N, Chen M, Kroemer A, Killeen N, Ishii N, Li XC. OX40 costimulation turns off Foxp3+ Tregs. *Blood.* 2007;110(7):2501-10.

Walther M, Jeffries D, Finney OC, Njie M, Ebonyi A, Deininger S, Lawrence E, Ngwa-Amambua A, Jayasooriya S, Cheeseman IH, Gomez-Escobar N, Okebe J, Conway DJ, Riley EM. Distinct roles for FOXP3 and FOXP3 CD4 T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Pathog.* 2009;5(4):e1000364.

Williams LM, Rudensky AY. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol.* 2007;8(3):277-84.

Wipasa J, Suphavitai C, Okell LC, Cook J, Corran PH, Thaikla K, Liwisaeree W, Riley EM, Hafalla JC. Long-lived antibody and B Cell memory responses to the human malaria parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *PLoS Pathog.* 2010;6(2):e1000770.

Xiao X, Gong W, Demirci G, Liu W, Spoerl S, Chu X, Bishop DK, Turka LA, Li XC. New insights on OX40 in the control of T cell immunity and immune tolerance in vivo. *J Immunol.* 2012;188(2):892-901.

Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, Matsuda H, Aoki M, Tanno Y, Shin T, Tsuchiya H, Pardoll DM, Okumura K, Azuma M, Yagita H. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol.* 2002;169(10):5538-45.

Zago CA, Bortoluci KR, Sardinha LR, Pretel FD, Castillo-Mendez SI, Freitas do Rosario AP, Hiyane MI, Muxel SM, Rodriguez-Malaga SM, Abrahamssohn IA, Alvarez JM, D'Imperio Lima MR. Anti-IL-2 treatment impairs the expansion of T(reg) cell population during acute malaria and enhances the Th1 cell response at the chronic disease. *PLoS One.* 2012;7(1):e29894.

Zheng SG, Wang J, Wang P, Gray JD, Horwitz DA. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *J Immunol.* 2007;178(4):2018-27.

Zhu J, Krishnegowda G, Li G, Gowda DC. Proinflammatory responses by glycosylphosphatidylinositols (GPIs) of *Plasmodium falciparum* are mainly mediated through the recognition of TLR2/TLR1. *Exp Parasitol*. 2011;128(3):205-11.