LETÍCIA SARTURI PEREIRA SEVERI

PAPEL DAS MOLÉCULAS PD-1 E PD-L1 NA REGULAÇÃO DA RESPOSTA AGUDA DOS LINFÓCITOS T $CD4^+$ E $CD8^+$ À INFECÇÃO PELO *Plasmodium chabaudi*

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
2012

LETÍCIA SARTURI PEREIRA SEVERI

PAPEL DAS MOLÉCULAS PD-1 E PD-L1 NA REGULAÇÃO DA RESPOSTA AGUDA DOS LINFÓCITOS T $CD4^+$ E $CD8^+$ À INFECÇÃO PELO *Plasmodium chabaudi*

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: Profa. Dra. Maria Regina D'Império Lima

Versão original

São Paulo
2012

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

© reprodução total

Severi, Letícia Sarturi Pereira.
Papel das moléculas PD-1 e PD-L1 na regulação da resposta aguda dos linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ à infecção pelo *Plasmodium chabaudi* / Letícia Sarturi Pereira Severi. -- São Paulo, 2012.

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: Imunologia da malária.

Versão do título para o inglês: Role of PD-1 and PD-L1 in the regulation of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell responses to blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria.

1. Malária 2. *Plasmodium chabaudi* 3. PD-1 4. PD-L1 5. Linfócitos T 6. IFN-γ 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/SBIB0188/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Letícia Sarturi Pereira Severi.

Título da Dissertação: Papel das moléculas PD-1 e PD-L1 na regulação da resposta aguda dos linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ à infecção pelo *Plasmodium chabaudi*.

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 **154** nas fls. **112** 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 das moléculas PD-1 e PDL-1 na regulação da resposta aguda dos linfócitos T CD4+ e CD8+ à infecção pelo Plasmodium chabaudi"* do qual participam o(s) aluno(s) **Letícia Sarturi Pereira Severi,** 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 **10.10.2011, com validade de 3 anos**.

São Paulo, 11 de outubro de 2011.

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

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

Dedico este trabalho aos meus pais Paulo e Cleusa, meus irmãos Paula e Lucas e, principalmente ao meu esposo Cleiton, que me deram toda a força necessária para seguir em frente nesta jornada.

Vocês são a razão desta conquista; é por vocês que eu superei tudo e finalmente, consegui!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, por me proporcionar alcançar os meus objetivos e por me dar forças para continuar quando tudo me levava a desistir.

Agradeço aos meus pais Paulo e Cleusa, que apesar de distantes fisicamente, sempre com suas palavras me ajudaram a manter o foco e continuar seguindo em frente. Obrigada, mãe e pai, porque o amor de vocês foi essencial para eu chegar até aqui. Agradeço aos meus irmãos Lucas e Paula por me motivarem nessa conquista. Também agradeço ao meu cunhado Igor que junto com a minha irmã, também acompanhou todo esse período da minha vida. Muito obrigada pela força que vocês sempre me deram!

Agradeço ao meu esposo Cleiton, que esteve ao meu lado em cada momento nesta fase. Agradeço a você, meu amor, por me levantar o tempo todo, mostrando o quanto era importante eu me manter em pé para conseguir chegar até aqui. Agradeço muito, por você me acompanhar sempre quando eu precisei de uma companhia, nos fins de semana de experimento, nas noites em que eu tive que ir ao laboratório fazer algum procedimento rápido. Obrigada, meu amor, pela companhia, pela força... Enfim, muito obrigada por nunca abandonar o meu sonho e acreditar que eu conseguiria terminar o meu mestrado.

Agradeço à minha orientadora, a professora Dra. Maria Regina D'Império Lima, por ter me aceitado quando eu achei que meu mestrado estava perdido. Muito obrigada, pela paciência, pelas discussões de resultados que sempre acrescentaram muito ao meu trabalho e à minha vida. Enfim, agradeço pela boa orientação que fez com que eu chegasse até aqui.

Gostaria de agradecer também, aos meus amigos Barbara e Antonio, que me ajudaram a superar as dificuldades que encontrei em meu caminho e por serem sempre um apoio desde o início desta jornada. Obrigada pela companhia agradável em nossos churrasquinhos, jantarzinhos e nos dias de praia, que foram momentos essenciais para que eu não me deixasse abalar pelos obstáculos que encontrei.

Agradeço às minhas amigas Laís, Ariane, Mônica e Paula, que sempre acreditaram em mim e me deram muita força. Agradeço principalmente, a Laís que me ajudou muito quando mais precisei, que me deu coragem quando eu não tinha.

Muito obrigada, amiga, porque você esteve ao meu lado naquele momento de transição e de incerteza do meu destino!

Agradeço a minha prima Raquel e seu namorado Jacques, pela boa companhia nos fins de semana, e por me aguentarem falando de experimentos e pesquisa. Obrigada, pela força de vocês que me ajudou a manter o foco e não desistir.

Agradeço ao professor Dr. João Gustavo Pessini Amarante Mendes, que me deu ânimo para continuar e me ajudou muito durante a fase de transição na minha orientação.

Agradeço ao professor Dr. José Maria Alvarez Mosig pela contribuição neste trabalho e pela convivência durante este período.

Agradeço aos meus colegas de laboratório Genoílson, Eduardo, Sheyla, Alexandra, Henrique, Fernanda, Érika, Maria, Flávia, Christian, Beatriz, Giovana, Rafael, Raissa, Ana Paula e aos técnicos, Mariana, Rogério, Jéssica e Áurea. Muito obrigada pelo auxílio em meus experimentos e pela companhia nos momentos de alegria e de turbulência que vivi. Vocês foram essenciais para que eu conseguisse finalizar esta etapa da minha vida. Agradeço especialmente à Jéssica pelo companheirismo nas conversas e a alegria de sempre que me contagiou em todos os dias em que convivemos.

Agradeço também, a todos os professores que fizeram parte desta fase da minha vida, que com certeza auxiliaram muito na formação do meu conhecimento científico. Principalmente, à minha banca de qualificação: Dra. Ana Paula Lepique, Dr. Alexandre Keller e Dr. Jean-Pierre pelas boas sugestões que complementaram o meu trabalho.

Agradeço a todos os funcionários do departamento de Imunologia pelo apoio institucional em diversos momentos. Agradeço, principalmente, a Andrea Glatt pelo apoio nos dias de experimento no FACS e também pela agradável convivência e por sempre estar disposta a ajudar quando necessitei.

Enfim, gostaria de agradecer muito, por todas as pessoas que passaram pela minha vida durante esta fase que vivi, pessoas que foram essenciais para que esse dia chegasse e que este meu sonho se realizasse. Muito obrigada!!!

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia das Parasitoses do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, com o auxílio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), projeto número 05/51170-7 e bolsa processo número 2010/13467-6 e do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), bolsa processo número 134600/2010-0.

“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”
Mário Quintana

RESUMO

Pereira-Severi LS. Papel das moléculas PD-1 e PD-L1 na regulação da resposta aguda dos linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ à infecção pelo *Plasmodium chabaudi*. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

A malária é um problema grave de saúde pública, que mata mais de um milhão de pessoas por ano mundialmente. As complicações decorrentes da doença, em humanos infectados por parasitas do gênero *Plasmodium*, envolvem síndromes como a malária cerebral, a disfunção respiratória e a anemia severa. O desenvolvimento destas síndromes parece estar relacionado, pelo menos em parte, à resposta imune exacerbada à infecção. Isto é, apesar do sistema imune proteger contra os parasitas, ele também contribui para agravar a doença. As células T $CD4^+$ são centrais na proteção imune e na imunopatogenia. Moléculas inibitórias, como PD-1 e seu ligante PD-L1 encontram-se expressas em níveis elevados nas células T $CD4^+$ e $CD8^+$ de camundongos na fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*. Estas moléculas inibem a fosforilação do receptor do linfócito T, reduzindo a ativação e causando a morte destas células. Na infecção com *P. chabaudi,* esta inibição da resposta imune via PD1-PD-L1 poderia atuar como um mecanismo de regulação para garantir a homeostase, diminuindo os danos causados pela resposta imune ao hospedeiro. Com isso, este estudo teve como objetivo principal verificar o papel das moléculas PD-1 e PD-L1 na ativação e regulação das células T $CD4^+$ e $CD8^+$ do baço de camundongos durante a infecção aguda pelo *P. chabaudi*. Os objetivos específicos eram avaliar: 1) A cinética da expressão das moléculas PD-1 e PD-L1 *in vivo* durante os primeiros dez dias de infecção; 2) O efeito *in vitro* do tratamento com anticorpos monoclonais anti-PD-L1 na ativação das células T e B estimuladas com eritrócitos parasitados; e 3) A capacidade proliferativa de células T $CD4^+$, que expressam ou não PD-1, em camundongos no dia 7 de infecção. Portanto, esse estudo visa ampliar a compreensão dos mecanismos inibitórios envolvidos na regulação da resposta imune contra a malária. Os nossos resultados sugerem uma participação da via PD-1-PD-L1 na regulação da resposta imune à malária murina. Isto porque, além de observarmos o aumento na expressão de PD-1 nas células T $CD4^+$, observamos aumento na expressão de PD-L1 nos linfócitos T e B. Interessantemente, a população de células B com alta expressão de PD-L1 possui um baixo nível de CD19, que juntamente com a expressão de CXCR-5 e GL-7, caracterizam os plasmablastos, que vão gerar a produção de anticorpos de afinidade durante a fase crônica. O papel regulador dessas moléculas ficou evidente em dois aspectos. Primeiramente, quando verificamos uma menor proliferação de células T $CD4^+$ que expressam PD-1, quando estimuladas com anticorpos anti-CD3. Depois, quando observamos que as moléculas PD-1 e PD-L1 também podem regular a função efetora das células, reduzindo sua capacidade de produzir IFN-γ. Além disso, a possível participação de PD-1-PD-L1 na formação do centro germinativo sugere um importante papel desta via na produção de anticorpos protetores. Portanto, este mecanismo poderia ser importante para o controle da resposta imune durante a fase aguda da infecção, contribuindo para a redução dos sintomas associados à resposta imune exacerbada na malária, bem como para a geração de resposta mais específica para a fase crônica.

Palavras-chave: Malária. *Plasmodium chabaudi.* PD-1. PD-L1. Regulação. Linfócitos T. IFN-γ.

ABSTRACT

Pereira-Severi LS. Role of PD-1 and PD-L1 in the regulation of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell responses to blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria. [Master's Thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Malaria is a serious public health problem that kills over a million people a year worldwide. The complications of the disease in humans infected by parasites of the genus *Plasmodium* involve syndromes such as cerebral malaria, respiratory distress and severe anemia. The development of these syndromes appears to be related, at least in part, to the exacerbated immune response to infection. That is, in spite of the role of the immune system in the protection against these parasites, it also contributes to aggravate the disease. $CD4^+$ T cells are central to immune protection and immunopathogenesis. Inhibitory molecules such as PD-1 and its ligand PD-L1 are expressed at high levels in $CD4^+$ and $CD8^+$ cells of mice in the acute phase of infection by *P. chabaudi*. These molecules inhibit the phosphorylation of the T cell receptor, reducing the activation and killing these cells. During *P. chabaudi* infection, the inhibition of the immune response through the PD1-PD-L1 pathway could act as a regulatory mechanism to ensure homeostasis, reducing the damage caused by the host immune response. Therefore, this study aimed to examine the role of PD-1 and PD-L1 molecules in the activation and regulation of $CD4^+$ and $CD8^+$ spleen cells of mice during acute *P. chabaudi* infection. The specific objectives were to assess: 1) The kinetics of expression of PD-1 and PD-L1 in vivo during the first ten days of infection, 2) The effect of in vitro treatment with monoclonal antibodies anti-PD-L1 in the activation of T and B cells stimulated with parasitized erythrocytes, and 3) The reason why $CD4^+$ T cells after 7 days of infection exhibit low proliferation under stimulation with anti-CD3 antibodies. Therefore, this study aims to broaden the understanding of inhibitory mechanisms involved in the regulation of the immune response against malaria. Our results suggest an involvement of PD-1-PD-L1 in regulating the immune response to murine malaria. This is so because we observed an increase of PD-1 expression in $CD4^+$ T cells and an increase of PD-L1 expression on T and B lymphocytes. Interestingly, the population of B cells with high expression of PD-L1 had low levels of CD19, which together with the expression of CXCR-5 and GL-7, characterize plasmablasts, which will generate cells that produce high affinity antibodies during the chronic phase. The regulatory role of these molecules was evidenced in two aspects. First, when we find a lower proliferation of $CD4^+$ T cells expressing PD-1 stimulated with antibodies anti-CD3. Second, when we observed that PD-1 and PD-L1 can also regulate the effector function of spleen cells, reducing their ability to produce IFN-γ. Additionally, the possible involvement of PD-1-PD-L1 in germinal center formation suggests an important role of this pathway in the production of protective antibodies. Therefore, this mechanism may be important in the control of immune response during the acute phase of infection, thus contributing to the reduction of symptoms associated with exacerbated immune response in malaria, as well as for the generation of more specific response to the chronic phase.

Keywords: Malaria. *Plasmodium chabaudi.* PD-1. PD-L1. Regulation. T lymphocytes. IFN-γ.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição global da malária 17

Figura 2 – Ciclo biológico do plasmódio no homem 22

Figura 3 – Resposta dos linfócitos esplênicos à infecção pelo *P. chabaudi* 27

Figura 4 – Cinética da parasitemia e número de células no baço durante a fase aguda da malária pelo *P. chabaudi* 36

Figura 5 – Cinética da expressão de PD-1 nos linfócitos esplênicos durante a infecção por *P. chabaudi* 38

Figura 6 – Cinética da expressão de PD-L1 nos linfócitos esplênicos durante a infecção com *P. chabaudi* 40

Figura 7 – Cinética da coexpressão de PD-L1 e PD-1 nos linfócitos esplênicos durante a infecção por *P. chabaudi* 42

Figura 8 – Caracterização das populações de células T $CD4^+$ formadas pela expressão de PD-1 e PD-L1 nos dias 7 e 8 p.i. 45

Figura 9 – Caracterização da população de células $CD19^{lo}PD\text{-}L1^{hi}$ nos dias 8 e 10 p.i. 46

Figura 10 – Proliferação dos linfócitos sob inibição de PD-L1 *in vitro* 47

Figura 11 – Proliferação das células T $CD4^+$ sob estímulo de anti-CD3 51

Figura 12 – Produção de IFN-γ pelas células T $CD4^+$ sob inibição de PD-L1 *in vitro* 54

Figura 13 – Produção de IFN-γ sob inibição de PD-L1 *in vitro* 55

LISTA DE ABREVIATURAS

α - anti (utilizado para se referir a anticorpos)

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

BSA - Albumina sérica Bovina

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

CFSE - *Carboxifluorescein Diacetate Succinimidil Ester*

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

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

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

iT_{reg} – 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)

nT_{reg} – Células T reguladoras naturais

PAHO – do inglês Pan American Health Organization (Organização Pan Americana de Saúde)

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*

PD-L2 – do inglês *Programmed Death – Ligant 2*

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

p.i. – pós-infecção

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

Th – do ingles *T helper* (T auxiliar)

TLR – do inglês *Toll-like Receptor* (Receptor 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

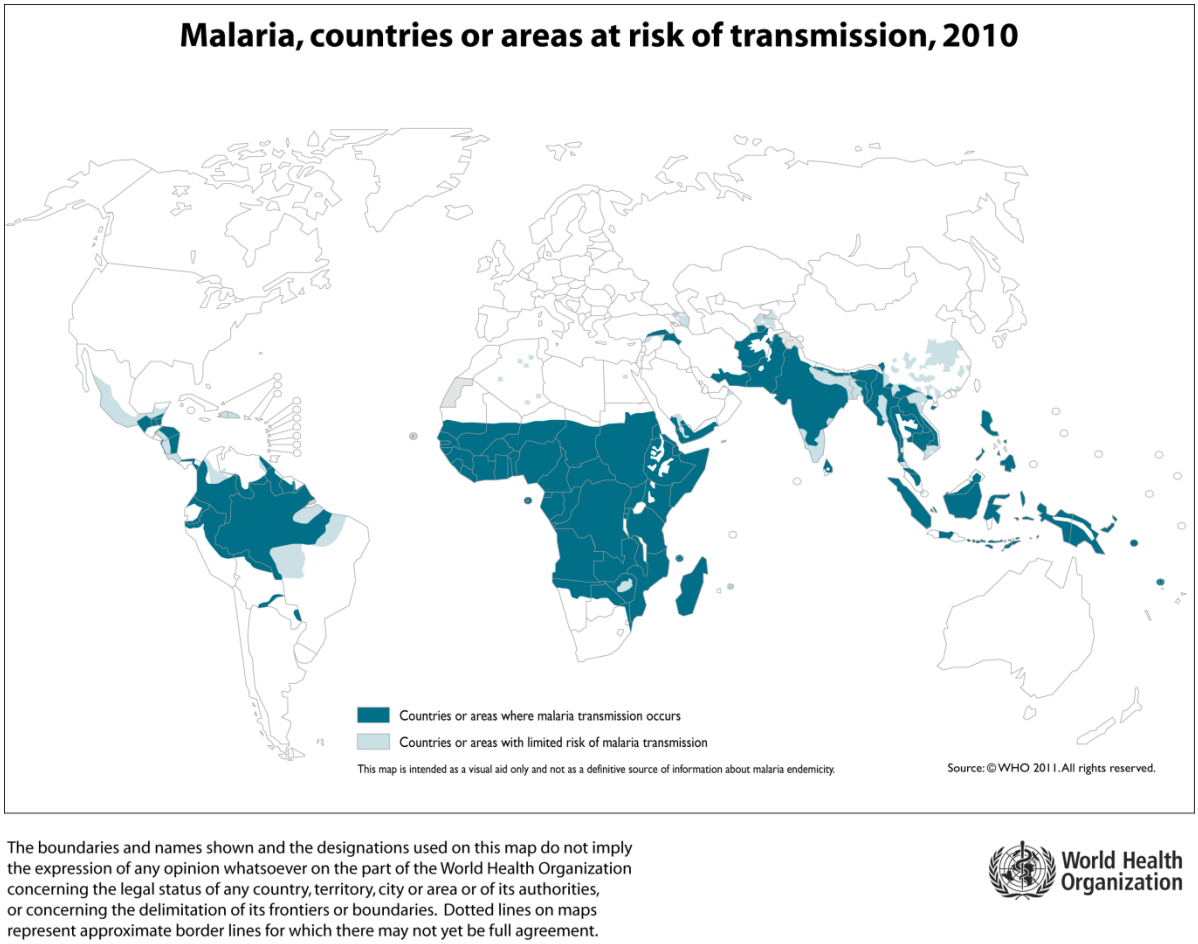
1 INTRODUÇÃO 17
1.1 Malária 17
1.2 Ciclo biológico do parasita, imunopatologia e imunidade 18
1.3 A resposta imune ao *P. chabaudi* 22
1.4 Moléculas inibitórias PD-1 e PDL-1 27
2 OBJETIVOS 30
3 MATERIAIS E MÉTODOS 31
3.1 Camundongos, parasitas e infecção 31
3.2 Suspensão de células do baço 31
3.3 Análise da expressão de PD-1 e PD-L1 31
3.4 Inibição da via PD-1-PD-L1 32
3.5 Ensaio de proliferação com CFSE ou CellTrace Violet 32
3.6 Produção de IFN-γ e outras citocinas no sobrenadante de cultivo 32
3.8 Ensaio de purificação de células por *Cell Sorting* para proliferação 33
3.9 Análise estatística 34
4 RESULTADOS 35
5 DISCUSSÃO 56
6 CONCLUSÕES 62
REFERÊNCIAS 63

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária

A malária, doença causada pelos parasitas do gênero *Plasmodium*, é um problema global de saúde pública responsável pela morte de mais de um milhão de pessoas por ano (World Health Organization, 2007). A grande disseminação da malária globalmente justifica o alto número de casos existentes (Figura 1). A malária ocorre em mais de 90 países onde habitam 2,5 bilhões de pessoas, representando 40% da população mundial. Aproximadamente 90% das mortes causadas pela malária ocorrem na África (Garcia, 2010). No Brasil, em 2007, foram confirmados 458.041 casos de malária, com 99,9% dos casos restritos à região Norte (Pan American Health Organization, 2008).

Figura 1 - Distribuição global da malária.



Fonte: WHO, 2010.

As espécies de protozoários do gênero *Plasmodium* (filo *Sporozoa*, subfilo *Apicomplexa*) que infectam o homem são cinco: *Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium malariae, Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*. Apesar de várias espécies, quase todos os casos de malária (95%) ocorrem pelas espécies *P. vivax* e *P. falciparum* (Garcia, 2010). Entre as espécies de *Plasmodium* que infectam camundongos temos *Plasmodium chabaudi, Plasmodium yoelii, Plasmodium berghei* e *Plasmodium vinckei*.

O *P. malariae* e o *P. ovale* estão relacionados a poucos casos de morbidade, enquanto o *P. vivax* é uma causa comum de estado agudo febril severo, especialmente na Ásia e América do Sul, mas raramente fatal. A grande maioria de casos de malária severa e mortes é causada pelo *P. falciparum*, que é endêmico na África Subsaariana e outras regiões tropicais no mundo (Stevenson, Riley, 2004). No Brasil, a maioria dos casos ocorre por *P. vivax* (84%), uma pequena parte por *P. falciparum* (15%) e uma minoria (1%) por infecções mistas (WHO, 2010).

A ampla endemicidade da malária, assim como a alta mortalidade observada mundialmente, pode ser devida a um controle ineficiente da doença. Apesar das medidas preventivas e terapêuticas já utilizadas, a melhor medida para erradicação seria a imunização das populações em áreas de risco da doença. Com isso, a fim de ampliar as medidas de controle da malária, diversos grupos de pesquisa têm trabalhado para o desenvolvimento de uma vacina.

1.2 Ciclo biológico do parasita, imunopatologia e imunidade

Os protozoários parasitas do gênero *Plasmodium* realizam seu ciclo assexuado em espécies de vertebrados (homem, primatas, roedores, aves) e seu ciclo sexuado ocorre em mosquitos do gênero *Anopheles.* O início da infecção se dá pela picada do mosquito que, ao fazer o seu repasto sanguíneo, inocula esporozoítos na pele que podem ficar alojados na derme (Sidjanski, Vanderberg, 1997; Vanderberg, Frevert, 2004) ou chegar à corrente sanguínea através do movimento de deslizamento entre as células (Amino et al., 2008). O estágio de esporozoíto inoculado na picada do mosquito é transiente e não causa patologia, chegando em poucos minutos ao fígado (Schofield, Grau, 2005), por meio da transmigração celular, em que o parasita entra e sai das células (Amino et al., 2008; Mota et al., 2001). Nos hepatócitos os parasitas iniciam a fase pré-eritrocítica do

ciclo, onde proliferam e diferenciam em merozoítos. A infecção hepática é uma fase obrigatória e clinicamente silenciosa do ciclo de vida do parasita, que pode durar de dois a sete dias, dependendo da espécie de *Plasmodium* (Hafalla et al., 2011). Os merozoítos produzidos no fígado são exocitados a partir dos hepatócitos infectados, dentro de vesículas denominadas merossomos (Sturm et al., 2006; Tarun et al., 2006), para então na corrente sanguínea infectarem eritrócitos, iniciando a fase eritrocítica do ciclo. Durante a fase eritrocítica ocorre a esquizogonia dentro dos eritrócitos invadidos, onde os parasitas se encontram em três diferentes estágios: anel, trofozoíto e esquizonte; que compõem o desenvolvimento intra-eritrócitário do ciclo. Cada ciclo intra-eritrócitário pode durar de 48-72 horas, dependendo da espécie de *Plasmodium* (Stevenson, Riley, 2004). O desenvolvimento intra-eritrocítico resulta em uma rápida expansão e mantém o ciclo do parasita no hospedeiro infectado (Silvie et al., 2008). Uma pequena parte dos merozoítos, ao invadir os eritrócitos, se diferencia por gametocitogênese em gametócitos, que são essenciais para garantir a continuidade do ciclo biológico do parasita (Hafalla et al., 2011; Silvie et al., 2008). Dessa forma, os gametócitos masculinos e femininos são ingeridos pelos mosquitos *Anopheles*, durante o repasto sanguíneo e assim o parasita realiza seu ciclo sexuado no intestino do mosquito, onde a fusão dos gametas leva à esquizogonia com a formação de oocisto contendo esporozoítos. Os esporozoítos migram para as glândulas salivares do mosquito para iniciar um novo ciclo parasitário (Garcia, 2010).

As manifestações clínicas da malária abrangem uma ampla faixa de sintomas. Embora a maioria dos indivíduos tenha apenas um estado febril benigno, cerca de 1-3 milhões de mortes ocorrem por ano devido à malária severa, principalmente em crianças não-imunes infectadas com *P. falciparum*. Este quadro severo compreende: anemia severa, disfunção respiratória ou malária cerebral (Miller et al., 2002). Os sintomas da malária, em grande parte, contam com a participação da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro, e não apenas com a ação direta do parasita.

Desde a picada do mosquito até a invasão eritrocitária, os indivíduos infectados permanecem assintomáticos (Garcia, 2010), possivelmente devido à baixa carga de antígeno, à natureza imunotolerante do fígado e/ou aos mecanismos imunorregulatórios iniciados durante a passagem do esporozoíto através da pele (Guilbride et al., 2010). Apesar de clinicamente silenciosa, a fase pré-eritrocítica induz a ativação da resposta imune. A imunidade humoral contribui para a proteção

contra o estágio pré-eritrocítico (Schwenk, Richie, 2011). Os anticorpos neutralizantes são direcionados para proteínas presentes na superfície de esporozoítos (Hafalla et al., 2011). O mecanismo da proteção mediada por anticorpo pode envolver a inibição da invasão no hepatócito ou a opsonização de esporozoítos e eritrócitos parasitados (EP) para captura por macrófagos e células dentríticas (Marsh, Kinvanjui, 2006). Enquanto os mecanismos dependentes de anticorpo atuam no estágio extracelular, a resposta imune atuante na proteção contra os estágios hepáticos do *Plasmodium* é dependente da imunidade celular. Durante este estágio, a apresentação de antígenos para células T pode ser feita pelos próprios hepatócitos ou por células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês *Antigen Presenting Cells*). Observa-se intensa resposta de células T $CD8^+$ efetoras direcionadas aos hepatócitos infectados (Hafalla et al., 2006). A produção de citocinas, como IL-12 (Interleucina-12) e IFN-γ (Interferon-γ), e de mediadores, como o óxido nítrico (NO, do inglês *Nitric Oxide*), também é importante durante esta fase (Stevenson, Riley, 2004).

Apesar da ativação do sistema imune, a invasão dos eritrócitos inicia-se logo após a liberação dos merozoítos pelos hepatócitos. Durante os ciclos de reprodução do *Plasmodium*, a ruptura dos eritrócitos contendo esquizontes é acompanhada por episódios de febre, náusea, dor de cabeça e outros sintomas típicos de produção sistêmica de citocinas pró-inflamatórias (Miller et al., 2002). Os produtos do parasita ou os EP podem interagir com receptores do tipo Toll e receptores de superfície como CD36, um co-receptor para TLR-2 (do inglês *Toll-like Receptor-2*). A interação de produtos do *Plasmodium* com o CD36 pode tanto ativar como suprimir as células dendríticas, monócitos e células T (Langhorne et al., 2008). A ativação de células dendríticas, células B e macrófagos via TLR-1/TLR-2 e TLR-4, através das âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) do parasita (Krishnegowda et al., 2005), bem como a ativação de células dendríticas via TLR-9 pelo DNA do parasita que contamina a hemozoína garante a produção de citocinas pró-inflamatórias (Coban et al., 2005; Krishnegowda et al., 2005; Parroche et al., 2007). O TNF-α (do inglês *Tumor Necrosis Factor*-α) é uma das principais citocinas pró-inflamatórias relacionadas à febre na malária (Karunaweera et al., 1992) e a sua liberação induz o aumento na expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular, como CD36 (Barnwell et al., 1989), ICAM-1 (do inglês *Inter-cellular Adhesion Molecule 1*) (Berendt et al.,

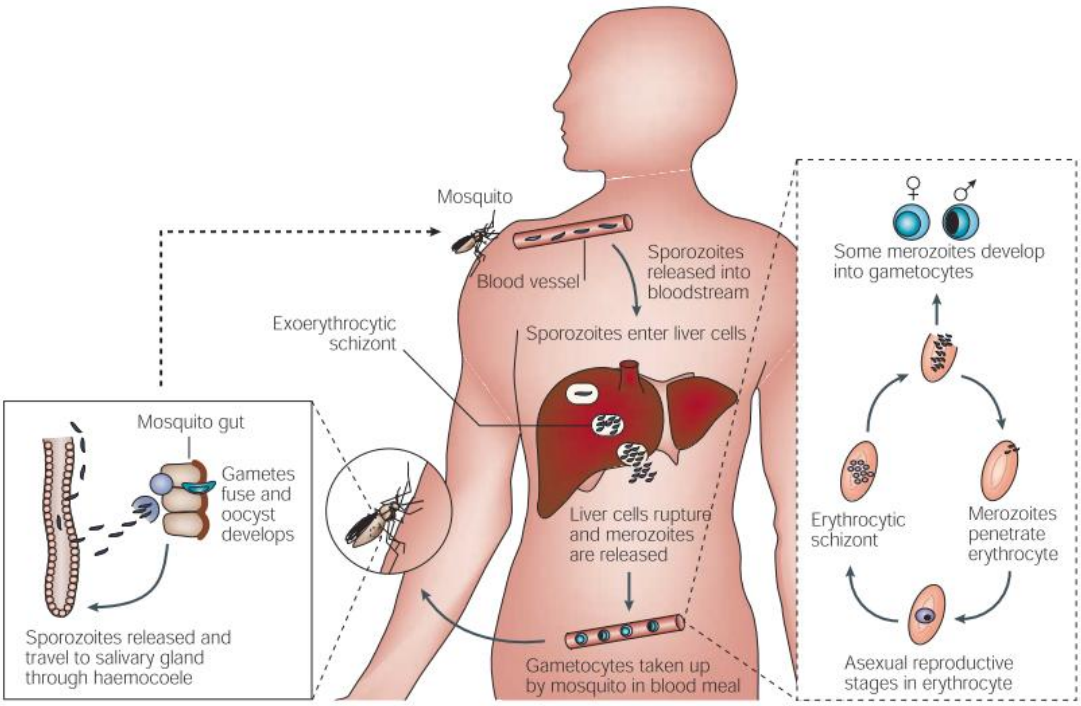
1989), VCAM-1 (do inglês *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*), E-selectina (Ockenhouse et al., 1992) e PECAM-1/CD31 (do inglês *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*) (Treutiger et al., 1997), provocando a citoaderência dos eritrócitos infectados (Ho, White, 1999). A citoaderência é um evento de adesão celular ao endotélio que ocorre em indivíduos infectados por *P. falciparum* e é a principal causa da severidade da doença quando o tecido cerebral é atingido, provocando a malária cerebral (Ho, White, 1999). Análises de RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real, do inglês *Real Time Polymerase Chain Reaction*) *post-mortem* do cérebro de pacientes com malária cerebral indicam altos níveis locais de TNF-α e IL-1β (Interleucina-1beta) (Brown et al., 1999), mostrando uma forte correlação entre as citocinas pró-inflamatórias e a expressão de moléculas de adesão que provocam a citoaderência. Portanto, ao mesmo tempo em que as citocinas pró-inflamatórias podem ser cruciais para o controle da parasitemia, elas também podem agravar a doença.

A proteção mediada pela resposta pró-inflamatória envolve citocinas, como TNF-α e IFN-γ, e a liberação de mediadores como o NO (Miller et al., 2002). A produção inicial de IFN-γ é garantida pelas células NK (*Natural Killer*) e, mais tardiamente, pelas células T ativadas (Artavanis-Tsakonas et al., 2003). O IFN-γ ativa os macrófagos promovendo a eliminação dos parasitas. Apesar da intensa resposta imune celular, a imunidade humoral possui grande importância na fase eritrocítica, já que as moléculas de MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) I e II estão ausentes nos eritrócitos (Langhorne et al., 2008). Os mecanismos efetores dos anticorpos incluem bloqueio da invasão de eritrócitos por merozoítos (Blackman et al., 1990), morte celular anticorpo-dependente mediada por anticorpos citofílicos (Bouharoun-Tayoun et al., 1995) e ligação de anticorpos a moléculas induzidas na superfície dos EP, levando a uma maior remoção dos eritrócitos infectados (Bull et al., 1998). A produção de citocinas anti-inflamatórias TGF-β (do inglês *Transforming Growth Factor*-β) e IL-10 (Interleucina-10) contribui para balancear as respostas de defesa quando a parasitemia está sob controle e a indução de células T Foxp3^{+} (do inglês *Forkhead box P3*) reguladoras (T_{reg}) parece depender dessas citocinas anti-inflamatórias (Couper et al., 2008; Scholzen et al., 2009). Por outro lado, a anemia severa estaria associada a níveis baixos de IL-10 (Kurtzhals et al., 1998), enquanto

a disfunção respiratória relaciona-se a níveis anormalmente altos de IL-10 (Awandare et al., 2006). Dessa forma, a patogenia da malária está bastante relacionada aos efeitos da resposta imune.

Mesmo após muitas exposições, os indivíduos não se tornam refratários aos parasitas da malária, mas desenvolvem imunidade clínica que previne a doença sintomática (Miller et al., 2002). A imunidade à malária, observada pelos níveis baixos de parasitas no sangue e ausência de sintomatologia, pode levar anos para se estabelecer em indivíduos de regiões endêmicas (Langhorne et al., 2008). Além disso, o deslocamento desses indivíduos da área endêmica pode levar à perda da imunidade contra a malária (Jelinek et al., 2002; Matteelli et al., 1999; Soares et al., 1999ab).

Figura 2 - Ciclo biológico do plasmódio no homem.



Fonte: Stevenson e Riley, 2004.

1.3 A resposta imune ao *P. chabaudi*

Devido à dificuldade em estudar a malária em humanos, modelos de infecção por *Plasmodium* em camundongos têm sido extensamente utilizados. Dentre os plasmódios de roedores, o *P. chabaudi* é o modelo de infecção mais utilizado para estudar a resposta imune na fase intra-eritrocítica do ciclo da malária. Na malária de roedores, a sobrevivência está ligada à capacidade do hospedeiro de controlar a replicação dos estágios sanguíneos do parasita dentro dos primeiros 7 a 14 dias após a infecção (Stevenson, Riley, 2004). A parasitemia na infecção por *P. chabaudi* possui um pico atingindo altos níveis de EP (40-60%). A infecção com a cepa AS é frequentemente limitada, atingindo a fase crônica em cerca de duas semanas, a seguir a parasitemia permanece em níveis baixos por 2 a 3 meses. Este controle da parasitemia está relacionado à capacidade dos camundongos em estabelecer uma resposta imune eficiente após uma ou mais infecções (Jarra, Brown, 1985; Jarra et al., 1986; Taylor et al., 1997).

As células T desempenham funções importantes para a resposta efetora contra o *P. chabaudi*, tendo um papel central no controle da parasitemia. Além disso, as células T $CD4^+$ ativadas contra o parasita são essenciais para o desenvolvimento de resposta humoral pelas células B (Elias et al., 2005).

Na fase aguda da infecção por *P. chabaudi*, ocorre uma intensa ativação de células T e B (Castillo-Méndez et al., 2007; Elias et al., 2005; Meding, Langhorne, 2005; Muxel et al., 2011), que produzem IFN-γ e IgG2a (Imunoglobulina G2a), respectivamente, garantindo uma resposta Th1 (do inglês *T helper 1*) que protege o hospedeiro controlando a parasitemia. Inicialmente, após a proliferação, as células T ativadas produzem IFN-γ, o que indica uma tendência a respostas do tipo 1 (Th1). O IFN-γ tem um papel central no controle da parasitemia, e sua ausência impede o controle da infecção levando à morte (Su, Stevenson, 2000). As células T $CD4^+$ são essenciais para garantir uma produção de IFN-γ capaz de controlar a parasitemia (Muxel et al., 2011). A redução ou ausência das células T $CD4^+$ resulta em parasitemia descontrolada tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção (Podoba, Stevenson, 1991). Tanto as células T $CD4^+$ Th1 quanto o IFN-γ são necessários para o controle da parasitemia (Stevenson et al., 2001; Su, Stevenson, 2002; van der Heyde et al., 1997). A resposta Th1 é importante não somente na fase

aguda para promover a imunidade celular, mas também na fase crônica para promover a resposta de anticorpos (Su, Stevenson, 2002). A produção de anticorpos não é essencial para o controle da parasitemia na fase aguda, mas durante a fase crônica, a manutenção de níveis baixos de parasitas no sangue parece depender dessa resposta (Meding, Langhorne, 2005).

Além do envolvimento da resposta imune adaptativa no controle da parasitemia, também há a participação da imunidade inata nesse processo. A ausência das células NK resulta em aumento da parasitemia durante a fase aguda, além do aparecimento de um pico recorrente durante a fase crônica. Essa produção inicial de IFN-γ por células NK é importante para a ativação adequada da resposta de células T $CD4^+$ (Mohan et al., 1997; de Souza et al., 1997). Além da função de APC, os macrófagos podem fagocitar eritrócitos infectados na ausência de anticorpos citofílicos ou opsonizantes específicos para malária (Serghides et al., 2003). No entanto, os macrófagos tornam-se mais efetores quando atuam em conjunto com a imunidade adaptativa, através da fagocitose de eritrócitos infectados mediada por anticorpo ou a produção de moléculas anti-parasitárias como o NO, após sua ativação pelo IFN-γ produzido pelas células T $CD4^+$ (Good, Doolan, 1999). Já as células dendríticas podem ser ativadas por produtos do parasita, através de receptores do tipo Toll, e assim desenvolver respostas pró-inflamatórias, bem como a apresentação de antígenos às células T. Esses receptores atuam de maneira dependente da molécula adaptadora MyD88 (do inglês *Myeloid Differentiation primary response gene 88*), visto que camundongos deficientes de MyD88 produzem quantidades menores de IL-1 (Interleucina-1), IL-6 (Interleucina-6) e IL-12 e apresentam uma menor produção de IFN-γ pelas células T $CD4^+$ (Franklin et al., 2007). Porém, apesar da importância dos receptores do tipo Toll na resposta pró-inflamatória, consequentemente na patogenia da malária, e na ativação das células T, estas moléculas não são cruciais para o controle da fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*.

Apesar da forte resposta Th1 observada na fase aguda da infecção, caracterizada por níveis elevados de IFN-γ e IL-12, bem como anticorpos do tipo IgG2a; ocorre um desenvolvimento de resposta do tipo 2 (Th2), durante a fase crônica. Essa resposta é caracterizada, principalmente, por altos níveis de IL-4 (Interleucina-4) e IgG1 (Imunoglobulina 1). Nesta fase, parece que é a resposta Th2

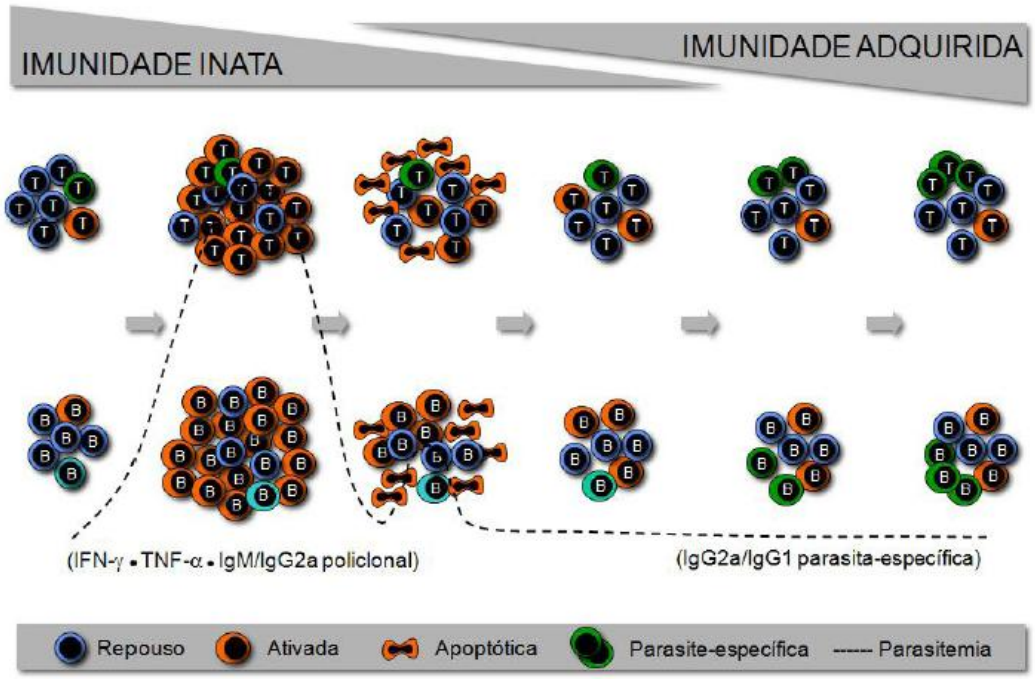
que atua na manutenção dos níveis baixos de parasitemia, visto que o aparecimento desta resposta inibe as respostas Th1. A resposta é voltada para produção de anticorpos IgG1 específicos contra o parasita, por células B ativadas, que necessitam da interação com células T $CD4^+$ para a sua função efetora. O envolvimento das células T $CD8^+$ se torna maior nesta fase, visto que a eliminação dessas células não altera o curso ou o nível inicial da parasitemia, porém, afeta o controle final, resultando em alguns pequenos picos recorrentes de parasitemia e consequentemente, aumentando o tempo de eliminação do parasita (Podoba, Stevenson, 1991).

A transição entre a fase aguda e crônica da infecção é marcada pela eliminação de grande parte dos linfócitos T ativados durante a fase aguda por apoptose (Helmby et al., 2000; Muxel et al., 2011). Nesse momento, as células efetoras específicas e de memória estão sendo geradas, e o declínio no número de células ativadas reduz parte do controle da parasitemia, refletindo em um pequeno pico recrudescente (Helmby et al., 2000). Os mecanismos envolvidos na eliminação das células efetoras observada após a fase aguda da infecção, ainda são pouco conhecidos, sendo que, ao menos em parte, essa apoptose parece ser mediada por Fas. Isto porque a expressão aumentada de Fas e Fas-ligante (Fas-L) em células do baço está relacionada à morte apoptótica durante a infecção por *P. chabaudi* (Elias et al., 2005; Helmby et al., 2000). Também foi sugerido que mecanismos reguladores da resposta imune promovam esta eliminação, visto que a presença de citocinas como TGF-β e IL-10 indica uma possível participação das células T_{reg} (Li et al., 1999; Omer, Riley, 1998). A IL-10 é conhecida como uma citocina anti-inflamatória capaz de modular a produção de citocinas pró-inflamatórias. Camundongos deficientes de IL-10, infectados com *P. chabaudi,* apresentam uma patologia aumentada que parece ser mediada pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF-α (Li et al., 2003). Além disso, a neutralização de TGF-β em camundongos IL-$10^{-/-}$ leva a uma doença fatal (Li et al., 2003). Isto porque, a produção de TGF-β diminui a severidade da malária por modular as citocinas pró-inflamatórias, responsáveis pelos sinais clínicos da infecção (Omer, Riley, 1998).

Na infecção letal por *P. chabaudi adami*, a ativação e a expansão das células T_{reg} contribuem para o controle da resposta inflamatória associada à infecção letal

(Cambos et al., 2008). As células T_{reg} expressam o fator de transcrição Foxp3 e podem produzir as citocinas IL-10 e TGF-β como uma de suas funções efetoras. Outros mecanismos de ação das células T_{reg} podem exigir contato entre as células. Isto inclui a alta expressão de CTLA-4 (do inglês *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*), que permite o contato da célula T_{reg} às APCs, via CTLA-4/B7 (Vignali et al., 2008). A inibição das APCs induz à supressão das respostas de células T. O CTLA-4 é expresso em células T logo após a ativação, possuindo um papel inverso ao do CD28, constituindo um mecanismo inibitório. As moléculas inibitórias expressas em células T podem favorecer a apoptose dessas células ou constituir um mecanismo de regulação por célula T_{reg}. Moléculas como PD-1 (do inglês *Programmed Death 1*) e seu ligante PD-L1 (do inglês *Programmed Death Ligand 1*) são expressas em células T efetoras durante infecções e inibem a resposta imune (Barber et al., 2006; Bhadra et al., 2011; Day et al., 2006). Já se sabe que células T_{reg} induzidas (iT_{reg}) expressam altos níveis de PD-1 (Haribhai et al., 2011) e que o contato entre PD-1 e PD-L1 constitui um mecanismo de regulação (Francisco et al., 2010). Enfim, diversos mecanismos de regulação podem atuar na malária. Estudar estes mecanismos parece ser essencial, já que durante a infecção por *P. chabaudi*, a presença de células T_{reg} é importante para a redução da imunopatologia; porém pode ser também uma forma de reduzir o controle sobre o parasita. No entanto, estudos indicam que a capacidade de controlar e eliminar o parasita exige um equilíbrio entre as células T efetoras e reguladoras (Berreta et al., 2011), e isto determina a cronicidade ou severidade da doença. Mais estudos, com os diferentes modelos de malária, são necessários para entender melhor o envolvimento dos mecanismos de regulação seja na resolução ou agravamento da doença.

Figura 3 - Resposta dos linfócitos esplênicos à infecção pelo *P. chabaudi*.



1.4 Moléculas inibitórias PD-1 e PDL-1

A molécula inibitória PD-1 (também conhecida como CD-279) pertence à superfamília B7-CD28 e é expressa em células T logo após a ativação do TCR. A sinalização por PD-1 é diferente de CTLA-4, porém ambos suprimem a ativação da célula T (Parry et al., 2005). Nas células T, PD-1 não sinaliza na ausência de sinal de TCR (do inglês *T Cell Receptor*) e sua sinalização requer proximidade ao TCR. Após a ligação de PD-1 ao seu ligante, o recrutamento das fosfatases SHP-1 e SHP-2, que agem nas quinases sinalizadoras da via do TCR, diminui o sinal do TCR, levando a uma redução da ativação das células T e da produção de citocinas (Chen, 2004; Freeman et al., 2000; Sharpe, Freeman, 2002). A inibição da ativação por PD-1 é direcionada à supressão da atividade de PI3K (do inglês *Phosphoinositide 3-Kinase*), podendo então diminuir a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-xL, além de reduzir a atividade de Akt levando à deficiência na produção de IL-2, na síntese protéica, na proliferação, e consequentemente induzindo um estado anérgico ou até mesmo a morte da célula T (Chen, 2004; Parry et al., 2005). O PD-L1 (também conhecido como B7-H1 e CD274) é o principal ligante de PD-1 por ser

constitutivamente expresso em muitas células (Yamazaki et al., 2002). Além do PD-L1, o PD-1 possui como ligante o PD-L2, também conhecido como B7-DC e CD273 (Latchman et al., 2001), que está presente em células dendríticas e macrófagos (Yamazaki et al., 2002). Tanto PD-L1 quanto PD-L2, aumentam sua expressão após a ativação.

As células T ativadas em infecções podem expressar níveis altos de PD-1 e PD-L1. O aumento da expressão de PD-1 em células T durante infecções está associado à perda de função destas células, sendo que o bloqueio de PD-L1 restaura a função das células T melhorando a resposta à infecção (Barber et al., 2006; Bhadra et al., 2011; Day et al., 2006). A ativação de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ durante a resposta imune ao estágio sanguíneo de *P. yoelii* leva a um aumento da expressão de PD-1 nessas células (Chandele et al., 2010). Além disso, em uma infecção viral aguda com vaccínia vírus, a presença de PD-1 é capaz de regular o desenvolvimento da memória de células T $CD8^+$ (Allie et al., 2011). Na infecção por *Toxoplasma gondii*, o bloqueio de PD-L1, além de melhorar a produção de IFN-γ, restaura a proliferação das células T $CD8^+$ impedindo a reativação do parasita (Bhadra et al., 2011). Já na miocardite induzida por *Trypanosoma cruzi,* o PD-1 tem um papel regulador da inflamação, e a sua ausência exacerba a resposta inflamatória do tecido cardíaco levando a morte (Gutierrez et al., 2011). A regulação mediada por PD-1 em infecções reduz os efeitos prejudiciais ao hospedeiro de respostas inflamatórias, porém poderia constituir um mecanismo de evasão da resposta imune por patógenos. Os últimos estudos em malária demonstram um importante papel de PD-1 e PD-L1 durante a infecção por diferentes espécies de plasmódios. Na infecção aguda com *P. berghei* ANKA, o bloqueio da via PD-1/PD-L1 leva ao surgimento de malária cerebral em camundongos resistentes (Balb/C) (Hafalla et al., 2012). Isto ocorre porque o bloqueio desta via reguladora das células T induz o aumento da ativação das células T, com maior produção de IFN-γ, levando a uma elevada adesão de eritrócitos infectados e células T $CD8^+$ ao endotélio, causando então, a malária cerebral. Em outro estudo, a função de PD-1 e PD-L1 na malária causada por *P. yoelli*, está em regular a produção de anticorpos para a fase crônica da infecção. Neste estudo, foi observado que o bloqueio de PD-L1 com LAG-3 leva a um aumento no número de células T $CD4^+$ foliculares (T $CD4^+_{FH}$), induzindo a uma maior produção de anticorpos pelas células B do centro germinativo, e estes

anticorpos provocam uma grande redução da parasitemia durante a fase crônica da infecção (Butler et al., 2011). Esses estudos parecem demonstrar um papel regulador importante de PD-1 e PD-L1 na malária.

As células T_{reg} expressam PD-1 e PD-L1 sob condições basais e aumentam a sua expressão sob estímulo (Francisco et al., 2010). Tanto as células T_{reg} naturais (nT_{reg}) quanto as iT_{reg} expressam PD-1, sendo que estas últimas expressam maiores níveis (Haribhai et al., 2011). O PD-L1 regula o desenvolvimento das células iT_{reg} bem como sua manutenção e função (Francisco et al., 2009). As células iT_{reg} apresentam um repertório de TCR com pouca similaridade com as células nT_{reg} (Haribhai et al., 2011), indicando uma possível diferença entre os seus alvos. Sabe-se que as células T_{reg} são capazes de controlar respostas imunes primárias (Haribhai et al., 2007), o que poderia indicar um possível envolvimento dessas células no controle de respostas imunes a infecções como a malária. A infecção da malária aumenta a rapidez da repopulação do baço com células T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ em camundongos desprovidos de células T_{reg}, em relação ao controle não-infectado. Assim, a infecção com *Plasmodium* poderia induzir a proliferação de células nT_{reg} ou até mesmo a indução de iT_{reg}. Portanto, as células T_{reg} talvez possam estar envolvidas no controle da resposta imune à malária e assim regularem de alguma forma a ativação do sistema imune. Ao mesmo tempo, o conjunto de células envolvidas na resposta imune à malária pode ser regulado apenas por moléculas presentes nessas células, como PD-1 e PD-L1, sem a necessidade de regulação mediada por células T_{reg}. O estudo de mecanismos regulatórios na malária é necessário para determinar se há ou não uma colaboração das células T_{reg} durante a resposta imune, e se a regulação é prejudicial ou fundamental para preservar o hospedeiro. E assim, através da investigação da contribuição de PD-1-PD-L1 nos mecanismos regulatórios da malária pode-se entender melhor os episódios inibitórios na resposta imune à infecção.

2 OBJETIVOS

Diante do exposto acima, nesse estudo buscou-se verificar a importância das moléculas PD-1 e PD-L1 durante a fase inicial da resposta imune à infecção por *P. chabaudi*, definindo um possível papel regulador dessas moléculas, durante a ativação e morte de células T $CD4^+$ e $CD8^+$. Dessa forma, os objetivos específicos visaram avaliar:

1) a cinética da expressão de PD-1 e seu ligante PD-L1, nas células do baço durante os primeiros 10 dias de infecção;
2) o efeito *in vitro* do tratamento com anticorpos anti-PD-L1 na ativação, proliferação e produção de IFN-γ nas células do baço estimuladas com EP;
3) a capacidade proliferativa de células T $CD4^+$, que expressam ou não PD-1, em camundongos no dia 7 de infecção.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Camundongos, parasitas e infecção

Foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6 (WT, do inglês *Wild Type*), C57BL/6-FoxP3-GFP e Nude, com oito a dez semanas de idade, fornecidos pelo biotério do Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo (Originalmente da *The Jackson Laboratory*) e mantidos em condição SPF (do inglês *specific pathogen-free*). *P. chabaudi* AS foi mantido como descrito previamente (Podoba, Stevenson, 1991). Os camundongos foram inoculados intraperitonealmente (i.p.) com 1 x 10^6 EP por *P. chabaudi* (cepa AS). A parasitemia foi monitorada por microscopia óptica através de esfregaço sanguíneo corado por Giemsa, de sangue obtido da cauda dos camundongos.

3.2 Suspensão de células do baço

Após a retirada do baço e maceração deste órgão, as células do baço foram lavadas e mantidas em RPMI 1640 gelado, suplementado com penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 ug/mL), 2-mercaptoetanol (50 uM), L-glutamina (2 mM), piruvato de sódio (1 mM), e 10% de soro fetal bovino inativado. Todos os suplementos foram adquiridos da *Invitrogen Life Technologies* (Carlsbad, California, USA). O número de células por baço foi contado usando uma câmara de Neubauer (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA).

3.3 Análise da expressão de PD-1, PD-L1 e outras moléculas

As células do baço (1 x 10^6) dos camundongos infectados foram marcadas com anticorpos monoclonais (mAb) anti-CD4, -CD8, -CD19, -PD-1, -PD-L1, -CXCR-5, -GL7 e -CD69 acoplados aos fluorocromos PE (Ficoeritrina), PE-Cy5 (Ficoeritrina-Cy5), PE-Cy7 (Ficoeritrina-Cy7), APC (Aloficocianina), APC-Cy7 (Aloficocianina-Cy7), Pacific Blue e V-500 (BD Pharmingen, BD Biosciences, San Jose, California, USA e eBioscience, Santa Clara, California, USA), nos dias 0 (controle), 4, 7, 8 e 10 p.i. (pós-infecção). Dessa forma, foi avaliada a expressão de PD-1 e PD-L1, junto com outras moléculas, nas células T $CD4^+$, $CD4^+FoxP3^+$ e $CD8^+$ e células B por

citometria de fluxo. Os dados foram analisados pelo software *FlowJo 7.2.5* (Tree Star Inc, Ashland, Oregon, USA).

3.4 Inibição da via PD-1-PD-L1

A inibição da via PD-1-PD-L1 foi feita por meio de mAb anti-PD-L1 [purified anti-mouse CD274 (B7-H1, PD-L1) (clone 10F.9G2), Biolegend, San Diego, California, USA] para bloquear a interação de PD-1 ao seu ligante PD-L1. A inibição foi feita durante o cultivo *in vitro* com EP ou com mAb anti-CD3.

3.5 Ensaio de proliferação com CFSE ou CellTrace Violet

As células do baço dos animais infectados foram marcadas com *5,6-carboxy-fluorescein-succinimidyl-ester* (CFSE; Molecular Probes, Invitrogen Life Tecnologies) ($3x10^7$ células suspensas em PBS com 0,1% de BSA) em uma concentração final de 5 µM por 20 minutos em 37 ºC; ou com *CellTrace Violet* (Molecular Probes, Invitrogen Life Tecnologies) ($6x10^6$ células suspensas em PBS) na concentração final de 2mM, também por 20 minutos a 37 ºC. Então, 1 x 10^6 células marcadas do baço de camundongos infectados nos dias 4, 6 e 7 p.i., foram cultivadas com 3 x 10^6 EP ou mAb anti-CD3 a 37 ºC e em atmosfera com 5% de CO_2 por 72 horas. As células foram cultivadas nessas condições com ou sem inibição da via PD-1-PD-L1 com mAb anti-PD-L1. A proliferação foi avaliada por citometria de fluxo em um BD FACSCanto, considerando-se a redução da intensidade de fluorescência do CFSE ou *Cell Trace Violet*.

3.6 Produção de IFN-γ e outras citocinas no sobrenadante de cultivo

Foi avaliada a produção de IFN-γ no sobrenadante das células cultivadas por 24 e 72 h. Os sobrenadantes foram retirados a partir do cultivo das células do baço com EP, com ou sem inibição da via PD-1-PDL-1 e mantidos a -80 ºC. O IFN-γ foi avaliado pelo método de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), através de kit de detecção *Mouse IFN-γ ELISA set* (BD OptEIA, BD Biosciences) seguindo o protocolo do fabricante. Além deste método, para detectar a presença das citocinas

IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-1β, IL-12, IL-17 no sobrenadante de culturas em proliferação estimuladas com EP, foi utilizado o kit Fluorokine® MAP (Bioplex, Bio-Rad, Hercules, California, USA) seguindo as recomendações do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA).

3.7 Produção de IFN-γ por marcação intracelular

As células do baço de camundongos nos dias 4, 5, 6 p.i. foram cultivadas por 20 horas sob estímulo de EP, sendo que nas últimas 12 horas de cultivo foi adicionado GolgiStop (Monensina) (BD Pharmingen, BD Biosciences) (4 μl para $6x10^6$ células) às células cultivadas. Após o cultivo, as células foram marcadas extracelularmente com mAb anti-CD4. Então, foram fixadas e permeabilizadas com Fixation/Permeabilization solution, e marcadas intracelularmente para IFN-γ. O procedimento seguiu o protocolo do fabricante do kit de marcação intracelular Cytofix/Cytoperm (BD Pharmingen, BD Biosciences). Após a marcação, essas células foram lidas em um citômetro de fluxo BD FACSCanto e as amostras analisadas quanto à porcentagem de células produtoras de IFN-γ pelo programa Flowjo (*Tree Star Inc*).

3.8 Ensaio de purificação de células por *Cell Sorting* para proliferação

Foram purificadas populações celulares diferentes quanto à expressão de PD-1 e PD-L1. As células T $CD4^+FoxP3^-$ com alta expressão de PD-L1 porém negativas para PD-1; ou uma população com baixa expressão de PD-L1 mas positivas para PD-1, foram purificadas por *Cell Sorting* em um citômetro de Fluxo BD FACSAria, a partir do baço de camundongos com 7 dias de infecção. As células T $CD4^+FoxP3^-$, com baixa expressão de PD-L1 e simultaneamente nenhuma expressão de PD-1, foram purificadas dos animais controles. Essas populações foram marcadas para *Cell Trace Violet* e $0,5x10^5$ células foram cultivadas com células do baço de camundongos Nude ($2x10^5$ APCs) e estimuladas com mAb anti-CD3, por 72 horas. O cultivo das células do dia 7 p.i. foi feito individualmente para cada população purificada. A proliferação foi analisada por citometria de fluxo de acordo com a redução na intensidade de fluorescência do *Cell Trace Violet*.

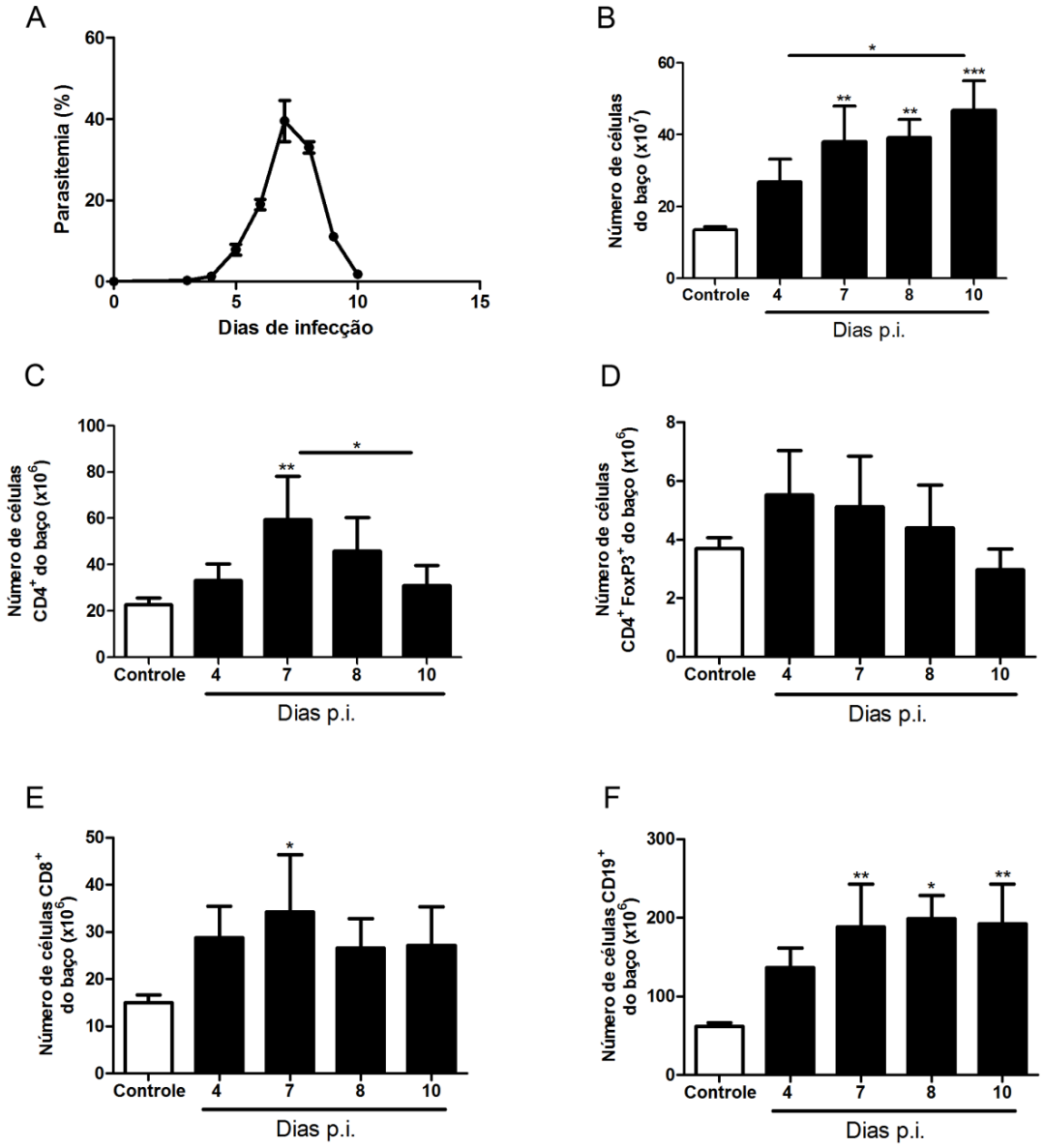
3.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com os testes One ou Two-way ANOVA, seguido por análise do Teste de Bonferroni. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Prisma 4 (Graph Pad Software, La Jolla, California, USA) e as diferenças foram consideradas significativas para valores de $p<0,05$ (5%).

4 RESULTADOS

Para iniciar os estudos, determinamos a cinética da parasitemia e do número de células totais, T $CD4^+$ e $CD8^+$ e B no baço nos dias 0, 4, 7, 8 e 10 p.i. (Fig. 4). O número de células no baço aumenta nos primeiros 10 dias de infecção (Fig. 4B), enquanto os números de células T $CD4^+$ convencionais (Fig. 4C) sofrem uma redução entre os dias 7 e 10. Embora ocorra a redução no número desses linfócitos, nesta fase a parasitemia já está sob controle e este evento de intensa morte pouco afeta este controle (Fig. 4A). Já a população de células T $CD4^+FoxP3^+$ reguladoras parecem ter uma tendência a aumentar seu número do dia 4 p.i. e gradativamente reduzir esse número até o dia 10 p.i., porém estas mudanças numéricas não foram significativas estatisticamente (Fig. 4D). As células T $CD8^+$ aumentam em número durante a infecção, mas não apresentam uma redução drástica em seu número ao final da fase aguda (Fig. 4E). As células B não apresentam redução em seu número durante a fase aguda da malária, ao contrário, elas aumentam em número no dia 4 p.i., mantendo-se em número constante até o dia 10 p.i. (Fig. 4F).

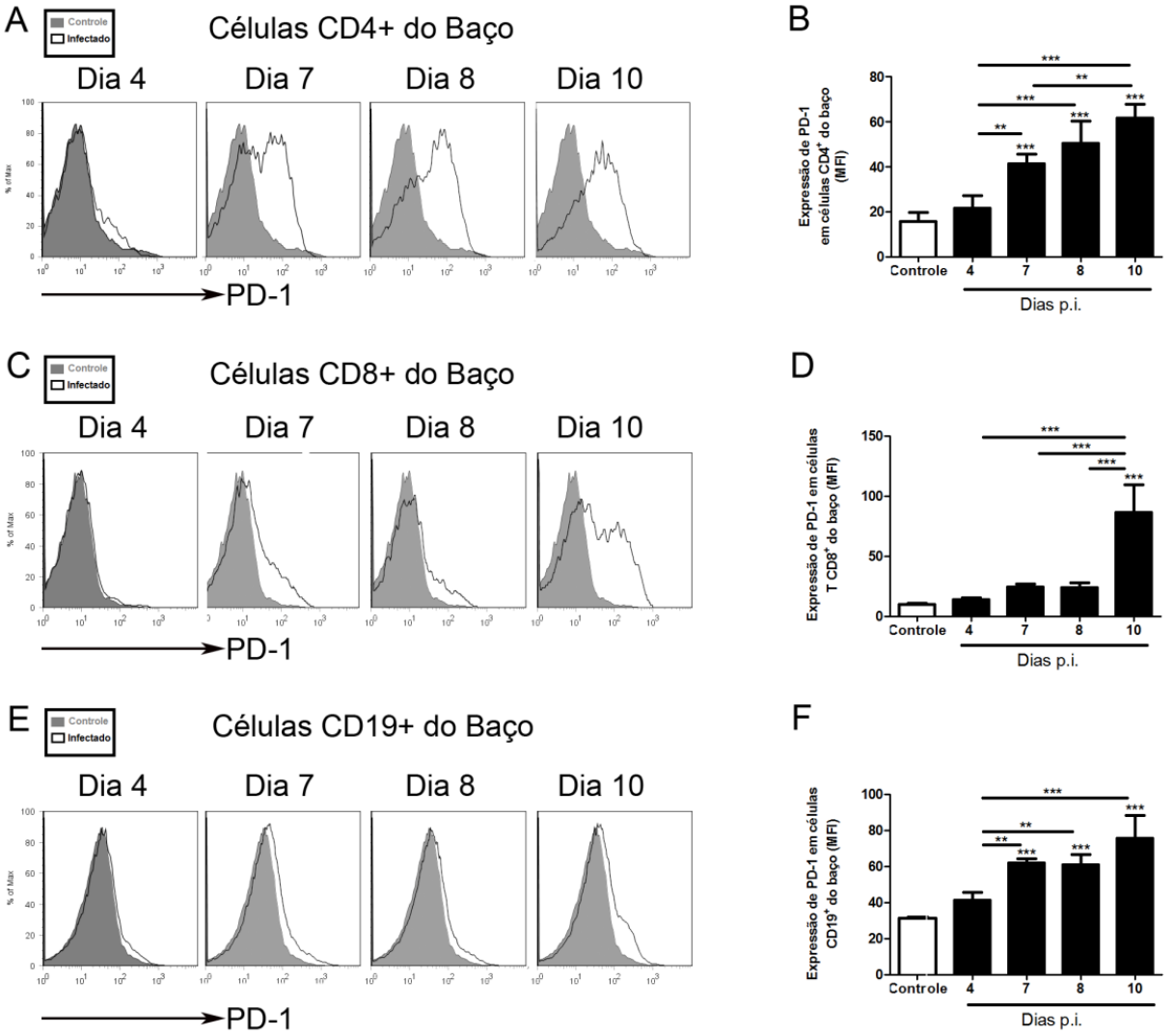
Figura 4 - Cinética da parasitemia e número de células no baço durante a fase aguda da malária pelo *P. chabaudi*.



Os camundongos C57BL/6 foram infectados com 10^6 EP e em diferentes dias de infecção, a parasitemia foi monitorada por esfregaço sanguíneo e os baços foram retirados e processados para a contagem de células e citometria de fluxo. (A) Parasitemia dos camundongos durante os primeiros 10 dias p.i.. Os valores diários obtidos de parasitemia se referem às porcentagens de eritrócitos infectados observados no esfregaço sanguíneo. (B) Número de células totais no baço dos camundongos infectados em diferentes dias p.i.. Após serem processadas, as células do baço foram contadas em câmara de Neubauer e o número total de células do baço foi calculado. (C-F) Número de linfócitos $CD4^+FoxP3^-$ convencionais (C), $CD4^+FoxP3^+$ reguladoras (D), $CD8^+$ (E) e $CD19^+$ (F). A porcentagem desses tipos celulares foi obtida por citometria de fluxo, e considerando-se o número total de células no baço, foram obtidos os números desses linfócitos. Os dados representam dois experimentos realizados ($n \geq 3$). Os asteriscos localizados acima das barras representam diferenças estatísticas em relação ao controle (camundongos não infectados). Enquanto os asteriscos acima das linhas representam as diferenças entre as barras indicadas. *$p<0,05$, **$p<0,01$, ***$p<0,001$.

A redução drástica no número de células T $CD4^+$ convencionais durante a fase aguda é um evento, provavelmente causado pela intensa morte das células efetoras. Já se sabe que, parte dessa morte é mediada pelo mecanismo Fas-FasL, porém esse controle pode depender de outros mecanismos que regulam a resposta imune. Então, nosso próximo passo foi verificar a importância das moléculas PD-1 e PD-L1 no controle das células efetoras observado na malária pelo *P. chabaudi*. Inicialmente, investigamos o nível de expressão dessas moléculas nas células T $CD4^+$ convencionais, $CD4^+FoxP3^+$ reguladoras e $CD8^+$, e B, durante os primeiros 10 dias de infecção. Observamos que nas células T $CD4^+$ convencionais o aumento na expressão de PD-1 ocorre entre os dias 7 e 8, (Fig. 5A e 5B). As células T $CD4^+FoxP3^+$ reguladoras mantém a sua expressão de PD-1 constante sem demonstrar nenhum aumento ou redução significativa na expressão desta molécula (dados não mostrados). Já as células T $CD8^+$ aumentam pouco a expressão de PD-1, sendo que o aumento significativo ocorre tardiamente aos 10 dias p.i. (Fig. 5C e 5D). As células B têm um pequeno aumento na expressão de PD-1 nos dias de infecção avaliados (5E e 5F). A expressão de PD-L1 é observada em todos os tipos celulares estudados (Fig. 6). Tanto nas células T $CD4^+$ convencionais e $FoxP3^+$ reguladoras (Fig. 6A-D) quanto nas células T $CD8^+$ (Fig. 6E e 6F) é observado um aumento na expressão de PD-L1 inicialmente aos 4 dias p.i., seguido de uma queda nessa expressão no dia 10 p.i. (Fig. 6A-F). Porém, apenas nas células T $CD4^+$ convencionais e $CD8^+$ observamos um aumento máximo no dia 7 p.i. e a seguir uma queda gradativa na expressão de PD-L1 até o dia 10 p.i. (Fig. 6A e 6B; 6E e 6F). Nas células B, verifica-se que no dia 4 p.i. há um aumento na expressão de PD-L1, e a expressão desta molécula tende a ser maior no dia 8 p.i., com uma queda no dia 10 p.i. em seu MFI (Média da Intensidade de Fluorescência, do inglês *Mean Fluorescence Intensity*) (Fig. 6G e 6H). O aumento na expressão de PD-L1 nas células B é bem expressivo, de tal forma que há o aparecimento de uma população com alta expressão de PD-L1 ($PD\text{-}L1^{hi}$) e uma baixa expressão de CD19 ($CD19^{lo}$) (Fig. 6I e 6J). O aparecimento da população $CD19^{lo}PD\text{-}L1^{hi}$ inicia-se no dia 7 p.i., segue aumentando no dia 8, e no dia 10 chega a representar quase 40% das células B (Fig. 6I). Portanto, de alguma forma, PD-1 e PD-L1 estão associadas à fase aguda da malária, já que foi observado um aumento na expressão dessas moléculas nos linfócitos durante a infecção.

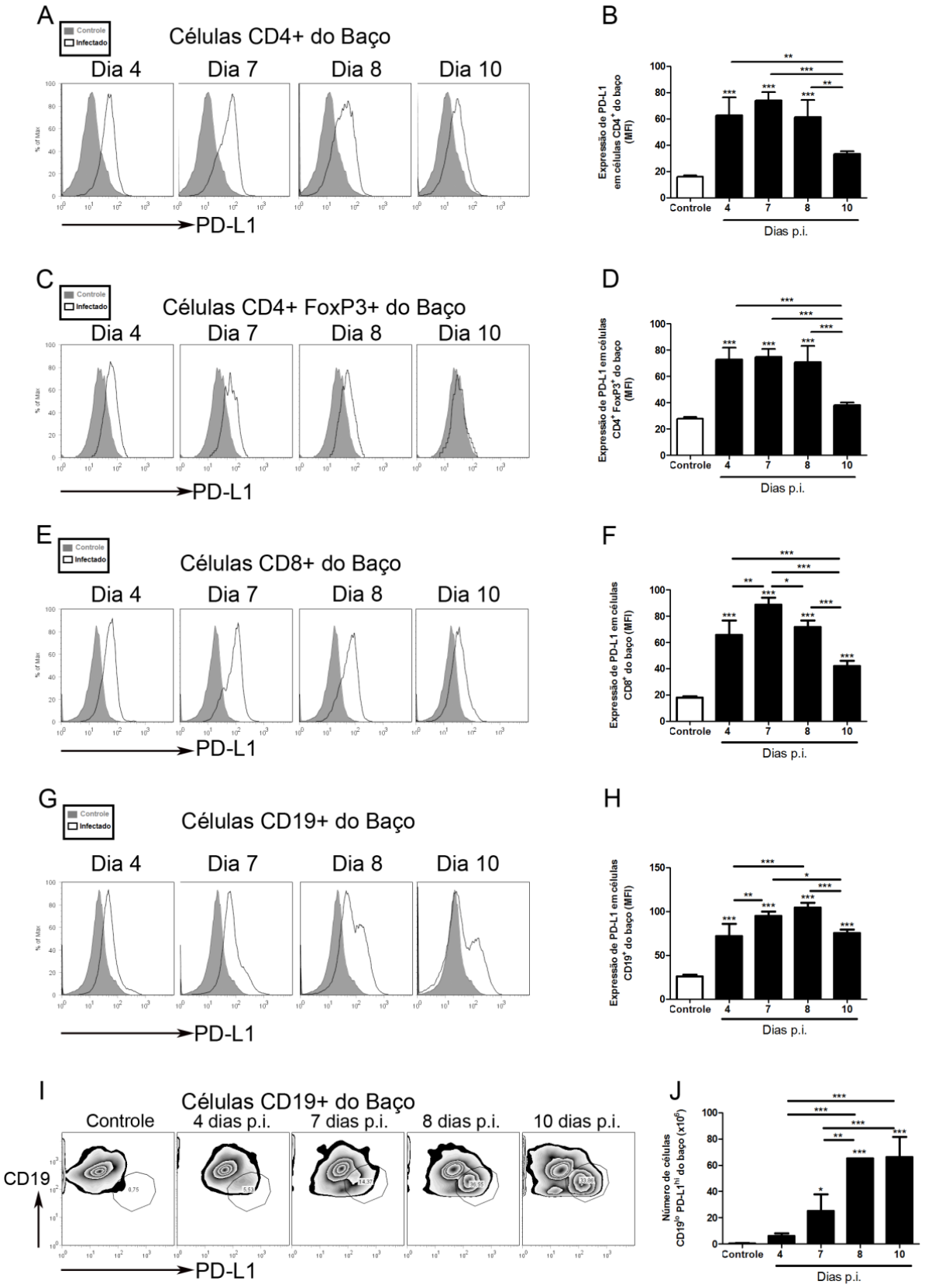
Figura 5 - Cinética da expressão de PD-1 nos linfócitos esplênicos durante a infecção por *P. chabaudi.*



As células do baço dos camundongos infectados e não infectados foram analisadas para a expressão de PD-1 por citometria de fluxo em diferentes dias após a infecção. (A, C e E) Histogramas representativos da cinética de expressão de PD-1 em células T $CD4^+$ convencionais (A), $CD8^+$ (C) e células B (E). (B, D e F) Gráfico de barras da análise da expressão de PD-1 por MFI em células T $CD4^+$ (B), $CD8^+$ (D) e células B (F). Os dados representam dois experimentos realizados (n=4). Os asteriscos localizados acima das barras representam diferenças estatísticas em relação ao controle (camundongos não infectados). Enquanto os asteriscos acima das linhas representam as diferenças entre as barras indicadas. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

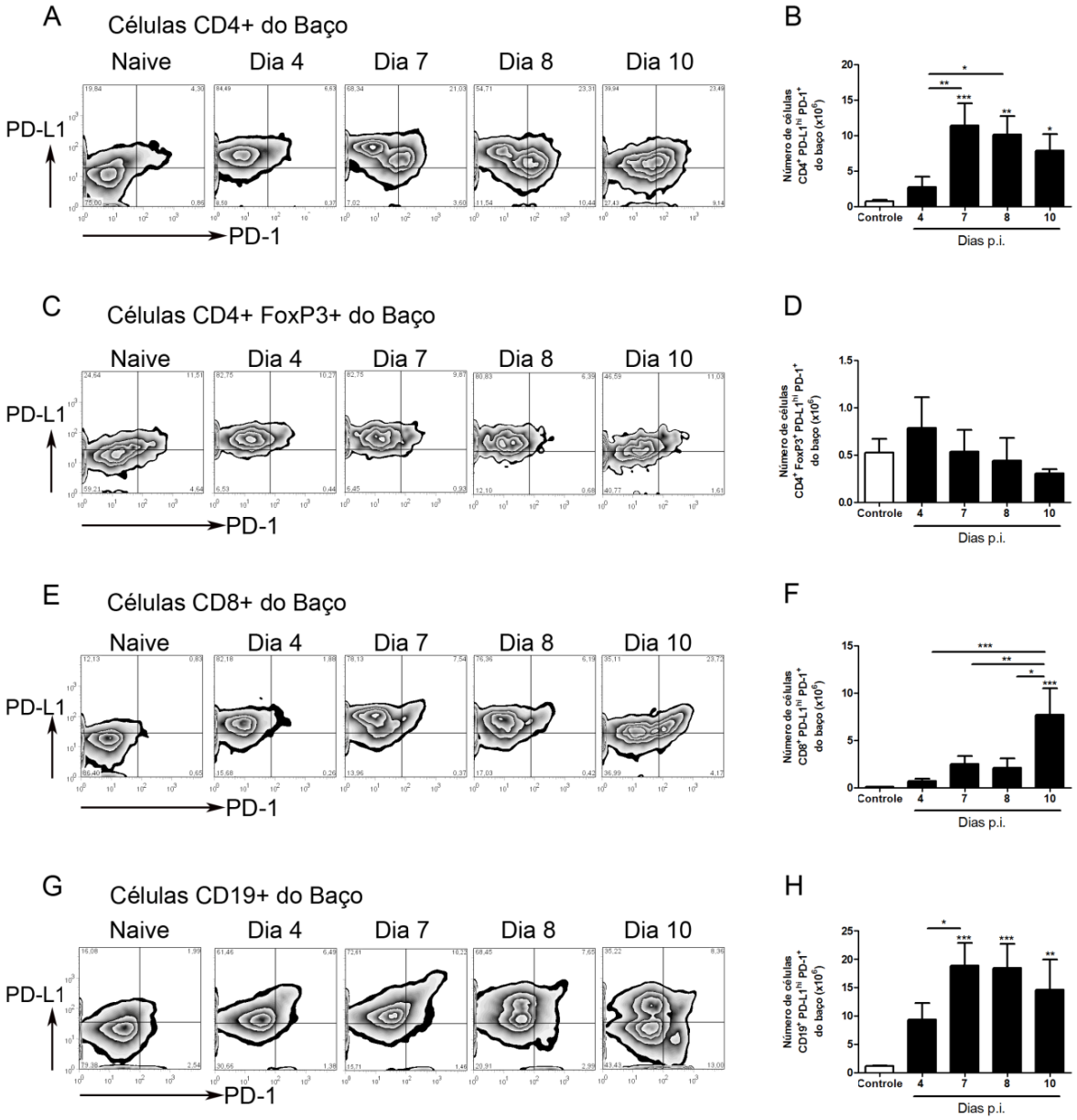
As células do baço dos camundongos infectados e não infectados foram analisadas para a expressão de PD-L1 por citometria de fluxo em diferentes dias após a infecção. (A, C, E e G) Histogramas representativos da cinética de expressão de PD-L1 em células T $CD4^+$ convencionais (A), $CD4^+FoxP3^+$ reguladoras (C), $CD8^+$ (E) e B $CD19^+$ (G). (B, D, F e H) Gráfico de barras da análise da expressão de PD-L1 por MFI em células T $CD4^+$ convencionais (B), $CD4^+FoxP3^+$ reguladoras (D), $CD8^+$ (F) e B $CD19^+$ (H). (I) Análise da expressão de PD-L1 em células B $CD19^{lo}$. (J) Gráfico de barras com o número de células $CD19^{lo}PD\text{-}L1^{hi}$ em cada dia de infecção estudado. Os dados representam dois experimentos realizados (n=4). Os asteriscos localizados acima das barras representam diferenças estatísticas em relação ao controle (camundongos não infectados). Enquanto os asteriscos acima das linhas representam as diferenças entre as barras indicadas. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Figura 6 - Cinética da expressão de PD-L1 nos linfócitos esplênicos durante a infecção com *P. chabaudi.*



Durante as análises de expressão de PD-1 e PD-L1 pudemos também verificar a coexpressão dessas moléculas nos tipos celulares estudados. Com isso, observamos que as células T $CD4^+$ convencionais mostram um aumento no número de células $PD\text{-}1^+PD\text{-}L1^{hi}$ no dia 7 p.i. seguido de uma redução gradativa no número desta população até o dia 10 p.i. (Fig. 7A e 7B). Já, as células T $CD4^+FoxP3^+$ reguladoras não mudam o número de células em coexpressão de PD-L1 e PD-1 (Fig. 7C e 7D). De maneira semelhante a expressão de PD-1 por MFI, o número de células $PD\text{-}L1^{hi}PD\text{-}1^+$ dentro da população de células T $CD8^+$, aumenta somente no dia 10 p.i. (Fig. 7E e 7F). Quando observamos a coexpressão de PD-L1 e PD-1 nas células B, podemos ver uma semelhança com a cinética desta população nas células T $CD4^+$ convencionais, em que ocorre um aumento no número de células B $PD\text{-}L1^{hi}PD\text{-}1^+$ no dia 7 p.i. (Fig. 7G e 7H).

Figura 7 - Cinética da coexpressão de PD-L1 e PD-1 nos linfócitos esplênicos durante a infecção por *P. chabaudi.*

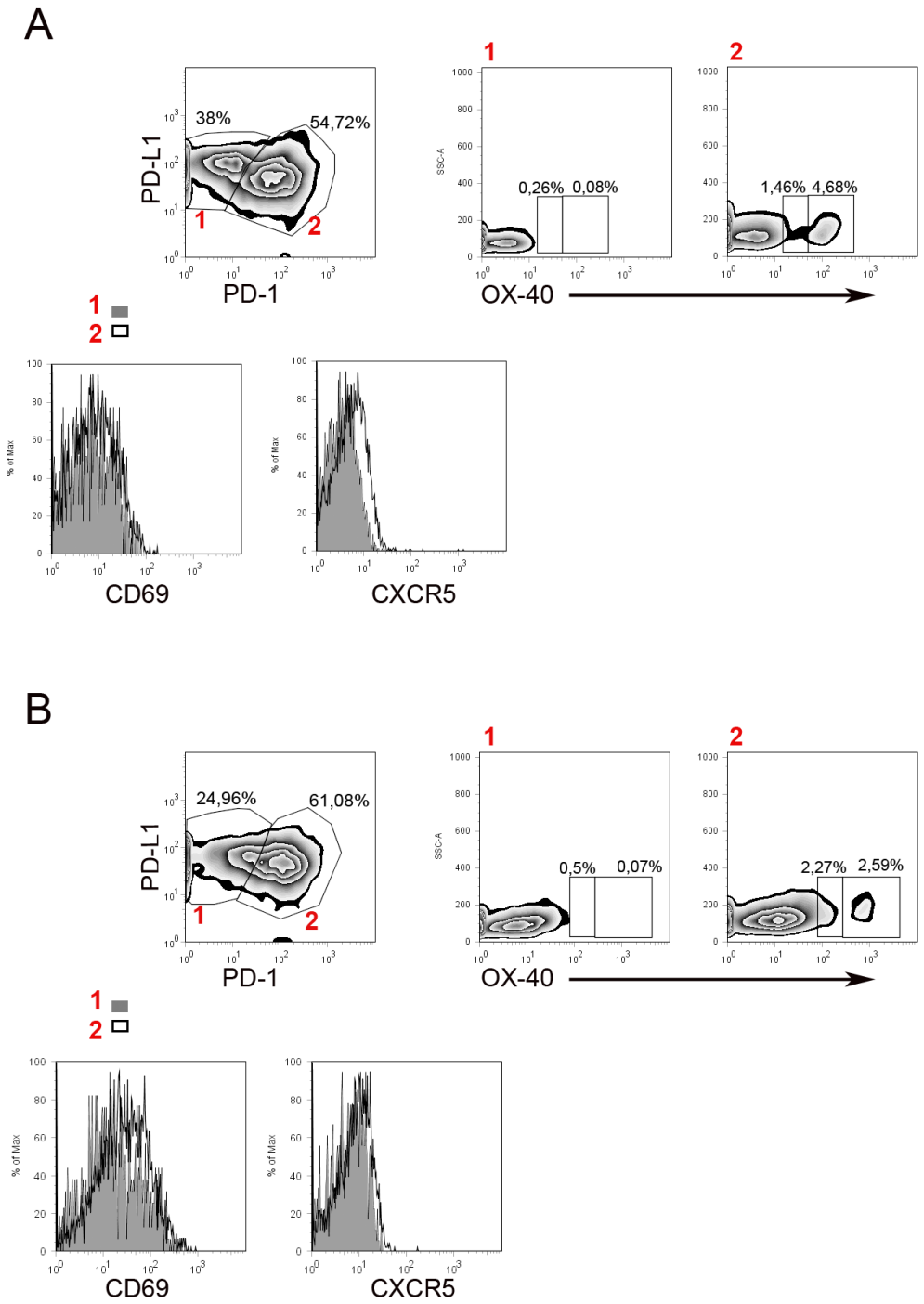


As células do baço foram analisadas para o aparecimento de uma população PD-L1^{hi}PD-1^{+} por citometria de fluxo, durante os primeiros 10 dias de infecção com *P. chabaudi*. (A-H) Cinética da coexpressão de PD-L1 e PD-1 nas células T CD4^{+} convencionais (A e B), CD4^{+}FoxP3^{+} reguladoras (C e D), CD8^{+} (E e F) e células B (G e H). Os gráficos A, C, E e G representam a análise de citometria de fluxo de seus respectivos tipos celulares. Já, os gráficos B, D, F e H se referem ao número de células PD-L1^{hi}PD-1^{+} de cada população estudada. Os dados representam apenas um experimento realizado (n=4). Os asteriscos localizados acima das barras representam diferenças estatísticas em relação ao respectivo controle (não-infectado). Enquanto os asteriscos acima das linhas representam as diferenças entre as barras indicadas. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Durante a fase aguda da infecção, as alterações na expressão de PD-1 e/ou PD-L1 nas células T $CD4^+$ e nas células B foram tão significativas que ocasionaram a formação de subpopulações dentro das populações desses linfócitos. Em vista disso, caracterizamos estas subpopulações em relação a marcadores de ativação, no caso das células T $CD4^+$, bem como a marcadores relacionados a populações celulares presentes no centro germinativo, de ambas as subpopulações de linfócitos. Dentre as células T $CD4^+$, formam-se duas populações com diferentes níveis de expressão de PD-1 e PD-L1. Uma população apresenta altos níveis de expressão de PD-L1, porém nenhuma expressão de PD-1; a outra tem expressão de PD-1, mas baixa expressão de PD-L1 (Fig. 8). Estas subpopulações de células T $CD4^+$ surgem no dia 7 p.i. e permanecem até o dia 8 p.i. (Fig. 7A). Caracterizando a subpopulação $PD\text{-}1^+PD\text{-}L1^{lo}$ (população número 2 na figura 8) no dia 7 p.i. (Fig. 8A), observamos que apesar da baixa expressão de CD69, parte desta população tem alta expressão de OX-40, outra molécula indicadora de ativação. Já a população que é negativa para PD-1 (população número 1) não apresenta característica de serem ativadas, devido à baixa expressão tanto de CD69 quanto OX-40, em ambos os dias estudados (Fig. 8). Além disso, ao analisarmos o endereçamento de ambas as subpopulações de células T $CD4^+$ para o centro germinativo, através da expressão de CXCR-5, observamos que a população $PD\text{-}1^+PD\text{-}L1^{lo}$ têm uma expressão ligeiramente maior desta molécula no dia 7 p.i. (Fig. 8A). Já no dia 8 p.i., a população $PD\text{-}1^+PD\text{-}L1^{lo}$ apresenta maior ativação em relação à população $PD\text{-}1^-$ $PD\text{-}L1^{hi}$, como observado pela sua maior expressão de CD69, juntamente com a expressão de OX-40 (Fig. 8B). Em ambos os dias estudados, observamos que OX-40 possui diferentes níveis de expressão na população $PD\text{-}1^+PD\text{-}L1^{lo}$, sendo que se forma uma população com alta expressão desta molécula, e outra em que parte das células apresenta baixa expressão de OX-40 e parte nenhuma expressão (Fig. 8). No entanto, a grande diferença entre os dias estudados é a porcentagem de células expressando baixos ou altos níveis de OX-40. Isto porque, no dia 7 p.i., observamos que há uma maior porcentagem de células que expressam altos níveis e menos que expressam baixos níveis de OX-40 (Fig. 8A). Por outro lado no dia 8 p.i., a porcentagem de células que estão expressando um nível alto de OX-40 é semelhante à porcentagem de células que expressa pouco OX-40 (Fig. 8B). Quanto à subpopulação formada entre as células B ($CD19^{lo}PD\text{-}L1^{hi}$), analisamos somente expressão de marcadores de centro germinativo; já que a alta expressão de PD-L1

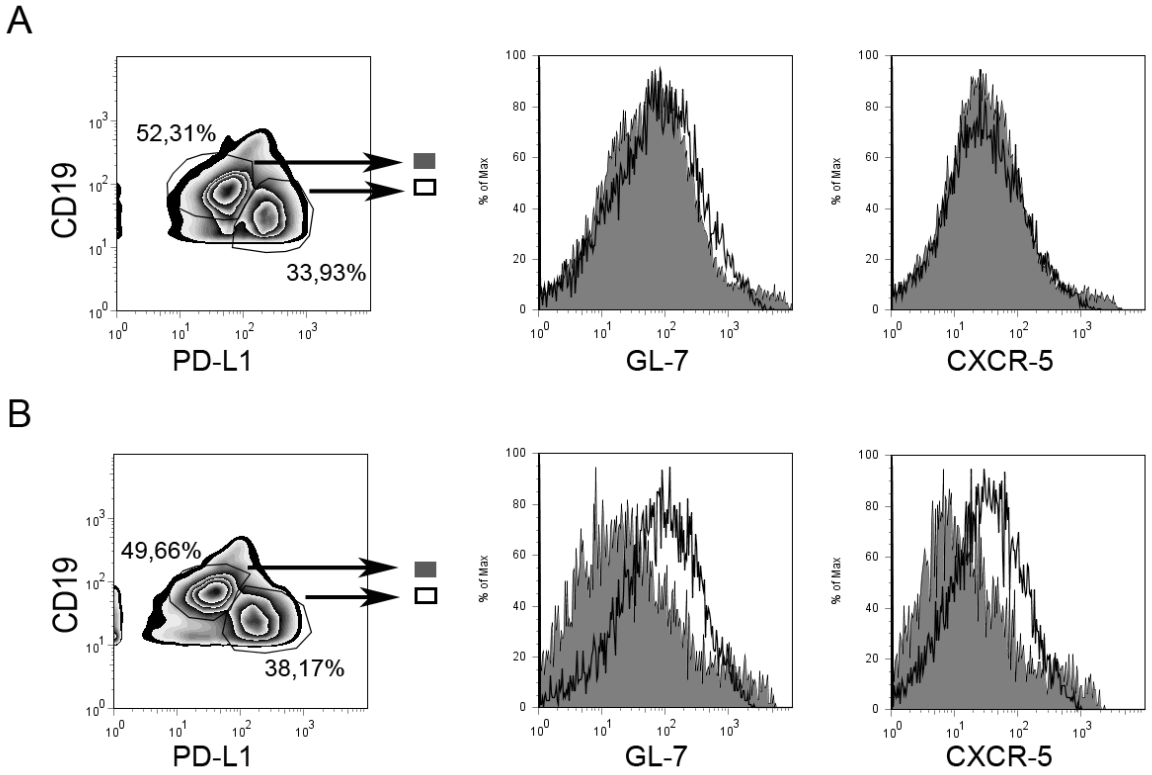
junto com a baixa expressão de CD19 são características de plasmablastos do centro germinativo. Para verificar essa possibilidade, as células foram marcadas para GL-7 e CXCR-5 nos dias 8 e 10 p.i., que são os dias em que essa subpopulação de células B está em maior evidência (Fig. 6I). Observamos que apenas no dia 10 p.i., a subpopulação $CD19^{lo}PD\text{-}L1^{hi}$ apresenta uma maior expressão de GL-7 e CXCR-5 em relação à subpopulação com baixa expressão de PD-L1 deste mesmo dia de infecção (Fig. 9B). Portanto, a expressão de PD-1 e PD-L1 além de estar relacionada à ativação pode se relacionar também à produção de anticorpos na malária murina.

Figura 8 - Caracterização das populações de células T CD4^{+} formadas pela expressão de PD-1 e PD-L1 nos dias 7 e 8 p.i.



As células do baço de camundongos infectados no dia 7 p.i. (A) e 8 p.i. (B) foram analisadas quanto à expressão de PD-1, PD-L1, CD69, CXCR5 e OX-40. As duas populações evidenciadas, pela expressão de PD-1 e PD-L1 foram comparadas quanto a expressão dos marcadores utilizados. A população PD-1^{+}PD-L1^{lo} é representada pelo número 2 e por histogramas de linha preta, e a população PD-1^{-}PD-L1^{hi} pelo número 1 e por histogramas cinzas. As figuras representam apenas um experimento realizado (n≥3).

Figura 9 - Caracterização da população de células CD19^{lo}PD-L1^{hi} nos dias 8 e 10 p.i.

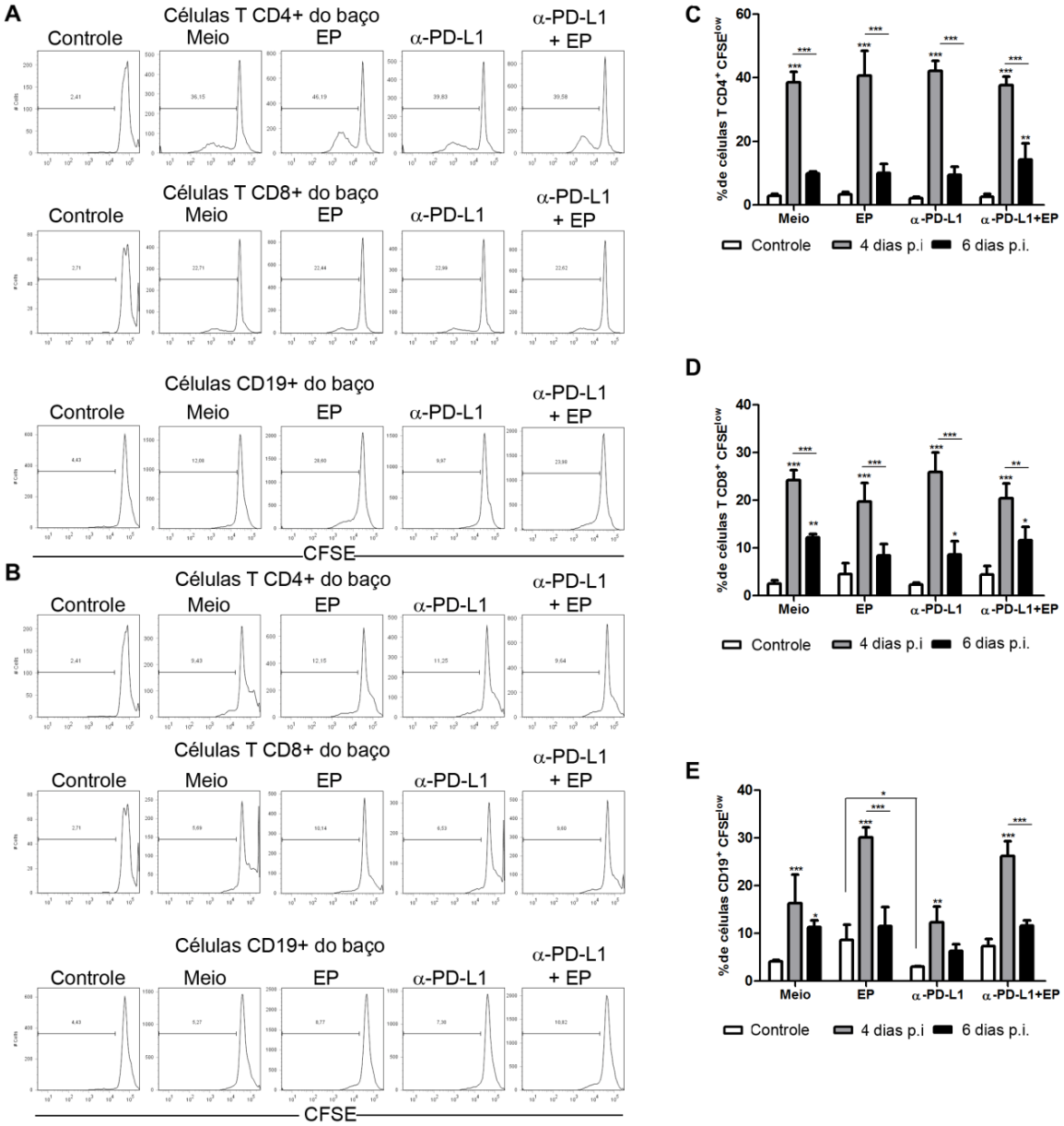


As células CD19^{lo}PD-L1^{hi} do baço de camundongos infectados após 8 (A) e 10(B) dias de infecção foram analisadas quanto à expressão de GL-7 e CXCR-5 conforme indicado pela seta, sendo que histogramas cinzas representam a população com baixa expressão de PD-L1 e os histogramas com linha preta representam a população CD19^{lo}PD-L1^{hi}. As figuras representam apenas um experimento realizado (n≥3).

Para verificar qual a importância e a função da interação PD-1-PD-L1 durante a fase aguda da malária, utilizamos a inibição *in vitro* com mAb anti-PD-L1. Primeiramente, procuramos determinar a importância da via PD-1-PD-L1 na proliferação das células T e B do baço. Sabe-se que a proliferação das células T CD4^{+} é máxima no dia 4 p.i. e que no dia 7 p.i. as células já não proliferam da mesma forma (Muxel et al., 2010, 2011). Assim, com o objetivo de observar como a inibição de PD-L1 afeta a proliferação, foi feita a inibição *in vitro* com anticorpos anti-PD-L1 por 72h, em células de baço dos dias 4 e 6 p.i. marcadas com CFSE. Escolhemos o dia 6 e não o dia 7 para inibir as células, porque no dia 7 a expressão de PD-1 e PD-L1 já está alta, então a inibição poderia ser ineficiente ou muito tardia para obter algum efeito na proliferação. Tanto no dia 4 p.i. quanto no dia 6 p.i., a

inibição da interação com PD-L1 não melhora a proliferação das células B (Fig. 10B e 10E), T CD4$^+$ (Fig. 10A e 10C) e CD8$^+$ (Fig. 10B e 10D).

Figura 10 - Proliferação dos linfócitos sob inibição de PD-L1 *in vitro*.



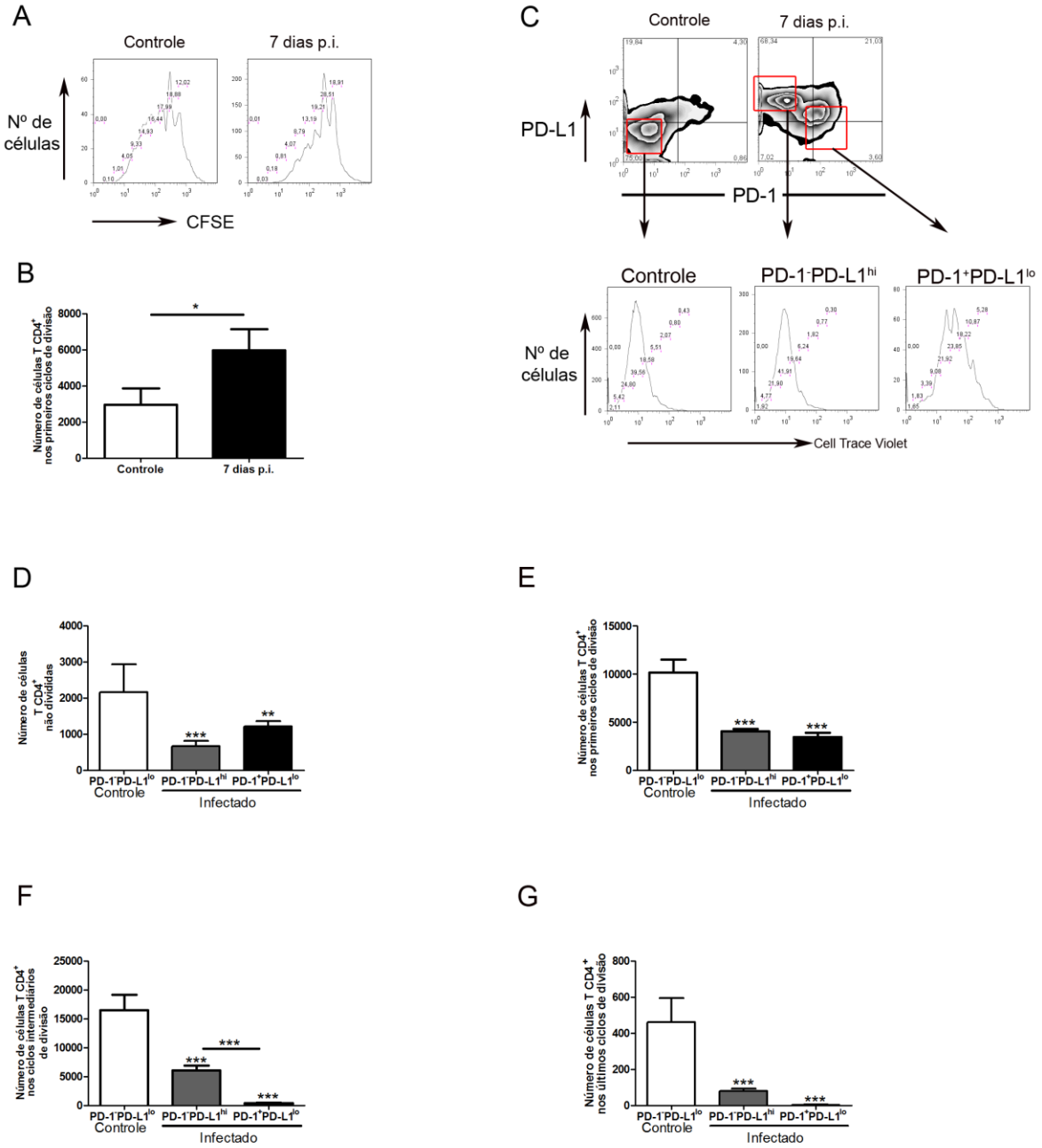
As células do baço de camundongos não-infectados (Controle) e infectados nos dias 4 e 6 p.i. foram marcadas com CFSE, cultivadas *in vitro* por 72 h com ou sem mAb anti-PD-L1 (α-PD-L1) e estimuladas ou não com EP. A proliferação das células foi analisada por citometria de fluxo com base na redução da marcação para CFSE. (A e B) Proliferação das células T CD4$^+$ (acima), CD8$^+$ (centro) e B (abaixo), sem nenhum estímulo (Meio), estimuladas com EP e com ou sem mAb anti-PD-L1 (α-PD-L1), aos 4 dias p.i. (A) e aos 6 dias p.i. (B). (C-E) A porcentagem de células em proliferação entre os grupos de camundongos infectados foi comparada sob as diferentes condições de cultivo, para células T CD4$^+$ (C), CD8$^+$ (D) e B (E). Os dados representam apenas um experimento realizado (n=3). Os asteriscos localizados acima das barras representam diferenças estatísticas em relação ao respectivo controle (não-infectado). Enquanto os asteriscos acima das linhas representam as diferenças entre as barras indicadas. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Apesar do bloqueio de PD-L1 não ter resultado em uma melhora na proliferação de células estimuladas com EP, ainda tentamos verificar algum papel de PD-1 e PD-L1 na inibição da proliferação de células T $CD4^+$. Sabemos que no dia 7 p.i., as células T $CD4^+$ são levadas a uma menor proliferação celular quando estimuladas com anticorpos anti-CD3 (Muxel et al., 2010), sugerindo um mecanismo regulador de sua proliferação. Interessantemente, no dia 7 p.i. duas populações diferentes para a expressão de PD-1 e PD-L1 surgem no baço entre as células T $CD4^+$, sendo que uma apresenta alta expressão de PD-L1 e é negativa para PD-1, e outra tem baixa expressão de PD-L1 e é positiva para PD-1 (Fig. 8 e 11C). Dessa forma, a fim de verificar se alguma dessas populações teria menor ou maior capacidade proliferativa, foi feita a purificação das duas populações de células T $CD4^+$ ($PD\text{-}1^-PD\text{-}L1^{hi}$ e $PD\text{-}1^+PD\text{-}L1^{lo}$) (Fig. 11C). Como controle, purificamos células T $CD4^+$ do baço de camundongo não-infectado com baixa expressão de PD-L1 e negativa para PD-1 (Fig. 11C). Essas células T $CD4^+$ foram cultivadas com APCs vindas de um baço de camundongo Nude e estimuladas com anticorpos anti-CD3, por um período de 72 h. Verificamos que as células T $CD4^+$ do dia 7 p.i. realmente possuem menor proliferação quando cultivadas por 72 h sob estímulo de anticorpos anti-CD3, como mostrado na figura 11A e B. Esta baixa proliferação é evidenciada por um maior número de células que pararam nos primeiros ciclos de divisão (Gerações 1, 2 e 3) (Fig. 11B). Quanto às populações de células T $CD4^+$ purificadas, após o cultivo dessas, observamos uma menor proliferação da população de células T $CD4^+PD\text{-}1^+PD\text{-}L1^{lo}$ (Fig. 11C-G). Estas células proliferaram menos que as células Controle e menos que as células T $CD4^+PD\text{-}1^-PD\text{-}L1^{hi}$ e isto fica mais evidente pelo menor número de células T $CD4^+PD\text{-}1^+PD\text{-}L1^{lo}$ que chegaram às gerações intermediárias (Gerações 4, 5 e 6) (Fig. 11F). As células T $CD4^+PD\text{-}1^-PD\text{-}L1^{hi}$ têm uma porcentagem de divisão semelhante às células do Controle, com aproximadamente 98% das células em proliferação (Fig. 11C), mas proliferam de maneira diferente das células Controle (Fig. 11D-G), sendo que as células T $CD4^+PD\text{-}1^-PD\text{-}L1^{hi}$ se concentram mais nos primeiros e intermediários ciclos de divisão (Fig. 11E e F) e as células Controle se concentram em grande número nas gerações intermediárias (Fig. 11F). Quando misturamos estas populações, não observamos a inibição de uma ou de outra. Ou seja, uma não regula a outra, nem mesmo a que expressa amplamente PD-L1 foi capaz de regular a que expressava

PD-1, sendo que essas populações misturadas tiveram proliferação semelhante de quando estavam separadas (dados não mostrados).

(A e B) As células do baço de camundongos não-infectados (naive) ou infectados aos 7 dias de infecção foram marcadas para CFSE e estimuladas por 72 h com anti-CD3. Após esse período, as células foram analisadas quanto a sua proliferação por citometria de fluxo. (A) Histogramas representativos da proliferação de células T $CD4^+$ observada pela redução de intensidade de fluorescência de CFSE. (B) Gráfico de barras mostrando o número de células T $CD4^+$ que estão nos primeiros ciclos de divisão. (C-G) Populações de células T $CD4^+FoxP3^-$ do baço de camundongos não-infectados e infectados com 7 dias de infecção foram purificadas por Cell Sorting de acordo com a expressão de PD-1 e PD-L1. Então, as células foram marcadas com Cell Trace Violet e cultivadas por 72 h com anti-CD3 e APCs vindas de um camundongo Nude. (C) Gráficos mostrando as estratégias de Gates utilizadas para o Cell Sorting, juntamente com os respectivos histogramas de proliferação das populações purificadas. (D-G) Gráficos de barras representando: (D) o número de células T $CD4^+$ não-divididas (Geração 0); (E) que estão nos primeiros ciclos de divisão (Somatório das gerações 1, 2 e 3); (F) nos ciclos intermediários (somatório das gerações 4, 5 e 6) e (G) nos últimos ciclos de divisão (somatório das gerações 7, 8 e 9), de acordo com as populações de células T $CD4^+$ purificadas (Controle $PD\text{-}1^-PD\text{-}L1^{lo}$; Infectado $PD\text{-}1^-PD\text{-}L1^{hi}$ e $PD\text{-}1^+PD\text{-}L1^{lo}$). Os dados representam apenas um experimento realizado (n=4 nas Fig. A e B). Os asteriscos localizados acima das barras representam diferenças estatísticas em relação ao controle (não-infectado). Enquanto os asteriscos acima das linhas representam as diferenças entre as barras indicadas. *$p<0,05$, **$p<0,01$, ***$p<0,001$

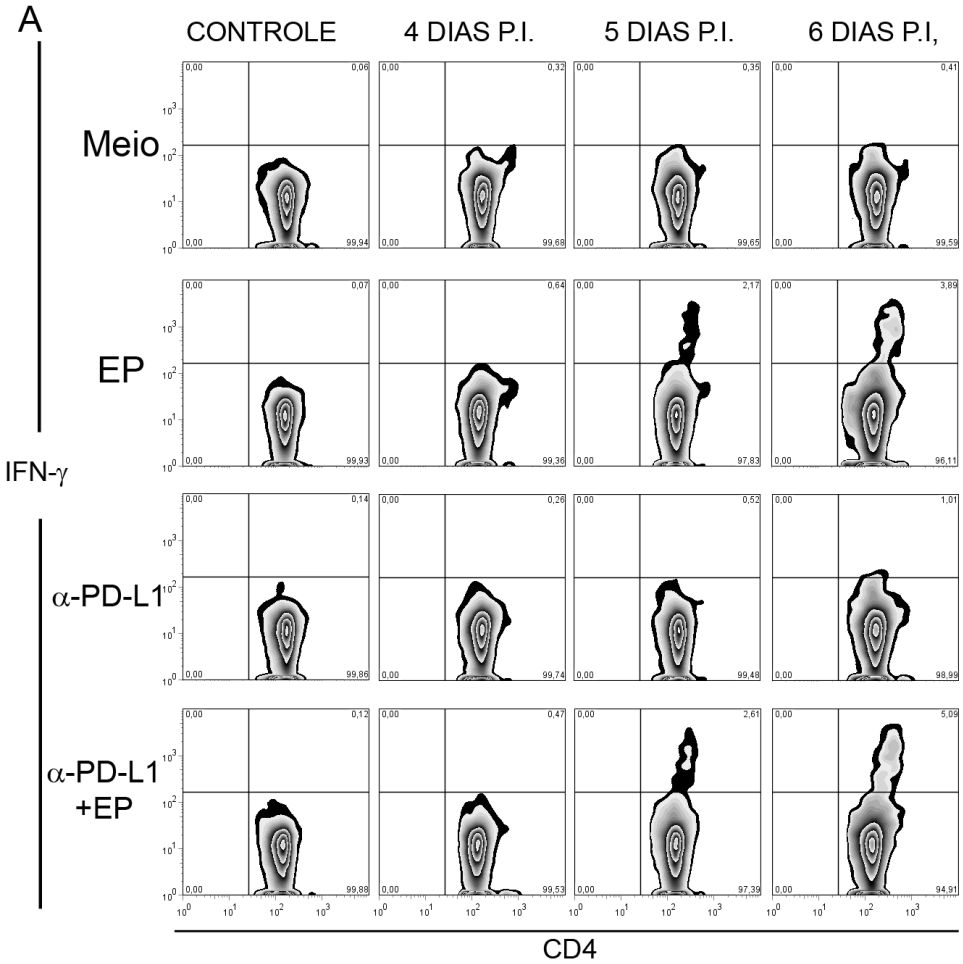
Figura 11 - Proliferação das células T CD4^{+} sob estímulo de anti-CD3.



Para analisar a influência da via PD-1-PD-L1 sob a função das células efetoras durante a malária, verificamos a produção de IFN-γ sob a inibição das interações com PD-L1. Para isso, analisamos em citometria de fluxo, a produção da citocina pela sua marcação intracelular. As células do baço de camundongos infectados nos dias 4, 5, 6 p.i., foram estimuladas ou não com EP, com ou sem inibição de mAb anti-PD-L1 por 20 horas. Na oitava hora de incubação, foi adicionado o GolgiStop (Monensina), sendo que as células estiveram na presença desta substância por 12 horas. Observamos que o tipo celular responsável pela produção de IFN-γ, durante este período da infecção, é a célula T $CD4^+$ (Fig. 12A). As células T $CD4^+$ do dia 4 p.i. quase não produzem IFN-γ (Fig. 12A). Já, nas células T $CD4^+$ dos dias 5 e 6 p.i. há uma maior porcentagem de células produtoras de IFN-γ (Fig. 12A). Observando os gráficos de citometria de fluxo (Fig. 12A e B), parece haver uma tendência a melhorar a produção de IFN-γ nas células dos dias 5 e 6 p.i. que foram tratadas com anticorpos anti-PD-L1, visto que a porcentagem de células produtoras da citocina tem um pequeno aumento. Porém, este aumento não foi significativo (Fig. 12B). Então, resolvemos analisar a produção desta citocina no sobrenadante do cultivo das células do baço nos dias 4, 5, 6 e 7 p.i.. Assim, verificamos, além dos outros dias, também o dia 7 p.i. Para isso, retiramos os sobrenadantes de cultura das células do baço nos dias 4, 5, 6 e 7 p.i., cultivadas por 72 h na presença ou não de EP (Fig. 13A). Os resultados observados confirmam que a inibição de PD-L1 não melhora a produção de IFN-γ nos dias 4, 5 e 6 p.i. (Fig. 13A). Já nos sobrenadantes do dia 7 p.i., apesar de haver menor concentração de IFN-γ, quando tratamos as células com anticorpos α-PD-L1, observamos uma melhora na produção da citocina (Fig. 13A). Esta melhora foi observada também em um período mais curto de cultivo dessas células (24 h) (Fig. 13B). A produção de IFN-γ nos sobrenadantes de cultivo de 24 h foi verificada pelo método ELISA, enquanto os sobrenadantes de 72 h foram dosados para IFN-γ e outras citocinas por Bioplex. Apesar da dosagem de outras citocinas nos sobrenadantes de 72 h, apenas IFN-γ obteve quantidades significativas quando os sobrenadantes foram dosados. Dessa forma, podemos concluir que há uma grande influência da via PD-1-PD-L1 regulação da produção de IFN-γ na malária aguda.

As células do baço de camundongos não-infectados (Controle) e infectados nos dias 4, 5 e 6 p.i. foram cultivadas *in vitro* com ou sem mAb anti-PD-L1 (α-PD-L1), estimuladas ou não com EP (iRBC), por 20 horas, sendo que nas últimas 12 horas estiveram na presença de Golgi Stop (Monensina). Após esse período, as células foram marcadas extracelularmente para CD4 e intracelularmente para IFN-γ. (A) Análises de citometria de fluxo (A) e gráficos de barras (B) sobre a porcentagem das células T $CD4^+$ que produzem IFN-γ, nos diferentes dias de infecção e cultivadas sob diferentes condições, conforme indicado. Os dados representam apenas um experimento realizado (n=3). Os asteriscos localizados acima das barras representam diferenças estatísticas em relação ao controle (não-infectado). Enquanto os asteriscos acima das linhas representam as diferenças entre as barras indicadas. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

Figura 12 - Produção de IFN-γ pelas células T CD4$^+$ sob inibição de PD-L1 *in vitro.*



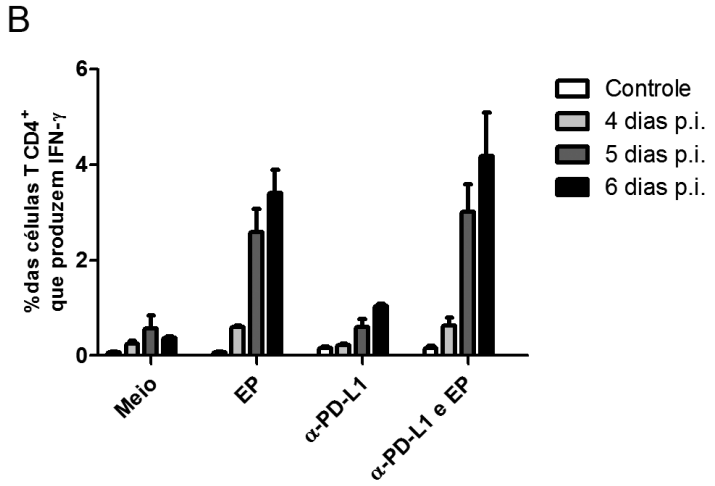
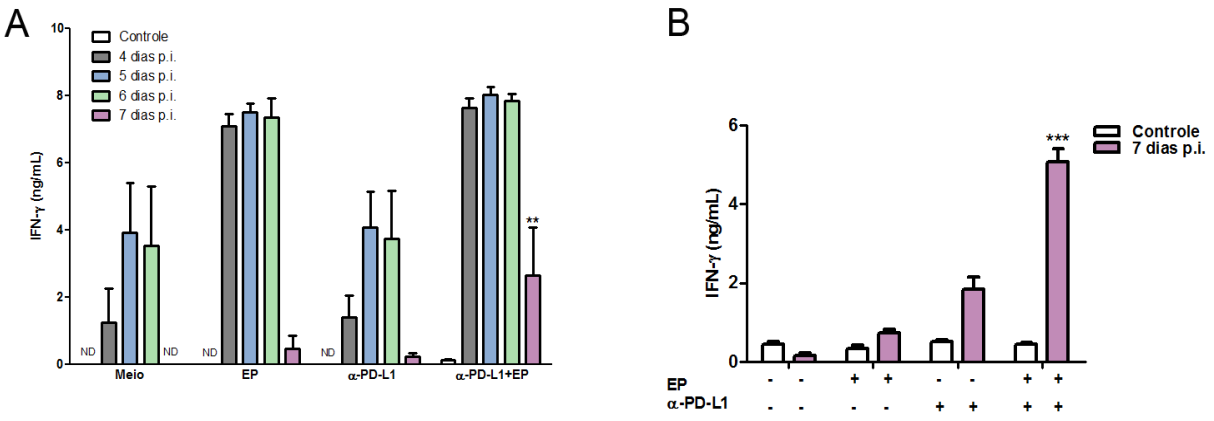


Figura 13 - Produção de IFN-γ sob inibição de PD-L1 *in vitro.*



As células do baço de camundongos não-infectados (Controle) e infectados nos dias 4, 5, 6 e 7 p.i. foram cultivadas *in vitro* com ou sem mAb anti-PD-L1 (α-PD-L1), estimuladas ou não com EP por 72 h (A). No entanto, somente as células do dia 7 p.i. foram cultivadas também, nessas mesmas condições, por 24 h (B). Após os períodos de cultivo, os sobrenadantes da cultura foram retirados e dosados para IFN-γ por ELISA (7 p.i., 24 h, B) e Bioplex (72 h, A). Concentração de IFN-γ em ng/mL na cultura de células do baço de camundongos controle (não-infectados) e infectados após 4, 5, 6 e 7 dias de infecção, cultivadas sob diferentes condições (indicadas abaixo dos gráficos) por 72 h (A). Concentração de IFN-γ em ng/mL na cultura de células do baço de camundongos controle (não-infectados) e infectados após 7 dias de infecção, cultivadas sob as condições indicadas, por 24 h (B). Os dados representam apenas um experimento realizado (A) ou 3 experimentos realizados (B) (n≥3). Os asteriscos localizados acima das barras representam diferenças estatísticas em relação às barras de mesma cor na condição EP. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

5 DISCUSSÃO

Durante a fase aguda da malária causada pelo *P. chabaudi*, a resposta imune é caracterizada pela ativação de células efetoras, dando-se posteriormente a morte das mesmas no baço, ou seja, os linfócitos T $CD4^+$ passam por uma expansão e, em seguida, uma redução no número de células (Elias et al., 2005; Helmby et al., 2000; Muxel et al., 2011). Além disso, observa-se uma intensa produção de IFN-γ e de anticorpos IgM e IgG policlonais que cessa abruptamente após o controle da fase aguda da infecção. A morte de células efetoras encerra essa fase inicial da resposta imune ao *P. chabaudi*, mas também dá oportunidade para a formação de uma imunidade mais específica, caracterizada pelo aumento da afinidade dos anticorpos para os antígenos relacionados ao parasita e pela geração de células de memória. Apesar da drástica redução no número de linfócitos T $CD4^+$, observamos um aumento no número de células totais do baço aos 10 dias de infecção. Isso pode ser justificado pela migração durante a infecção de outras células, como os monócitos (Sponaas et al., 2009), para o baço que é o principal órgão responsável pela destruição do parasita e pela retirada de EP da circulação (Alves et al., 1996; Grun et al., 1985). Alternativamente, esse aumento pode estar relacionado ao fato do baço assumir uma função hematopoiética durante a malária murina (Alves et al., 1996).

Para entender melhor quais os mecanismos envolvidos nessa redução do número de linfócitos T $CD4^+$ ao final da fase aguda, investigamos qual a contribuição de PD-1 e PD-L1 nesta fase. Primeiramente, verificamos a cinética da expressão de PD-1 e PD-L1 nas células do baço. Embora a expressão de PD-L1 seja constitutiva em células T $CD4^+$, $CD8^+$ e em células B (Yamazaki et al., 2002), a infecção aumenta a expressão de PD-L1 nessas células desde o início, no dia 4 p.i., e este aumento se estende até o dia 7 p.i., havendo uma redução na expressão a partir do dia 8 p.i. nas células T $CD4^+$ e $CD8^+$. Já, as células B seguem aumentando a expressão de PD-L1 até o dia 10 p.i. O aumento na expressão de PD-L1 ocorre inicialmente após a ativação das células B e T. Esse aumento é observado também em células T e B estimuladas *in vitro* com anticorpos anti-CD3 e anti-IgM+anti-CD40, respectivamente (Yamazaki et al., 2002). Então, a ativação das células durante a infecção poderia induzir o aumento na expressão de PD-L1 como um mecanismo para estabelecer um ambiente regulador no baço. Isto porque, PD-L1 é uma

molécula inibidora da resposta imune quando associada à molécula PD-1. O fato de tanto os linfócitos T $CD4^+$, $CD4^+FoxP3^+$ e $CD8^+$ quanto os linfócitos B aumentarem significativamente a expressão de PD-L1 ao longo da fase aguda da infecção, pode sugerir uma característica reguladora do baço após a ativação pelo parasita. Assim, controlar a resposta imune na fase aguda parece ser uma etapa importante no curso da malária. Essa regulação imune na malária pode ser essencial para evitar danos decorrentes da exacerbação da resposta imune ao hospedeiro, como foi observado em um estudo com *P. berghei* ANKA, em que o bloqueio de PD-L1 diminui a resistência dos camundongos à malária cerebral, causada pela maior resposta imune efetora (Hafalla et al., 2012). As células B aumentam a expressão de PD-L1 de forma diferente das células T $CD4^+$ e $CD8^+$, uma vez que o maior aumento ocorre ao final da fase aguda, no dia 10 p.i. Nessas células, observamos a formação de uma população com alta expressão de PD-L1 que é caracterizada pela baixa expressão de CD19. A baixa expressão de CD19 é característica de plasmablastos, que são células que sofrem hipermutação somática no centro germinativo (Butler et al., 2011). Os plasmablastos podem se diferenciar para plasmócitos, a fim de produzirem anticorpos de alta afinidade ao patógeno (Good-Jacobson et al., 2010). A diferenciação em plasmócitos e a geração de células B de memória são dependentes da interação com células T $CD4^+_{FH}$ localizadas no centro germinativo e proximidades que expressam altos níveis de PD-1, mostrando que a via PD-1-PD-L1 é importante nesse processo (Good-Jacobson et al., 2010; Kerfoot et al., 2011). Já, esta população com alta expressão de PD-L1 pode se referir aos plasmablastos que estão em diferenciação no centro germinativo, sendo regulados pelo mecanismo PD-1-PD-L1 (Good-Jacobson et al., 2010). Esses plasmablastos também foram observados na malária com *P. yoelli,* onde o bloqueio de PD-L1 e LAG-3 aumentou a frequência dessas células, sugerindo um consequente aumento na diferenciação para plasmócitos (Butler et al., 2011). Sabemos que esta subpopulação de células B apresenta uma expressão de marcadores de centro germinativo (CXCR-5 e GL-7) no dia 10 p.i., o que poderia confirmar que estas células estão no centro germinativo a fim de produzir anticorpos específicos. O fato de estes plasmablastos aumentarem seu número ao final da fase aguda, confirma o quanto estas células são importantes para a geração de anticorpos de afinidade para a fase crônica. É interessante ressaltar que a interação PD-1-PD-L1 pode ser essencial para a formação do centro

germinativo e, portanto para a produção dos anticorpos que controlam o parasita na fase crônica da infecção.

O aumento de expressão da molécula PD-1 em células T $CD4^+$ é significativo principalmente a partir do dia 7 p.i. Nas células T $CD8^+$, esse aumento de expressão não é tão significativo e se dá mais tardiamente no dia 10 de infecção. Talvez isso ocorra devido ao papel mais tardio das células T $CD8^+$ na resposta imune ao *P. chabaudi* (Podoba, Stevenson, 1991). Interessantemente, o aumento na expressão de PD-1 nos linfócitos T $CD4^+$ ocorre na fase em que eles estão reduzidos em número, o que pode indicar um possível papel regulador dessas moléculas nesta fase. Dentre as células avaliadas, as células T $CD4^+$ são as únicas que aumentam em grande significância a expressão de ambas PD-1 e PD-L1 na fase aguda, talvez devido à grande ativação dessas células nesta fase (Muxel et al., 2011). Apesar das células B também aumentarem a expressão das duas moléculas, o aumento na expressão de PD-1 nessas células não é tão expressivo quanto nas células T $CD4^+$. Mesmo assim, as células B também estão bem ativadas durante a infecção, o que justificaria a expressão de PD-1. Portanto, as células T $CD4^+$ podem estar interagindo com as outras células, para regularem o ambiente, ou serem reguladas. Além disso, ao verificarmos a coexpressão de PD-1 e PD-L1 nos linfócitos, vimos um aumento no número de células que coexpressam as duas moléculas do dia 7 até o dia 10 p.i., tanto nas células T $CD4^+$ quanto nas células B. Isto parece reforçar a hipótese de regulação do ambiente e da interação entre os dois tipos celulares a fim de aumentar a especificidade de anticorpos de fase crônica. Esses dados sugerem então, que durante a infecção aguda por *P. chabaudi* pode haver a indução de regulação da resposta imune pelas células do baço. Isto devido à ampla expressão de PD-L1 em diversos tipos celulares, que podem inibir as células T $CD4^+$ que expressam muito PD-1. Além disso, a interação entre células T $CD4^+PD\text{-}1^+$ e células $CD19^{lo}PD\text{-}L1^{hi}$ se ocorrer nesta fase, pode ser um fator importante para a geração de uma resposta imune mais específica para a fase crônica.

Embora haja um aumento da expressão de PD-1 e PD-L1 nas células T e B do baço durante a infecção com *P. chabaudi*, não se sabe qual a consequência deste aumento na resposta imune. A maioria dos estudos com PD-1 e PD-L1 mantém o foco na fase crônica de infecções parasitárias ou virais em que as células T perdem sua função e proliferação, permanecendo em um estado anérgico, que pode ser responsável pela manutenção da infecção (Barber et al., 2006; Bhadra et

al., 2011; Day et al., 2006; Jin et al., 2010). Durante a fase crônica de infecções virais, as células T passam por um estado de “exaustão” que está relacionado à expressão maior de PD-1 (Jin et al., 2010). Não observamos a exaustão das células T durante a fase aguda, porém sabemos que nessa fase, no dia 7 p.i., as células T $CD4^+$ mostram uma alta expressão de PD-1, e que nesse dia da infecção essas células possuem baixa proliferação (Muxel et al., 2010, 2011). Nossos resultados sugerem, que as células T $CD4^+$ do dia 7 de infecção proliferam menos devido a não conseguirem se manter em divisão e assim, não avançarem para as últimas gerações de células divididas. Isso parece ser devido a um mecanismo regulador durante este período. Quando purificamos as duas populações de células T $CD4^+$ ($PD\text{-}1^-PD\text{-}L1^{hi}$ e $PD\text{-}1^+PD\text{-}L1^{lo}$) que aparecem neste dia de infecção e as cultivamos sob estímulo de mAb anti-CD3, observamos que a presença de PD-1 inibe a proliferação das células T $CD4^+$. É interessante notar, que uma expressão constitutiva de PD-L1 nas APCs, que vieram de um baço Nude não-infectado, já foi suficiente para inibir as células T $CD4^+$ com alta expressão de PD-1. As células T $CD4^+$ do dia 7 p.i. que não expressam PD-1, foram pouco inibidas quanto a sua proliferação, visto que proliferaram de maneira semelhante às dos camundongos não-infectados. No entanto, nessa subpopulação foi observado menor número de células totais, o que poderia indicar um mecanismo regulador não associado à PD-1, que pode ter levado à morte dessas células. Ou seja, apesar dessas células não expressarem PD-1, o fato de elas serem provenientes de um camundongo infectado, fez com que um mecanismo regulador levasse essas células à morte. As células que expressam PD-1 parecem ser as que estão respondendo ao parasita, ou seja, as células T $CD4^+$ efetoras, visto que essas possuem um maior tamanho [maior FSC (do inglês *Foward Side Scatter*)] (dados não mostrados) e parte delas expressa muito mais OX-40 do que as células $PD\text{-}1^-PD\text{-}L1^{hi}$. Além disso, a expressão de PD-1 está associada à ativação, já que esta molécula passa a ser expressa após uma ativação celular (Chen, 2004; Freeman et al., 2000; Sharpe, Freeman, 2002). O fato de essas células expressarem PD-1 sugere ainda que estas talvez devam ser inibidas nesta fase da infecção, como uma forma de regular a resposta imune; afinal na interação entre PD-1 e PD-L1, a sinalização inibe a célula que expressa o PD-1 (Freeman et al., 2000).

Com a finalidade de verificar a função das moléculas PD-1 e PD-L1 durante a resposta imune à malária, foi inibida *in vitro* a interação com a molécula PD-L1 em

diferentes dias após a infecção. A inibição de PD-L1 na fase crônica da infecção com *Toxoplasma gondii* permite uma maior proliferação das células T, melhora a produção de IFN-γ e garante um maior controle sobre a reativação do parasita (Bhadra et al., 2011). Na infecção por *P. chabaudi,* quando inibimos PD-L1 nos dias 4, 5 e 6 da infecção, não houve melhora na produção de IFN-γ após 20 h (marcação intracelular da citocina) e 72 h (Bioplex do sobrenadante) de cultura, e também nenhum aumento na proliferação das células T e B do dia 4 e 6 p.i., após 72 h de cultivo. Isto pode indicar que o mecanismo PD-1-PD-L1 possa ser mais tardio e não atuar nessa fase. No dia 7 p.i., o aumento de PD-1 nas células T $CD4^+$ do baço também está relacionado a uma supressão na produção de IFN-γ, visto que a inibição de PD-L1 por 24 ou 72 h *in vitro* promove uma maior produção da citocina pelos esplenócitos. Em um estudo com *P. berghei* ANKA, também foi mostrado um aumento na produção de IFN-γ quando bloqueia-se PD-L1 (Hafalla et al., 2012). A expressão de PD-1 nas células T $CD4^+$ no dia 7 p.i. parece também inibir sua proliferação mediada por estímulo de mAb anti-CD3, já que observamos menor proliferação entre as células que expressam PD-1. Isto sugere que no dia 7 p.i. inicia-se a regulação da expansão e função das células efetoras no baço. Dessa forma, reforça-se a hipótese de que a via PD-1-PD-L1 atua na fase aguda da malária como mecanismo regulador. Tanto na malária humana quanto em camundongos, observa-se aumento na expressão de PD-1 por células T $CD4^+$ que está associado à disfunção dessas células T (Butler et al., 2011). Neste mesmo estudo, a administração de anticorpos bloqueadores para PD-L1 e LAG-3, durante a fase crônica em camundongos infectados com *P. yoelli,* melhora a função das células T efetoras e T $CD4^+_{FH}$, bem como a produção de anticorpos por plasmócitos, garantindo uma queda na parasitemia devido à maior eliminação de parasitas (Butler et al., 2011). Os nossos resultados podem sugerir que a via PD-1-PD-L1 inibe a função das células efetoras, mas inibe pouco a expansão dessas células. No entanto, a molécula PD-1 possui outro ligante, PD-L2 que não foi inibido e, portanto, não sabemos qual seria sua participação nesta fase.

Dessa forma, através de nossos resultados podemos inferir uma participação de PD-1 e PD-L1 na infecção pelo *P. chabaudi*. Talvez essas moléculas possam ter um papel regulador na malária murina, já que *in vitro* conseguimos observar uma supressão mediada por PD-1-PD-L1 da produção de IFN-γ por células do baço de

camundongos infectados com *P. chabaudi.* Apesar de não termos observado como seria a inibição da interação de PD-L1 com PD-1 *in vivo*, pelo efeito observado *in vitro*, podemos pensar em um possível papel regulador dessas moléculas na infecção. Além disso, o papel regulador dessas moléculas parece ser essencial para a formação do centro germinativo. Isto mostra que, além de regular a fase aguda, a interação entre PD-1 e PD-L1, regula a produção de anticorpos, garantindo a alta afinidade essencial para controlar o parasita na fase crônica. No entanto, estudos *in vivo* são necessários para comprovar essas hipóteses. Portanto, PD-1 e PD-L1 são moléculas importantes na regulação das respostas imunes e podem regular a função de células T e B na malária, podendo ter um papel essencial para o controle da resposta imune exacerbada na fase aguda da infecção, bem como um papel importante na geração de resposta específica para a fase crônica.

6 CONCLUSÕES

Com base em nossos resultados, podemos concluir que:

- as moléculas PD-1 e PD-L1 participam da resposta imune à malária murina, já que observamos aumento na expressão dessas moléculas em células do baço durante a fase aguda da infecção;
- o aumento na expressão de PD-L1 em células T e B pode estar relacionado à formação de um ambiente regulador no baço durante a infecção;
- a via PD-1-PD-L1 pode ser responsável pela redução da proliferação de células T $CD4^+$ que expressam PD-1 no dia 7 p.i.;
- o mecanismo PD-1-PD-L1 está envolvido na supressão da função das células T, visto que a inibição *in vitro* de PD-L1 aumenta a produção de IFN-γ por células do baço de camundongos infectados com *P. chabaudi.*

Portanto, podemos sugerir que haja uma participação de PD-1-PD-L1 na malária murina, sendo que este mecanismo pode ser parte de um controle da resposta imune observado na fase aguda da infecção com *P. chabaudi*.

REFERÊNCIAS*

Allie SR, Zhang W, Fuse S, Usherwood E J. Programmed Death 1 regulates development of central memory after acute viral infection. J Immunol. 2011;186: 6280-6.

Alves HJ, Weidanz W, Weiss L. The spleen in murine *Plasmodium chabaudi adami* malaria: stromal cells, T lymphocytes, and hematopoiesis. Am J Trop Med Hyg. 1996 55(4):370-8.

Amino R, Giovannini D, Thiberge S, Gueirard P, Boisson B, Dubremetz JF, et al. Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis to the liver. Cell Host Microbe. 2008;3:88–96.

Artavanis-Tsakonas K, Tongren JE, Riley EM. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. Clin Exp Immunol. 2003;133:145-52.

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

Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Baogong Z, Allison JP, Sharpe AH, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. Nature. 2006;439:682-7.

Barnwell JW, Asch AS, Nachman RL, Yamaya M, Aikawa M, Ingravallo 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;84:765-72.

Berendt AR, Simmons DL, Tansey J, Newbold CI, Marsh K. Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum.* Nature. 1989;341:57-9.

Berreta F, St-Pierre J, Piccirillo CA, Stevenson MM. IL-2 contributes to maintaining a balance between $CD4^{+}Foxp3^{+}$ regulatory T cells and effector $CD4^{+}$ T cells required for immune control of blood-stage malaria infection. J Immunol. 2011;186:4862-71.

Bhadra J, 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 USA. 2011;108(22):9196-201.

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;172:379-82.

*De acordo com:
International Commitee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: http://www.icmje.org.

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

Brown H, Turner G, Rogerson S, Tembo M, Mwenechanya J, Molyneux M, et al. Cytokine expression in the brain in human cerebral malaria. J Infect Dis. 1999;180:1742-6.

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

Butler NS, Moebius J, Pewe LL, Traore B, Doumbo OK, Tygrett LT, et al. Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage *Plasmodium* infection. Nat Immunol. 2011:13(2):188-95. doi:10.1038/ni.2180.

Cambos M, Belanger B, Jacques A, Roulet A, Scorza T. Natural regulatory ($CD4^{+}CD25^{+}FOXP3^{+}$) 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.

Castillo-Méndez SI, Zago CA, Sardinha LR, Freitas do Rosário AP, Álvarez JM, D'Império Lima MR. Characterization of the spleen B-cell compartment at the early and late blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria. Scand J Immunol. 2007;66:309-19.

Chandele A, Mukerjee P, Das G, Ahmed R, Chauhan VS. Phenotypic and functional profile of malaria-induced CD8 and CD4 T cells during blood-stage infection with *Plasmodium yoelii*. Immunology. 2010;132:273-86.

Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. Nat Rev Immunol. 2004;4:336-47.

Coban C, IshiiKJ, Kawai T, Hemmi H, Sato S, Uematsu S, et al. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. J Exp Med. 2005;201:19–25.

Couper KN, Blount DG, Wilson MS, Hafalla JC, Belkaid Y, Kamanaka M, et al. IL-10 from CD4CD25Foxp3CD127 adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. PLoS Pathog. 2008;4:e1000004. doi:10.1371/journal.ppat.1000004.

Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. Nature. 2006;443:350-4.

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

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

Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. Immunol Rev. 2010;236:219-42.

Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vaguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, et al. PD-L1 regulates the development maintenance, and function of induced regulatory T cells. J Exp Med. 2009;206:3015-29.

Franklin BS, Rodrigues SO, Antonelli LR, Oliveira RV, Gonçalves AM, Sales-Junior PA, et al. MyD88-dependent activation of dendritic cellsand 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.

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. J Exp Med. 2000;192(7):1027-34.

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

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

Good-Jacobson KL, Szumilas CG, Chen L, Sharpe AH, Tomayko MM, Schlomchik MJ. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. Nat Immunol. 2010;11(6):535-43.

Grun JL, Long CA, Weidanz WP. Effects of splenectomy on antibody-independent immunity to *Plasmodium chabaudi adami* malaria. Infect Immun. 1985;48(3):853-8.

Guilbride DL, Gawlinski P, Guilbride PDL. Why functional pre-erycthrocytic and bloodstage malaria vaccines fail: a meta-analysis of fully protective immunizations and novel immunological model. PLoS One. 2010;5(5):e10685. doi:10.1371/journal.pone.0010685.

Gutierrez FRS, Mariano FS, Oliveira CJF, Pavanelli WR, Guedes PMM, Silva GK, et al. Regulation of *Trypanosoma cruzi*-induced myocarditis by Programmed Death Cell Receptor 1. Infect Immun. 2011;79(5):1873-81.

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

Hafalla JCR, Claser C, Couper KN, Grau GE, Renia L, de Souza JB, et al. The CTLA-4 and PD-1/PD-L1 Inhibitory Pathways Independently Regulate Host Resistance to *Plasmodium*-induced Acute Immune Pathology. PLoS Pathogen. 2012;8(2):e1002504. doi:10.1371/journal.ppat.1002504.

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

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;178:2961-72.

Haribhai D, Williams JB, Jia S, Nickerson D, Schmitt EG, Edwards B, et al. A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. Immunity. 2011;35:109-22.

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.

Ho M, White NJ. Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria. Am J Physiol Cell Physiol. 1999;276:C1231-C1242.

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

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

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

Jin HT, Anderson AC, Tan WG, West EE, Ha SJ, Koichi A, et al. Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107(33):14733-8.

Karunaweera ND, Grau GE, Gamage P, Carter R, Mendis KM. Dynamics of fever and serum levels of tumor necrosis are closely associated during clinical paroxysms in *Plasmodium vivax* malaria. Proc Natl Acad Sci USA. 1992;89:3200-3.

Kerfoot SM, Yaari G, Patel JR, Johnson KL, Gonzalez DG, Kleinstein SH, et al. Germinal Center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone. Immunity. 2011;34:947-60.

Krishnegowda G, Hajjar AM, Zhu J, Douglass EJ, Uematsu S, Akira S, et al. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. J Biol Chem. 2005;280:8606–16.

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

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, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. Nat Immunol. 2001;2(3):261-8.

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

Li C, Corraliza I, Langhorne J. A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice. Infect Immun. 1999;67:4435-42.

Marsh K, Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. Parasite Immunol. 2006;28:51-60.

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

Meding SJ, Langhorne J. $CD4^+$ T cells and B cells are necessary for the transfer of protective immunity to *Plasmodium chabaudi chabaudi*. Eur J Immunol. 2005;21(6):1433-8.

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

Mohan K, Moulin P, Stevenson MM. Natural Killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. J Immunol. 1997;159(10):4990-8.

Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, et al. Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. Science. 2001;291:141–4.

Muxel SM, Freitas do Rosário AP, Zago CA, Castillo SI, Rizzo LV, Sardinha LR, et al. The spleen CD4+ T cell response to blood-stage Plasmodium chabaudi AS malaria develops in two phases characterized by different properties. Plos One. 2011;6(7):e22434. doi:10.1371/journal.pone.0022434.

Muxel SM, Freitas do Rosário AP, Sardinha LR, Castillo-Méndez SI, Zago CA, Rodriguez-Málaga SM, et al. Comparative analysis of activation phenotype, proliferation, and IFN-gamma production by spleen NK1.1(+) and NK1.1(-) T cells during Plasmodium chabaudi AS malaria. J Interferon Cytokine Res. 2010;30(6):417-26.

Ockenhouse CF, Tegoshi T, Maeno Y, Benjamin C, Ho M, Kan KE, et al. Human vascular endothelial cell adhesion receptors for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1. J Exp Med. 1992;176:1183-9.

Omer FM, Riley EM. Transforming Growth Factor β production is inversely correlated with severity of murine malaria infection. J Exp Med. 1998;188(1):39-48.

Pan American Health Organization. Malaria: progress report Washington. 2008. [cited from 2011 jun. 13] Available from: http://www.paho.org/English/GOV/CE/ce142-16-e.pdf

Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, Latz E, Monks BG, Visintin A, et al. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104: 1919–24.

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

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

Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. Nat Rev Immunol. 2005;5:722-35.

Scholzen A, Mittag D, Rogerson SJ, Cooke BM, Plebanski M. *Plasmodium falciparum*-mediated induction of human CD25hiFoxp3hi CD4 T cells is independent of direct TCR stimulation and requires IL-2, IL-10 and TGFβ. Plos Pathog. 2009;5(8):e1000543. doi:10.1371/journal.ppat.1000543

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.

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

Sidjanski S, Vanderberg JP. Delayed migration of Plasmodium sporozoites from the mosquito bite site to the blood. Am J Trop Med Hyg. 1997;57:426–9.

Silvie O, Mota MM, Matuschewski K, Prudêncio M. Interactions of the malaria parasite and its mammalian host. Curr Opin Microbiol. 2008;11:352-9.

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

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

Sponaas AM, Freitas do Rosário AP, Voisine C, Mastelic B, Thompson J, Koernig S, et al. Migrating monocytes recruited to the spleen play an importante role in control of blood stage malaria. Blood. 2009;114:5522-31.

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

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

Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. Science. 2006;313:1287–90.

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.

Su Z, Stevenson MM. IL-2 is required for antibody-mediated protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria infection in mice. J Immunol. 2002;168:1348-55.

Tarun AS, Baer K, Dumpit RF, Gray S, Lejarcegui N, Frevert U, et al. Quantitative isolation and in vivo imaging of malaria parasite liver stages. Int J Parasitol. 2006;36:1283–93.

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

Treutiger CJ, Heddini A, Fernandez V, Muller WA, Wahlgren M. PECAM-1/CD31, an endothelial receptor for binding *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. Nat Med. 1997;3(12):1405-8.

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

Vanderberg JP, Frevert U. Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immobilisation of Plasmodium berghei sporozoites injected into skin by mosquitoes. Int J Parasitol. 2004;34:991–6.

Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. Nat Rev Immunol. 2008;8:523-32.

World Health Organization. World Health Organization Malaria, other vectorborne and parasite diseases: Regional trend in cases and deaths. 2007. [cited from 2011 jun. 14] Available from: http://www.wpro.who.int/sites/mvp/data/

World Health Organization. International Travel and Health Interactive map. Brazil. 2010. [cited from 2011 nov. 20] Available from: http://apps.who.int/tools/geoserver/www/ith/index.html

Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, Matsuda H, Aoki M, Tanno Y, et al. Expression of Programmed Death 1 ligands by murine T cells and APC. J Immunol. 2002;169: 5538-45.