SHEYLA INÉS CASTILLO MÉNDEZ

**ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA ATIVAÇÃO
POLICLONAL DOS LINFÓCITOS B DURANTE A FASE AGUDA DA
INFECÇÃO PELO *Plasmodium chabaudi* AS**

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

São Paulo
2011

SHEYLA INÉS CASTILLO MÉNDEZ

**ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA ATIVAÇÃO
POLICLONAL DOS LINFÓCITOS B DURANTE A FASE AGUDA DA
INFECÇÃO PELO *Plasmodium chabaudi* AS**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Maria Regina D'Império Lima

São Paulo
2011

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

reprodução não autorizada pelo autor

Castillo Méndez, Sheyla Inés.

Estudo dos mecanismos envolvidos na ativação policlonal dos
linfócitos B durante a fase aguda da infecção pelo *Plasmodium*
chabaudi AS / Sheyla Inés Castillo Méndez. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Maria Regina D'Império Lima.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração:
Imunologia. Linha de pesquisa: Imunologia das parasitoses.

Versão do título para o inglês: Polyclonal antibody induction
mechanism in the early blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria.

Descritores: 1. *Plasmodium chabaudi* AS 2. Linfócito B 3. Ativação
policlonal 4. Malária I. D'Império Lima, Maria Regina II.
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0178/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Sheyla Inés Castillo Méndez.

Título da Dissertação: Estudo dos mecanismos envolvidos na ativação policlonal
dos linfócitos B durante a fase aguda da infecção pelo
Plasmodium chabaudi AS.

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

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

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Este trabalho foi realizado no laboratório de Imunologia das Parasitoses do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, com o auxílio financeiro da FAPESP (Fundação de amparo à Pesquisa do estado de São Paulo), projeto número – 05/51170-7, e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), projeto número – 143094/2006-8.

À
Luis Armando Méndez Haro
In memoriam

A minha família,

Mãe fica difícil escrever o que eu sinto por você, obrigada pelo amor e confiança que me ajudaram a superar a distância e a saudade de casa,

Pai, obrigada pelos conselhos e pelo apoio na minha decisão de morar longe de casa,

Lisette, você foi muito além de minha irmã caçula, a minha melhor amiga, conselheira, uma pessoa maravilhosa, muito obrigada pelo apoio na minha escolha e por suavizar os meus dias com palavras carinhosas,

Ofelitas, por ser, mas que minha vó, a mãe do meu coração, obrigada por aceitar a minha decisão de morar longe, por me apoiar e amar do jeito que eu sou.

Aos meus tios, **Judith, César, Diana, Jaime**, e aos meus primos Denisse e meu querido Rodrigo, por alegrar minha vida.

A minha querida amiga **Jessica**, por uma amizade maravilhosa que eu tive a felicidade de manter ao longo dos anos.

A minhas queridas amigas de infância, **Meylí e Miriam**, por me mostrar que a distância não seria um problema para nossa amizade.

Agradecimentos

A profa. Maria Regina D'Império Lima pela sua cuidadosa orientação na elaboração desta tese assim como pelas discussões e críticas que em muito colaboraram para meu desenvolvimento profissional.

Ao prof. José Maria Alvarez Mosig pelas discussões e sugestões nas análises de resultados.

A Dra Eliana Faquim de Lima Mauro, a Dra Carla Lima e ao Prof. Sandro Rogério de Alméida, muito obrigada pelas idéias sugeridas na banca de qualificação que ajudaram na confecção final da tese.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório,

Cláudia, obrigada não só pela colaboração nos experimentos, mas também pela preocupação e sugestões que me ajudaram em diversos momentos; **Luiz**, pela colaboração e ajuda na interpretação dos resultados. A **Érika** pelo apoio e colaboração na realização deste trabalho. Ao Eduardo, Sandra, Christian e Henrique que sempre se mostraram dispostos a ajudar e por possibilitarem um convívio diário agradável e divertido.

A **Rosa**, obrigada pela disposição e paciência que fizeram agradável a minha chegada no laboratório.

Ao **Rogério e Meire** por seu extremo cuidado no preparo dos materiais utilizados no desenvolvimento da tese.

A **Sílvia, Regina** e todo o pessoal do Biotério de camundongos isogênicos, pelo cuidado e zelo no fornecimento de camundongos.

A **Eni e Jotelma** pelo auxílio nos assuntos burocráticos.

Aos funcionários da biblioteca do ICB.

RESUMO

Castillo Méndez SI. Estudo dos mecanismos envolvidos na ativação policlonal dos linfócitos B durante a fase aguda da infecção pelo *Plasmodium chabaudi* AS. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

A resposta imune humoral ao *Plasmodium chabaudi* se caracteriza pela ativação policlonal de linfócitos B na fase aguda da doença, que resulta em uma intensa produção de anticorpos IgM e IgG de baixa afinidade pelo parasita e auto-anticorpos. Apesar de que estes anticorpos contribuam para o controle da infecção, eles podem retardar a geração de anticorpos de alta afinidade que garantem a eliminação dos parasitas e a proteção contra infecções subseqüentes. O objetivo central deste trabalho foi caracterizar os mecanismos envolvidos na ativação policlonal dos linfócitos B durante a infecção pelo *P. chabaudi* AS. Os nossos resultados mostraram que, na fase aguda da doença, a cooperação T-B mediada por moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) é essencial para a ativação e proliferação dos linfócitos B, assim como para a produção de anticorpos. No entanto, as moléculas MyD88 e CD1d não parecem ser necessárias para que os linfócitos B aumentem a expressão de CD69 e produzam IgM e IgG2a, embora na ausência do MyD88 se observe uma redução parcial da proliferação e um aumento na produção de IgG1. A população de linfócitos T CD4⁺ envolvidos na ativação policlonal dos linfócitos B apresenta níveis altos das moléculas ICOS e OX40 na superfície, assim como um pequeno aumento da expressão de CD28 e CD40L. Os linfócitos T CD4⁺ da fase aguda da infecção possuem também níveis aumentados de CXCR4, mas não de CXCR5, sugerindo que a interação T-B esteja ocorrendo na região extra-folicular do baço. Enquanto o aumento da expressão de CD40L não acontece em linfócitos T CD4⁺ de camundongos infectados deficientes em CD28, a expressão de ICOS e OX40 é apenas parcialmente reduzida e a de CXCR4 não se altera ou até sofre um acréscimo. Os ensaios *in vitro* mostraram ainda que os linfócitos T da fase aguda da infecção são capazes de estimular linfócitos B naives na presença de eritrócitos parasitados, induzindo o aumento da expressão de CD69, a proliferação e a produção de anticorpos IgM e IgG. Estes anticorpos parecem ser polirreativos, uma vez que reconhecem uma ampla variedade de antígenos, incluindo o extrato de patógenos (*P. chabaudi* e micobactéria) e moléculas próprias (proteína básica da mielina e histona). A presença da molécula de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) nos linfócitos B é importante para a sua ativação pelos linfócitos T da fase aguda da infecção, sendo necessária para o aumento da expressão de CD69, a proliferação e a produção de anticorpos. Mais ainda, a co-cultura de linfócitos B expressando ou não moléculas de classe II do MHC na superfície sugere que o

envolvimento destas moléculas está principalmente relacionado com a ativação dos linfócitos T. Além disso, experimentos com células de camundongos *knockouts* ou utilizando anticorpos neutralizantes mostraram que as moléculas CD28, CD40L e ICOS também são importantes para que esses linfócitos T induzam a ativação e a proliferação dos linfócitos B, assim como a produção de anticorpos IgM e IgG. Observamos ainda que a sinalização com anticorpos monoclonais anti-CD40 é capaz de resgatar a expressão de CD69, a proliferação e a produção de IgM em linfócitos B estimulados com linfócitos T CD28^{-/-} e eritrócitos parasitados, mas não é suficiente para induzir mudança isotópica para IgG. Por outro lado, a sinalização dos linfócitos B com anticorpos monoclonais anti-OX40L parece induzir o aumento da produção de IgG na ausência de CD28. Além disso, nós mostramos que a população de linfócitos T CD4⁺ICOS^{high} da fase aguda da infecção é a responsável pela ativação policlonal dos linfócitos B *in vitro* induzida na presença de eritrócitos parasitados. Foi interessante constatar ainda que os linfócitos B da zona marginal e foliculares são ativados de forma semelhante pelos linfócitos T da fase aguda da infecção, através de mecanismos dependentes da molécula ICOS. Além disso, os anticorpos IgM e IgG produzidos por ambas as populações parecem ter um padrão semelhante de reconhecimento de antígenos próprios e não próprios. Acreditamos que este estudo contribua para a compreensão dos mecanismos envolvidos na ativação policlonal dos linfócitos B. O esclarecimento destes mecanismos pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias com a finalidade de minimizar a ativação exacerbada do sistema imune na fase inicial da doença, melhorando assim a imunidade humoral contra a malária.

Palavras-chave: Malária. *Plasmodium chabaudi*. Linfócito B. Linfócito T. Ativação policlonal.

ABSTRACT

Castillo Méndez SI. Polyclonal antibody induction mechanisms during the acute phase of *Plasmodium chabaudi* AS malaria. [Ph. D. Thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Polyclonal B cell activation is a feature of the early spleen B cell response to *Plasmodium chabaudi* malaria, which results in intense production of parasite-specific low-affinity IgM and IgG and autoantibodies. Although this response may contribute to the initial control of the parasite, it may also hinder the generation of high-affinity antibodies that guarantees parasite elimination and protection against subsequent infections. In the present study we characterize the mechanism involved in the polyclonal B cell response to *P. chabaudi* AS. According to our results, in the acute phase of the disease, T-B cell cooperation through the major histocompatibility complex (MHC) class II molecules is essential for B cell activation and proliferation, and also for antibody production. However, MyD88 and CD1d molecules do not seem to be required for the increase of CD69 expression in B cells and for IgM and IgG2a production. Even though, in the absence of MyD88, there is a partial reduction in B cell proliferation and a huge IgG1 production. The CD4⁺ T cell population involved in the polyclonal B cell activation shows a huge increase of ICOS and OX40 molecules and a small increase of CD28 and CD40L molecules. CD4⁺ T cells from acute infection also express high levels of CXCR4 but low levels of CXCR5, suggesting that T-B cell interaction occurs in the extra-follicular areas of the spleen. Although, CD28 *knockout* mice show no increase of CD40L expression on CD4⁺ T cells, ICOS and OX40 levels are only partially reduced, whereas CXCR4 expression seems not to be modified or even increased. Furthermore, our *in vitro* assays show that T cells from the acute infection are potent helpers for naïve B cells in the presence of infected red blood cells. These interactions result in an increase of CD69 expression, proliferation, and IgM and IgG production. These antibodies seem to be polyreactive, once they were able to react with different antigens, including pathogen extracts (*P. chabaudi* and mycobacterium) and self-antigens (myelin basic protein and histone). The expression of class II molecules of the major histocompatibility complex (MHC) on B cells is crucial for their activation in terms of CD69 expression, proliferation and antibody production. Moreover, co-cultures of B cells with or without class II MHC molecules suggest that these molecules are mainly required for T cell activation. In addition, experiments using T cells from *knockout* mice or neutralizing antibodies show that CD28, CD40L and ICOS molecules are also important for B cell activation, proliferation and antibody production. Signaling by anti-CD40 monoclonal antibodies is able to rescue CD69 expression, proliferation and IgM production in B cells stimulated with T cells from CD28 deficient mice and infected red blood

cells. However, CD40 signaling in the absence of CD28 molecule fails to promote isotype switch to IgG. On the other hand, signaling of B cells with anti-OX40L monoclonal antibodies seems to promote the increase of IgG production in the absence of CD28 molecule. In addition, our results show that CD4⁺ICOS^{HIGH} T cells from the acute infection are responsible for polyclonal B cell activation *in vitro* in the presence of infected red blood cells. Marginal zone and follicular B cells are similarly activated by T cells from the acute infection in an ICOS-dependent manner. Moreover, the IgM and IgG produced by both populations seem to have a similar pattern of recognition of self- and non-self-antigens. We believe that this study will contribute to the understanding of the mechanisms involved in the polyclonal B cell activation. The clarification of these mechanisms can help to develop strategies aiming to minimize the exacerbated activation of the immune system in the early phase of the disease, thus improving the humoral immunity against malaria.

Keywords: Malaria. *Plasmodium chabaudi*. B cell. T cell. Polyclonal activation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ativação policlonal dos linfócitos B na ausência das moléculas MyD88, CD1d, I-A ^b , CD4 e CD28 durante a infecção pelo <i>P. chabaudi</i>	42
Figura 2. Caracterização dos linfócitos T CD4 ⁺ na fase aguda da infecção pelo <i>P. chabaudi</i> em camundongos C57BL/6 e CD28 ^{-/-}	45
Figura 3. Ativação policlonal dos linfócitos B naives induzida <i>in vitro</i> pelos linfócitos T provenientes da fase aguda da infecção pelo <i>P. chabaudi</i>	47
Figura 4. Produção de anticorpos pelos linfócitos B naives estimulada <i>in vitro</i> pelos linfócitos T provenientes da fase aguda da infecção pelo <i>P. chabaudi</i>	49
Figura 5. Ativação policlonal <i>in vitro</i> na ausência da molécula de classe II do MHC expressa nos linfócitos B.....	52
Figura 6. Ativação policlonal dos linfócitos B induzida <i>in vitro</i> na presença de anticorpos anti-CD40L, anti-CD40, anti-ICOS e anti-OX40L e na ausência da molécula CD28.....	54
Figura 7. Ativação policlonal dos linfócitos B induzida <i>in vitro</i> pelos linfócitos T CD4 ⁺ ICOS ^{HIGH} e T CD4 ⁺ ICOS ^{LOW} da fase aguda da infecção.....	57
Figura 8. Ativação policlonal dos linfócitos B MZ e FO induzida <i>in vitro</i> pelos linfócitos T da fase aguda da infecção e mediada pela molécula ICOS.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Afinidade das lectinas por monossacarídeos.....38

Tabela 2 - Títulos de anticorpos IgM e IgG frente a antígenos próprios e de patógenos produzidos por linfócitos B naives cultivados *in vitro* na presença de EP e linfócitos T.....50

Tabela 3 - Títulos de anticorpos IgM e IgG frente a antígenos próprios e de patógenos produzidos pelos linfócitos B MZ ou B FO na presença de EP e linfócitos T.....59

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – análise de variância (*analysis of variance*)
AMP – 2-amino 2 metil 1-propanol
APC – (*allophycocyanin*)
APCs – células apresentadoras de antígenos (*antigen presenting cells*)
BCIP – 5-bromo cloro 3-indolil fosfato
BCG – bacilo de calmette-guérin
Bcl6 (*B cell lymphoma 6*)
BCR – receptor de célula B (*B cell receptor*)
Blimp-1 – (*B lymphocyte-induced maturation protein-1*)
CD – cluster of differentiation
CFSE – (*carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*)
CpG – (*C-phosphate-G*)
CR – receptor de complemento (*complement receptor*)
CXCR – (*c-x-c chemokine receptor*)
DCs – células dendríticas (*dendritic cells*)
DNA – ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)
ELISA – (*enzyme-linked immunosorbent assay*)
ESA – (*ELISA spot assay*)
EP – eritrócito parasitado
FCS – soro fetal bovino
FcR – receptor do Fc
FDCs – células dendríticas foliculares (*follicular dendritic cells*)
FITC – (*fluorescein isothiocyanate*)
FO – folicular
GPI - glicosil-fosfatidil-inositol
ICOS – (*inducible costimulator*)
IFN- γ – interferon- γ
Ig – imunoglobulina
IL – interleucina
IL-7R α – cadeia α do receptor para IL-7
LPS – lipopolissacarídeos
MACS – coluna de separação magnética
MHC - complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex*)
MBP – proteína básica da mielina (*myelin basic protein*)

MyD88 – (*myeloid differentiation primary response gene 88*)
MZ – zona marginal (*marginal zone*)
NK – (*natural killer*)
NKT – (*natural killer T*)
PBS – tampão fosfato salina (*phosphate buffer saline*)
PE – (*phycoerythrin*)
PerCP – (*peridinin chlorophyll protein*)
PSGL-1 - ligante glicoprotéico 1 para P-selectina (*P-selectin glycoprotein ligand-1*)
SAP – (*SLAM-associated protein*)
SLAM – (*signaling lymphocytic activation molecule*)
SCID – (*severe combined immunodeficiency*)
TCR – receptor de célula T (*T cell receptor*)
T_{EFH} – T extra-foliculares
T_{FH} – T foliculares
Th – T auxiliar (*T helper*)
TLR – receptores do tipo Toll (*Toll-like receptors*)
TNF- α - fator de necrose tumoral- α (*tumor necrosis factor - α*)
TMB – tetra-metil-benzidina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Aspectos epidemiológicos da malária humana	18
1.2 A resposta imune contra a malária no homem	18
1.3 A resposta imune na infecção pelo <i>Plasmodium chabaudi</i>	19
1.4 As moléculas envolvidas na ativação dos linfócitos B	21
1.5 O papel dos linfócitos T extra-foliculares (T _{EXT}) e linfócitos T foliculares (T _{FH}) na ativação dos linfócitos B	23
1.6 As subpopulações de linfócitos B envolvidas na resposta imune esplênica	24
1.7 A ativação policlonal dos linfócitos B e a produção de anticorpos naturais	26
1.8 A glicosilação dos anticorpos	28
2 OBJETIVOS	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Animais, parasitemias e infecções	33
3.2 Obtenção de células esplênicas	33
3.3 Análise fenotípica das células por citometria de fluxo	33
3.4 Purificação dos linfócitos B e T	34
3.5 Proliferação celular através da marcação com CFSE	34
3.6 Ensaio de ELISAspot (ESA)	34
3.7 Ensaio de ELISA para detecção de anticorpos totais	35
3.8 Ensaio de ELISA para detecção de patógenos e anticorpos autorreativos	35
3.9 Separação dos anticorpos IgM e IgG em coluna de proteína G-Sepharose	36
3.10 Dosagem protéica das amostras	36
3.11 Ensaio <i>in vitro</i> de afinidade dos anticorpos IgM e IgG a diversas lectinas	37
3.12 Análise estatística	38
4 RESULTADOS	39
4.1 Ativação policlonal dos linfócitos B na ausência das moléculas MyD88, CD1d, I-A ^b , CD4 e CD28 durante a infecção pelo <i>P. chabaudi</i>	40
4.2 Caracterização dos linfócitos T CD4 ⁺ na fase aguda da infecção pelo <i>P. chabaudi</i> em camundongos C57BL/6 e CD28 ^{-/-}	43
4.3 Ativação policlonal dos linfócitos B naíves induzida <i>in vitro</i> pelos linfócitos T provenientes da fase aguda da infecção pelo <i>P. chabaudi</i>	45
4.4 Ativação policlonal <i>in vitro</i> na ausência da molécula de classe II do MHC expressa nos linfócitos B	50
4.5 Ativação dos linfócitos B <i>in vitro</i> na presença de anticorpos anti-CD40L, anti-CD40, anti-ICOS e anti-OX40L e na ausência da molécula CD28	52

4.6 Ativação policlonal dos linfócitos B induzida <i>in vitro</i> pelos linfócitos T CD4 ⁺ ICOS ^{HIGH} e T CD4 ⁺ ICOS ^{LOW} da fase aguda da infecção.....	56
4.7 Ativação policlonal dos linfócitos B MZ e FO induzida <i>in vitro</i> pelos linfócitos T da fase aguda da infecção e mediada pela molécula ICOS.....	57
5 DISCUSSÃO.....	60
6 CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos epidemiológicos da malária humana

A malária é uma das doenças parasitárias mais prevalentes nos países tropicais, especialmente na África Ocidental, Sudeste Asiático e América Latina, causando a morte de aproximadamente 1 milhão de indivíduos a cada ano, principalmente crianças menores de cinco anos na África sub-saariana (Roll Back Malaria, 2010). Estima-se que 243 milhões de casos de malária causaram a morte de cerca de 863 mil indivíduos em 2008 (World Health Organization, 2009). Das cinco espécies de *Plasmodium* que infectam o homem (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malarie* e *P. knowlesi*), o *P. vivax* é responsável por 73% dos casos de malária na América Latina entre 2000-2007, que ocorreram principalmente na região amazônica do Brasil (Pan American Health Organization, 2008).

1.2 A resposta imune contra a malária no homem

No início da infecção, observa-se uma intensa produção de citocinas pró-inflamatórias (Miller e Good, 1994; Clark e Schofield, 2000) relacionadas à liberação de toxinas durante a ruptura do eritrócito parasitado (EP). Assim, moléculas ancoradas por glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) (Schofield e Hackett, 1993; Naik et al., 2000) e hemozoína ligada ao ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*) do parasita têm sido postulados como responsáveis pela indução da produção de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral- α (TNF- α , do inglês *tumor necrosis factor - α*), interleucina-1 (IL-1) e IL-12, em consequência da interação com receptores do tipo Toll 2 (TLR2, do inglês *toll-like receptors*) e TLR9, respectivamente (Krishnegowda et al., 2005; Parroche et al., 2007). Além disso, estudos recentes mostraram que as células provenientes do sangue de indivíduos na fase inicial da infecção pelo *P. falciparum* são altamente respondedoras a agonistas de TLR, um processo que em camundongos infectados pelo *P. chabaudi* parece ser mediado pelo interferon- γ (IFN- γ) (Franklin et al., 2009).

Na infecção pelo *P. falciparum*, evidências experimentais sugerem que apesar dos esporozoítas e das formas hepáticas serem fugazes, o sistema imune apresenta um papel protetor contra estes estágios do parasita (Owusu-Agyei et al., 2001; Marsh et al., 2006). Os mecanismos envolvidos nessa fase da resposta envolvem principalmente os anticorpos e os linfócitos T CD8⁺ mediante o seu papel

citotóxico e a produção de IFN γ (Schofield et al., 1987). No entanto, uma vez que a fase hepática é de curta duração, é durante o ciclo eritrocítico que atuam os principais mecanismos imunológicos de controle da doença. Os eritrócitos, não apresentando antígenos através das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*), permitem a multiplicação do plasmódio em seu interior sem se tornarem alvos dos linfócitos T citotóxicos. Por outro lado, os anticorpos são um componente essencial na imunidade protetora contra o parasita (Langhorne et al., 2008; Weiss et al., 2010; Wipasa et al., 2010). Experimentos de transferência passiva de soro de adultos protegidos para indivíduos não imunes evidenciam claramente o papel protetor dos anticorpos (Sabchareon et al., 1991), em alguns casos associado aos isótipos de imunoglobulina G (IgG) opsonizantes (Bouharon-Tayoun et al., 1990; Ferreira et al., 1996). Na fase eritrocítica do ciclo, os anticorpos atuam inibindo a invasão dos eritrócitos pelos merozoítas, promovendo a atividade fagocítica dos macrófagos, assim como bloqueando a citoaderência dos eritrócitos infectados nas células endoteliais, permitindo nesse caso a sua destruição no baço (Blackman, 1990; Bull et al., 1998; Giha et al., 2000; Wipasa et al., 2002).

Postula-se que a ativação policlonal dos linfócitos B, associada à produção de anticorpos inespecíficos e auto-anticorpos (Adu et al., 1982; Boonpucknavig e Ekapanyakul, 1984) contribua para retardar o desenvolvimento de imunidade contra a malária (Daniel-Ribeiro et al., 1989). A imunidade protetora contra a malária é adquirida após infecções repetidas (Baird et al., 1991; Langhorne et al., 2008; Marsh et al., 2006). No entanto, a imunidade aos parasitas é muitas vezes transitória e desaparece após o tratamento prolongado com quimioterápicos ou mesmo após o afastamento durante alguns meses da zona endêmica (Dubois et al., 1995). Neste sentido, estudos realizados em populações expostas à malária no final da estação de transmissão, mostraram uma diminuição nos níveis séricos de anticorpos específicos (Früh et al., 1991).

1.3 A resposta imune na infecção pelo *Plasmodium chabaudi*

Devido à dificuldade de se estudar a doença humana, a infecção de camundongos por parasitas de roedores tem sido utilizada como modelo

experimental de malária, originando inúmeras contribuições para a compreensão da doença. Entre estes modelos, a infecção pelo *P. chabaudi* parece ser aquela que mais se aproxima da doença humana causada pelo *P. falciparum* (Cox et al., 1987). De maneira geral, os estudos evidenciam a complexidade da resposta imune contra a malária, que envolve a ativação de várias populações celulares do baço que se comportam de maneira distinta conforme a infecção progride.

Na fase inicial da doença, observa-se esplenomegalia associada à ativação policlonal dos linfócitos T e B, caracterizada pela grande produção de moléculas efectoras do tipo 1, tais como IFN- γ e IgG2a (Falanga et al., 1987; D'Imperio Lima et al., 1991, 1996; Sardinha et al., 2002). Os linfócitos T CD4⁺ $\alpha\beta$ (Podoba e Stevenson, 1991), $\gamma\delta$ (Van der Heyde et al., 1995) e NK (do inglês, *natural killer*) (Mohan et al., 1997) têm sido implicados no controle inicial da parasitemia, através de mecanismos efetores mediados pelo IFN- γ . Recentemente, foi observado que o reconhecimento do parasita via TLR9 mediado pela molécula MyD88 (do inglês, *myeloid differentiation primary response gene 88*) é essencial para produção de IL-12 e IFN- γ , favorecendo a resposta do hospedeiro a agonistas de TLR e exacerbando a produção de citocinas pró-inflamatórias (Franklin et al., 2009). Os anticorpos de fase aguda também contribuem para limitar a infecção (Mota et al., 1998), ainda que a maioria deles possua especificidade não relacionada ao parasita (D'Império et al., 1991). Apesar do envolvimento dos linfócitos T CD4⁺ não convencionais no início da infecção, os linfócitos T CD4⁺ convencionais são os principais protagonistas atuando como elo entre a resposta imune inata e adquirida (Muxel et al., 2010; 2011).

Conforme a doença progride, grande parte dos linfócitos T e B ativados policlonalmente é eliminada por apoptose (Helmby et al., 2000; Sanchez-Torres et al., 2001) e a resposta imune específica é gerada, garantindo a destruição dos parasitas e a proteção contra infecções subseqüentes. Paralelamente ao controle da infecção aguda, uma mudança de resposta do tipo 1 para o tipo 2 é observada, com produção predominante de IL-4 e IgG1 (Falanga et al., 1987; Langhorne et al., 1989), um padrão também característico da resposta de memória a uma segunda infecção com baixo inóculo de parasitas (Falanga et al., 1987; D'Império Lima et al., 1996). A resistência ao *P. chabaudi* é mediada por linfócitos B e T CD4⁺ e CD8⁺ (Podoba e Stevenson, 1991). A imunidade humoral é indispensável e a proteção pode ser

conferida pela transferência de anticorpos específicos (Falanga et al., 1984; Jarra et al., 1986; Cavinato et al., 2001). A colaboração T-B através da molécula CD28 é essencial para a produção de anticorpos IgG2a específicos, assim como para o desenvolvimento de imunidade protetora contra o *P. chabaudi* (Elias et al., 2005).

Recentemente, um estudo realizado em nosso laboratório, sugere que a ativação policlonal dos linfócitos B, como consequência dos altos níveis de parasitemia na fase aguda da doença, compromete a geração de anticorpos específicos ao parasita (Freitas do Rosário et al., 2008). Esse estudo mostra que os camundongos submetidos a uma infecção moderada pelo *P. chabaudi* apresentam uma melhora significativa na capacidade de produzir anticorpos específicos de longa duração do tipo IgG2a e IgG1. No entanto, apesar de que a ativação policlonal dos linfócitos B possa ser considerada uma reação comum do sistema imune às infecções agudas (Clagett e Engel, 1978; Zuñiga et al., 2000), os mecanismos envolvidos nesse tipo de resposta imune são até o momento pouco conhecidos. Assim, caracterizar os mecanismos envolvidos na ativação policlonal dos linfócitos B induzida durante a infecção pelo *P. chabaudi* pode ajudar no desenvolvimento de estratégias que objetivem reduzir sua intensidade e, portanto, minimizem os efeitos indesejados da ativação exacerbada do sistema imune e auxiliem a imunidade humoral contra a malária.

1.4 As moléculas envolvidas na ativação dos linfócitos B

A ligação do antígeno com o receptor de célula B (BCR do inglês, *B cell receptor*) origina uma cascata sinalizadora que leva ao aumento na expressão de moléculas co-estimuladoras, processamento e apresentação do antígeno para o reconhecimento dos linfócitos T (Parker, 1993; Mills e Cambier, 2003). A expressão de receptores de complemento na superfície dos linfócitos B, como a molécula CD21 ou CR2, que reconhece os fragmentos do complemento C3d e C3dg, aumenta o sinal intracelular levando à diferenciação e à produção de anticorpos, induzindo a expressão de moléculas costimuladoras, e aumentando a captação de antígenos pelo receptor. Estudos mostraram que a expressão do receptor de complemento nos linfócitos B é importante uma vez que garante a sobrevivência dessas células no centro germinativo (Carroll, 1998; Roozendaal e Carroll, 2007). Na sinapse imunológica gerada pela interação T-B, os linfócitos T ativados estimulam as células

B via CD40L-CD40 e citocinas (Banchereau et al., 1994). Por outro lado, estudos têm mostrado que as células B *naïves* de camundongos proliferam e se diferenciam em resposta a lipopolisacarídeos (LPS) e CpG (do inglês, *C-phosphate-G*) na ausência da sinalização via BCR ou contato com linfócitos T (Coutinho e Moller, 1974; Krieg et al., 1995). Neste sentido, foi observada a presença constitutiva de uma variedade de TLR, como TLR4 e TLR9, que reconhecem LPS e CpG, respectivamente (Iwasaki e Medzhitov, 2004; Takeda et al., 2003), concluindo-se que os TLR têm um papel importante na fisiologia dos linfócitos B.

Outro componente importante na interação T-B é a molécula CD28. Trabalhos mostraram que a ausência dessa molécula resulta na diminuição da produção de anticorpos, assim como na deficiência na formação de centros germinativos (Shahinian et al., 1993; Ferguson et al., 1996; Okkenhaug et al., 2001). Nesse sentido, a molécula ICOS (do inglês, *inducible costimulator*), relacionada funcional e estruturalmente com a família da molécula CD28 (Coyle et al., 2000), é induzida após 48 horas da ativação dos linfócitos T (Hutloff et al., 1999). Os linfócitos B *naïves* expressam constitutivamente o ligante da molécula ICOS (ICOSL ou B7RP-1) e alguns estudos mostraram que a interação ICOS-ICOSL poderia ser importante na colaboração T-B, uma vez que camundongos deficientes em ICOS que foram imunizados com antígeno solúvel não formaram centro germinativo ou produziram anticorpos (Dong et al., 2001; McAdam et al., 2001; Tafuri et al., 2001; Smith et al., 2003). Por outro lado, a ligação OX40-OX40L é importante para a ativação e sobrevivência dos linfócitos T (Gramaglia et al., 2000; Maxwell et al., 2000; Rogers et al., 2001), uma vez que a expressão da molécula OX40 é induzida após estimulação via receptor de célula T (TCR, do inglês *T cell receptor*) (Calderhead et al., 1993; Gramaglia et al., 1998). Nesse sentido, estudos *in vitro* mostraram que a expressão do ligante para OX40 (OX40L) pelas células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês *antigen-presenting cells*), como linfócitos B, é induzida após estimulação via CD40 ou LPS com um pico máximo entre as 48 e 72 horas (Ohshima et al., 1997; Brocker et al., 1999; Murata et al., 2000). Assim, em comparação com a produção reduzida de anticorpos T-dependentes em camundongos deficientes na molécula CD28 (Lenschow e Walunas, 1996; Coyle e Gutierrez-Ramos, 2001), camundongos deficientes nas moléculas de OX40 ou OX40L apresentam níveis normais de anticorpos em resposta a imunizações ou infecções virais (Pippig et al., 1999; Chen et al., 1999; Kopf et al., 1999). Porém, a

sinalização via OX40 é crucial para a migração dos linfócitos T CD4⁺ para os centros germinativos e a produção de um perfil de citocinas importantes na ativação e direcionamento dos linfócitos B (Brocker et al., 1999; Walker et al., 1999).

1.5 O papel dos linfócitos T_H extra-foliculares (T_{EFH}) e linfócitos T_H foliculares (T_{FH}) na ativação dos linfócitos B

Os mecanismos que envolvem a participação dos linfócitos T na diferenciação de células produtoras de anticorpos fora dos folículos linfóides ainda são pouco conhecidos. Recentemente, foi observado que a deficiência da molécula ICOS em camundongos auto-imunes resulta na ausência de uma população de linfócitos T efetores que expressam baixos níveis do ligante glicoprotéico 1 para P-selectina (PSGL-1, do inglês *P-selectin glycoprotein ligand-1*), levando a uma diminuição da produção de IgG extra-folicular. Assim, esta população PSGL-1^{lo} produz IL-21 e tem a capacidade de induzir a produção de IgG através de mecanismos mediados por IL-21 e CD40L (Odegard et al., 2008). Mais ainda, os linfócitos T PSGL-1^{lo} expressam o receptor para quimiocina CXCR4. De maneira geral, este estudo define uma nova população de linfócitos T responsáveis pela produção extra-folicular de anticorpos.

Por outro lado, a localização dos linfócitos T nos centros germinativos, assim como a importância do CD40L na maturação de afinidade levou a descrição dos linfócitos T_{FH}. A função principal dos linfócitos T_{FH} é regular os múltiplos estágios de diferenciação do linfócito B na resposta imune (Vinuesa et al., 2005; King et al., 2008; Fazilleau et al., 2009). Recentemente, foi mostrado que o primeiro contato das células dendríticas (DCs, do inglês *dendritic cells*) através de moléculas de classe II do MHC associadas ao antígeno induz vários subtipos de linfócitos T_{FH} CXCR5⁺ com atividade efetora, que são capazes de produzir uma variedade de citocinas envolvidas na modulação dos linfócitos B (Malherbe et al., 2008; Fazilleau et al., 2009; Reinhardt et al., 2009; McHeyzer-Williams et al., 2009). Por muito tempo, os marcadores que caracterizavam esta população eram CXCR5 e CD57 em humanos e CXCR5 em camundongos. No entanto, recentemente, foi evidenciado que os linfócitos T_{FH} do centro germinativo em humanos apresentam uma redução seletiva da cadeia α do receptor para IL-7 (IL-7R α) (Lim e Kim, 2007). O receptor para quimiocina CXCR5 não é detectável nos linfócitos T CD4⁺ *naïves* ou em populações

de linfócitos T CD4⁺ com o padrão Th1 e Th2. Porém, se encontra presente em uma pequena porção de células T CD4⁺ de memória das tonsilas e do sangue periférico, assim como em uma pequena porção dos linfócitos T CD8⁺ de memória (Quigley et al., 2007). Um estudo recente mostrou que a presença de CXCR5 nos linfócitos T não seria indispensável para a produção de anticorpos *in vivo*, mas tem um papel importante na formação do centro germinativo (Haynes et al., 2007). Outra característica dos linfócitos T_{FH} é o aumento da molécula coestimuladora OX40 (Walker et al., 1999). Neste sentido, um estudo mostrou que a estimulação via CD28 em conjunto com a molécula OX40 aumenta a expressão de mRNA que codifica a molécula CXCR5 (Flynn et al., 1998). A interação OX40/OX40L parece induzir uma migração dos linfócitos T para o folículo linfóide. Assim, em camundongos, a alta expressão de OX40L nas DCs favorece o acúmulo de linfócitos T nos folículos (Brockner et al., 1999). Portanto, a deficiência de OX40 reduz a formação de centros germinativos (Walker et al., 1999). Os linfócitos T_{FH} expressam altos níveis das moléculas ICOS e CD40L, assim como da molécula adaptadora SAP (do inglês, *SLAM-associated protein*), importantes na formação do centro germinativo (Crotty et al., 2003; Qi et al., 2008; Schwartzberg et al., 2009). Entre as citocinas produzidas se encontram principalmente a IL-21 (Nurieva et al., 2008; Vogelzang et al., 2008), com atividade autócrina pela expressão concomitante do receptor para IL-21 (IL-21R) nos linfócitos T (Chtanova et al., 2004; Rasheed et al., 2006). A IL-21 parece estar envolvida na expansão e diferenciação de linfócitos B em células produtoras de anticorpos, regulando parcialmente a expressão do fator de transcrição Blimp-1 (do inglês, *B lymphocyte-induced maturation protein*), e do fator de transcrição Bcl6 (do inglês, *B cell lymphoma 6*), relacionado à geração do centro germinativo (Ozaki et al., 2004; Bryant et al., 2007; Kuchen et al., 2007; Kitayama et al., 2008). Outros estudos mostraram que os linfócitos T_{FH} produzem IL-10 em humanos e IL-4 em camundongos (Fazilleau et al., 2009).

1.6 As subpopulações de linfócitos B envolvidas na resposta imune espênica

Em indivíduos adultos, os linfócitos B migram da medula óssea para os tecidos linfóides periféricos onde adquirem diferentes características fenotípicas e funcionais. Os linfócitos B periféricos incluem os linfócitos B1, que predominam no

peritônio e na cavidade pleural, e os linfócitos B2 convencionais. A população de linfócitos B2 é heterogênea, sendo formada majoritariamente pelos linfócitos B foliculares (FO), que encontram-se nos folículos linfóides dos órgãos linfóides secundários, e pelos linfócitos B da zona marginal (MZ) do baço. A zona marginal encontra-se entre a polpa branca e vermelha e é formada de sinus vasculares. Tem sido relatado que esta região está envolvida na resposta imune primária, especialmente frente a antígenos timo-independentes de tipo 2 presentes no sangue (Amlot et al., 1985; Timens et al., 1989; Spencer et al., 1998). Uma característica observada em humanos é a presença nesta região de linfócitos B *naïves* (IgD⁺) e de memória, com 40% deles expressando CD27 (Weller et al., 2004). Os linfócitos B CD27⁺IgD⁺ esplênicos possuem um fenótipo semelhante aos linfócitos B MZ (Fairhurst et al., 1998; Weller et al., 2004). Outro fato interessante em relação aos linfócitos B MZ é a alta expressão de CD21 (CR2), na ausência de IgD. O envolvimento das moléculas CD21 e IgM na ativação celular sugere que os linfócitos B MZ estariam particularmente preparados para responder rapidamente (Timens et al., 1989).

Em camundongos, várias populações celulares estão presentes na zona marginal do baço, incluindo macrófagos metalofílicos e da zona marginal, DCs, linfócitos T e linfócitos B MZ que estão particularmente envolvidos nas respostas T-independentes (Oliver et al., 1999; Martin et al., 2001; Martin e Kearney, 2002). Os linfócitos B MZ encontram-se ativados na fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi* (Achtman et al., 2003; Castillo-Méndez et al., 2007). Estas células representam apenas 5-10% dos linfócitos B esplênicos, sendo diferentes dos linfócitos B FO, não apenas pela sua topologia, mas também funcionalmente e fenotipicamente. Quando estimulados por uma variedade de estímulos, incluindo LPS e anticorpos anti-CD40, os linfócitos B MZ respondem e proliferam mais rapidamente que os linfócitos B FO (Oliver et al., 1999). Além disso, eles tornam-se blastos mais rapidamente (Won e Kearney, 2002). Os linfócitos B MZ secretam preferencialmente IgM e IgG3, uma característica das respostas primárias T-independentes, enquanto os linfócitos B FO secretam predominantemente IgG1 ou outros isótipos (Won e Kearney, 2002). Os linfócitos B MZ do baço de camundongos diferem dos linfócitos B FO pela expressão de marcadores de superfície celular. Assim, os linfócitos B MZ apresentam o fenótipo CD19⁺CD23^{LOW}CD21^{HIGH}CD1^{HIGH}IgM^{HIGH}IgD^{LOW}, enquanto os linfócitos B FO são CD19⁺CD23^{HIGH}CD21^{INT}CD1^{INT}IgM^{INT}IgD^{HIGH} (Waldschmidt, 1996; Oliver et

al., 1997; Amano et al., 1998). Os linfócitos B MZ também expressam níveis basais mais elevados de CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2), que podem ser ainda aumentados após a estimulação com CD40 ou LPS (Oliver et al., 1999). Além disso, estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que linfócitos B MZ podem estimular linfócitos T CD4⁺ *naïves* mais rapidamente que os linfócitos B FO (Attanavanich e Kearney, 2004). Por outro lado, experimentos em camundongos imunodeficientes SCID (do inglês, *severe combined immunodeficiency*) reconstituídos com linfócitos B MZ, na presença de linfócitos T primados, mostraram a capacidade desses linfócitos de gerar centros germinativos, apresentado hipermutação somática, assim como características de memória (Song Cerny, 2003). Existe ainda a possibilidade de que os linfócitos B MZ possam colaborar com linfócitos T não-clássicos. Esta idéia é corroborada pelo alto nível de expressão de CD1d nos linfócitos B MZ, o elemento de restrição dos linfócitos NKT (do inglês, *natural killer T*). A molécula CD1d apresenta lipídeos e glicolipídeos da parede celular de bactérias, o que seria compatível com o seu papel protetor nas doenças infecciosas. Essa cooperação poderia ser importante na resposta a patógenos do sangue, uma vez que linfócitos B CD1d^{HIGH} são encontrados no baço e não nos linfonodos, sangue, fígado, medula óssea e cavidade peritoneal.

1.7 A ativação policlonal dos linfócitos B e a produção de anticorpos naturais

A produção de anticorpos é essencial para o controle de patógenos, especialmente na resposta contra microorganismos extracelulares ou microorganismos que possuem uma fase extracelular durante o seu ciclo de vida. Os ativadores policlonais têm a capacidade de induzir a proliferação de múltiplos clones de linfócitos B, assim como aumentar a expressão de moléculas como classe II do MHC, CD69, CD25 e moléculas costimuladoras como CD80 e CD86 na superfície dos linfócitos B (Nashar et al., 1997; Montes et al., 2002). Os anticorpos produzidos durante a ativação policlonal reconhecem antígenos heterólogos e antígenos homólogos como actina, mioglobulina, miosina, tiroglobulina e DNA (Montes et al., 1996; 1999; Hunziker et al., 2003; Silva et al., 2003). A ativação policlonal dos linfócitos B tem sido observada em uma ampla variedade de modelos de infecção com vírus, protozoários e bactérias, resultando em hipergamaglobulinemia e produção de auto-anticorpos (Coutelier et al., 1994; Reina-San Martin et al., 2000;

Minoprio., 2001; Ramos et al., 2005). Neste sentido, alguns componentes da membrana celular ou do citosol dos microorganismos são capazes de ativar os linfócitos B policlonalmente, porém os mecanismos são pouco conhecidos (Montes et al., 1996; Reina-San Martin et al., 2000; Montes et al., 2006; Bermejo et al., 2010). Em sua maioria esses componentes ativam os linfócitos B independentes da presença dos linfócitos T. No entanto, estudos mostraram que a ativação policlonal dos linfócitos B pode ser dependente dos linfócitos T. Neste sentido, Minoprio et al. (1987) mostrou que, em camundongos infectados pelo *T. cruzi*, a eliminação dos linfócitos T CD4⁺ resulta na diminuição de linfócitos B que proliferam. Outros modelos experimentais com os vírus do herpes (Stevenson e Doherty, 1999) e da coriomeningite linfocítica (LCMV) (Hunziker et al., 2003) mostraram que a ativação policlonal dos linfócitos B é dependente da presença dos linfócitos T CD4⁺. É interessante mencionar que não apenas os linfócitos T CD4⁺ convencionais participam neste processo. Assim, estudos mostraram que a ativação dos linfócitos T $\gamma\delta$ nas infecções pelo *P. falciparum* e *Toxoplasma gondii* participa na linfoproliferação dos linfócitos B observada durante a fase aguda da infecção (De Paoli et al., 1992; Ho et al. 1994). Mais ainda, Munk et al. (1995) mostraram que após a estimulação *in vitro* com *Paracoccidioides brasiliensis*, os linfócitos T $\gamma\delta$ produzem citocinas que estimulam a produção de anticorpos específicos, assim como a ativação policlonal dos linfócitos B.

A ativação policlonal dos linfócitos B observada em infecções por patógenos como o *T. cruzi*, *T. gondii*, *Schistosoma mansoni*, *L. major*, HIV e o vírus da hepatite C (HCV), se caracteriza pela expansão dos linfócitos B2 convencionais e os linfócitos B1 CD5⁺ (Montes et al., 2007). Em camundongos, os linfócitos B1 CD5⁺ são uma fonte importante dos anticorpos naturais polirreativos. Assim a ativação policlonal dos linfócitos B pode ser essencial na resposta imune inicial frente a microorganismos que se dividem rapidamente estimulando o aumento da produção de anticorpos naturais. Os anticorpos naturais reconhecem uma variedade de toxinas e antígenos virais (Gobet et al., 1988; Ochsenbein et al., 1999) e, no caso da IgM, participam da resposta imune inata ativando a via clássica do complemento.

Estudos recentes mostraram que aproximadamente 50% da IgM natural é produzida pelos linfócitos B1, e o remanescente pelos linfócitos B2 (Thurnheer et al.,

2003; Baumgarth et al., 2005), em contrapartida a IgM secretada após contato com antígenos não próprios é principalmente produzida pelos linfócitos B2. Mais ainda, em alguns casos como a infecção pelo vírus influenza, a proteção é conferida pela produção de IgM natural e imune (Baumgarth et al., 2000). Assim, a produção de IgM é essencial para uma resposta imune eficiente (Ehrenstein et al., 1998; Ehrenstein e Notley, 2010), não apenas por sua capacidade polirreativa, sendo capaz de reconhecer estruturas conservadas como ácidos nucleicos, fosfolipídios e carboidratos (Briles et al., 1981), mas também por promover a remoção de células apoptóticas (Quartier et al., 2005; Ogden et al., 2005; Chen et al., 2009). Sabendo que a IgM natural facilita a formação de imunocomplexos e que sua concentração nas células dendríticas foliculares (FDCs) é importante para a formação do centro germinativo (Pozdnyakova et al., 2003), estudos mostraram que as principais células responsáveis pelo transporte dos imunocomplexos no baço são os linfócitos B MZ. Mais ainda, os linfócitos B MZ transportam antígenos T-independentes e T-dependentes ligados a imunocomplexos na presença do IgM natural (Pozdnyakova et al., 2003; Whipple et al., 2004; Ferguson et al., 2004), fenômeno que não acontece na ausência dos linfócitos B MZ e que é mediado pela expressão do CR2 ou CD21.

1.8 A glicosilação dos anticorpos

O reconhecimento de antígenos origina a produção de anticorpos capazes de interagir com diferentes mecanismos efetores da resposta imune (Fridman et al., 1993; Clynes e Ravetch, 1995; Nimmerjahn e Ravetch, 2005). Assim, através dos receptores Fc (FcR), os anticorpos ativam os macrófagos, promovem a fagocitose e a apresentação de antígenos e medeiam a citotoxicidade. Os anticorpos também ativam a via clássica do complemento. A capacidade dos anticorpos de se ligar e ativar as células via FcR e a molécula C1q do sistema complemento está relacionada aos domínios C_H2 e C_H3 da porção Fc das moléculas de IgG e IgE respectivamente. Todos os anticorpos são glicoproteínas, seu oligossacarídeo possui um core heptassacarídeo que varia na sua composição de açúcares entre fucosa, galactosa, ácido siálico e N-acetilglucosamina (Arnold et al., 2007; Jefferis e Lund, 2002; Jefferis, 2005). A IgG é a classe de anticorpos com maior prevalência no soro, que na sua composição possui uma glicana ligada no Asn297 da porção Fc. A glicosilação da IgG é essencial para manter a estrutura funcional da porção Fc,

assim como para se ligar aos receptores Fc do tipo γ (Fc γ Rs) (Jefferis e Lund, 2002). Neste sentido, tem sido observado que a capacidade da IgG de mediar uma resposta inflamatória se encontra comprometida quando a IgG é aglicosilada ou deglicosilada (Jefferis, 2005; Nimmerjahn e Ravetch, 2006). Mais ainda, Kaneko et al. (2006) mostrou que a adição de ácido siálico na IgG humana aumentava a sua capacidade antiinflamatória. Este grupo também observou que após imunização a sialilação da IgG diminuía, sugerindo neste caso que a IgG do soro contém ácido siálico, portanto, tem uma ação anti-inflamatória e que após o contato com o patógeno um tipo de IgG não sialilada e específica para o controle da resposta é gerada. Por outro lado, no modelo murino foi observado que a capacidade da IgG1 de mediar a anafilaxia estava diretamente relacionada à presença do ácido siálico ligado na porção Fc (Silva et al., 2008). Mais ainda, a remoção enzimática do ácido siálico da IgG1 anafilática resulta na redução da sua capacidade de induzir a degranulação de mastócitos.

2 OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo central caracterizar os mecanismos envolvidos na ativação policlonal dos linfócitos B do baço durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*, e avaliar a influência das moléculas envolvidas na interação T-B, enfocando os seguintes aspectos:

1. A ativação policlonal dos linfócitos B esplênicos na ausência das moléculas MyD88, CD1d, classe II do MHC (I-A^b), CD4 e CD28, durante a infecção pelo *P. chabaudi*.
2. A participação *in vitro* dos linfócitos T da fase aguda da infecção na ativação policlonal dos linfócitos B *naïves* na ausência de moléculas importantes para a cooperação T-B, tais como as moléculas de classe II do MHC (I-A^b), CD28, CD40L, ICOS e OX40.
3. A ativação policlonal dos linfócitos B FO e MZ induzida *in vitro* por linfócitos T da fase aguda da infecção, assim como o envolvimento da molécula ICOS.
4. A produção de anticorpos IgM e IgG produzidos *in vitro* pelos linfócitos B totais e sub-populações de linfócitos B FO e MZ, caracterizando a sua capacidade de ligação com antígenos próprios e de patógenos e o seu padrão de glicosilação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais, parasitemias e infecções

Utilizamos camundongos CD4^{-/-}, I-A^{b/-}, CD28^{-/-}, MyD88^{-/-}, CD1d^{-/-}, NUDE e o parental correspondente, linhagem C57BL/6, fêmeas, de 6 a 8 semanas, fornecidos pelo biotério de animais isogênicos do Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo. Os camundongos foram inoculados com 10⁶ EP por *P. chabaudi* (cepa AS), mantidos através de passagens semanais. As parasitemias foram monitoradas através de esfregaços sanguíneos corados pelo método de Giemsa.

3.2 Obtenção de células esplênicas

Os esplenócitos foram obtidos a partir da ruptura mecânica do baço de camundongos. As células foram lavadas com meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (FCS), 50 µM de 2-mercapto-etanol, 2 mM de piruvato, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina-G potássica, 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina (Gibco BRL). Todos os reagentes foram adquiridos da Life Technologies. Posteriormente, as células foram submetidas ao tampão de lise contendo TRIS e NH₄CL (0,16 M), durante 4 minutos, para a eliminação de eritrócitos. Por fim, estas células foram novamente lavadas e ressuspensas em RPMI 3% FCS.

3.3 Análise fenotípica das células por citometria de fluxo

Os esplenócitos (10⁶) foram incubados com 0,25 µg de cada anticorpo monoclonal diluído em tampão fosfato salina (PBS) suplementado com 3% FCS (Life Technologies) e 0,01% azida sódica (PBS soro azida, Sigma-Aldrich). Foram utilizados anticorpos monoclonais para: CD19 (1D3), CD21/CD35 (CR2/CR1) (7G6), CD23 (FcεRII) (B3B4), CD28 (37.51), CD4 (H129.19), CD40L (MR1), CD45R-B220 (RA3-6B2), CD69 (H1.2F3), CD137 (OX40) (OX86), CD138 (281-2), CD178 (ICOS) (7E.17G9), CD184 (CXCR4) (2B11), CD185 (CXCR5) (2G8) e I-A^b (AF6-120.1) conjugados à FITC (do inglês, *fluorescein isothiocyanate*), PE (do inglês, *phycoerythrin*), APC (do inglês, *allophycocyanin*) ou PerCP (do inglês, *peridinin chlorophyll protein*), por 30 minutos a 4 °C (PharMingen). Após este período, as células foram lavadas com o mesmo tampão e analisadas em citômetro de fluxo FACScalibur ou FACSCanto (Becton Dickinson) de acordo com a intensidade de

fluorescência dos anticorpos monoclonais, utilizando o programa FlowJo. Os dados mostrados representam a média de fluorescência ou a frequência das populações.

3.4 Purificação dos linfócitos B e T

As preparações enriquecidas em linfócitos B foram obtidas por seleção positiva utilizando colunas de separação magnética (MACS) (Miltenyi Biotec) e adicionando o anticorpo monoclonal anti-CD19 (PharMingen). Os linfócitos T foram obtidos por seleção negativa utilizando anticorpos monoclonais anti-CD19, anti-MHC classe II (I-A^b), anti-CD11c e anti-CD11b. As purificações das populações de linfócitos B FO e MZ, assim como das populações de linfócitos T CD4⁺ICOS^{HIGH} e linfócitos T CD4⁺ICOS^{LOW} foram realizadas utilizando-se o citômetro de fluxo FACSaria (Becton Dickinson). A pureza das preparações foi determinada por citometria de fluxo.

3.5 Proliferação celular através da marcação com CFSE

Os linfócitos B purificados do baço foram ressuspensos em PBS suplementado com BSA 0,1% em concentração de 10⁷ células/ml, contendo 5 µM do CFSE (do inglês, *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*) (Molecular Probes). A suspensão foi incubada a 37 °C, durante 20 minutos, ao abrigo da luz. Após este período, os linfócitos B foram lavados com meio e colocados em cultura na presença de linfócitos T. Em alguns experimentos, os linfócitos B foram incubados na presença de EP. A proliferação foi avaliada após o período de 72 horas a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, considerando-se a intensidade de fluorescência do CFSE por análise em citômetro de fluxo.

3.6 Ensaio de ELISAspot (ESA)

O ensaio de ELISAspot (ESA, do inglês *ELISA spot assay*) foi realizado segundo o método descrito por Czerkinsky et al (1983) e Sedgwick e Holt (1983), com algumas modificações. Placas de ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*) foram incubadas durante a noite, a 4 °C, com anticorpo de cabra anti-Ig total de camundongo (10 µg/ml). As placas foram saturadas, por 2 horas, com PBS contendo 1% de gelatina (Merck). Após lavagens sucessivas com PBS, 100 µl de meio completo contendo diluições decrescentes de células

esplênicas (10^6 a 5×10^2 células) foram distribuídos nas placas de ELISA. A seguir, as células foram incubadas, durante 6 horas, a 37°C , em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . Após este período, as células foram lisadas com um pulso de água destilada, e as placas foram lavadas 3 vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (Sigma-Aldrich). A seguir, foi adicionado anticorpo anti-IgM, anti-IgG1 e anti-IgG2a (Southern Biotechnologies Associates), conjugado à biotina (diluídos 1/1500 em PBS – Tween com 0,5% de gelatina), seguido por avidina conjugada à fosfatase alcalina (diluída 1/2500 em PBS – Tween com 0,5% de gelatina), para revelar as células secretoras de anticorpos. Como substrato foi utilizado BCIP (5-bromo cloro 3-indolil fosfato) (Sigma-Aldrich) diluído na concentração de 1 mg/ml em tampão AMP (2-amino 2 metil 1-propanol) da Merck. Após 2 horas de incubação a 37°C , em atmosfera úmida, o número de células produtoras de anticorpo foi quantificado para cada isótipo de anticorpo, levando em consideração os números totais de células esplênicas determinado por contagem na câmara de Neubauer.

3.7 Ensaio de ELISA para detecção de anticorpos totais

Placas de ELISA foram sensibilizadas durante a noite, a 4°C , com 50 μl de anticorpo de cabra anti-Ig total de camundongo (10 $\mu\text{g/ml}$). As placas foram saturadas, por 2 horas, com PBS 1% BSA. Após lavagens sucessivas de PBS contendo 0,05% de Tween 20 (Sigma-Aldrich), volumes decrescentes de 100 μl dos sobrenadantes das culturas foram incubadas por 90 minutos. A presença de anticorpos foi revelada adicionando anticorpos anti-IgM ou anti-IgG (Southern Biotechnologies Associates), conjugado a peroxidase (diluída 1/2000 em PBS – Tween com 1% de BSA), seguido por 100 μl de TMB (tetra-metil-benzidina). A densidade ótica foi quantificada no aparelho Spectra Max 190 (Molecular Devices).

3.8 Ensaio de ELISA para detecção de anticorpos que reconhecem patógenos e anticorpos autorreativos.

Placas de ELISA foram sensibilizadas durante a noite, a 4°C , com 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPS e extrato total de *P. chabaudi* e *Mycobacterium bovis* BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) como antígenos de patógenos e tiroglobulina, MBP (proteína básica da mielina), histonas e DNA como antígenos próprios. As placas foram saturadas, por 2 horas, com PBS 1% BSA. Após lavagens sucessivas com PBS

contendo 0,05% de Tween 20 (Sigma-Aldrich), volumes decrescentes de 100 µl dos sobrenadantes das culturas de linfócitos B foram incubados durante a noite a 4 °C. A presença de anticorpos foi revelada adicionando anticorpos anti-IgM ou anti-IgG (Southern Biotechnologies Associates), conjugados à biotina (diluídos 1/1500 em PBS – 0,3% BSA), seguido por avidina conjugada à peroxidase (diluída 1/1000 em PBS – 0,3% BSA), e 100 µl de TMB. A densidade ótica foi quantificada no aparelho Spectra Max 190 (Molecular Devices).

3.9 Separação dos anticorpos IgM e IgG em coluna de proteína G-Sepharose

Os anticorpos IgM e IgG presentes no sobrenadante da cultura celular foram separados por cromatografia de afinidade em coluna de proteína G-Sepharose (Amersham). Para tanto, a coluna foi lavada e equilibrada com 30,0 ml de tampão fosfato de sódio 0,01M pH 7,0 (tampão de ligação) e o sobrenadante da cultura foi aplicado na coluna. Posteriormente, a lavagem da coluna foi realizada com o tampão de ligação para a obtenção dos anticorpos IgM não-ligados à resina. Os anticorpos IgG foram eluídos da coluna com a aplicação de 20,0 ml de solução glicina 0,1M pH 2,7. As frações foram coletadas em volume de 1,0 ml/tubo e o pH neutralizado com solução Tris 2,0 M pH 9,0. O conteúdo protéico das frações foi monitorado pela leitura da absorbância a 280 nm em espectrofotômetro. As amostras contendo os anticorpos foram dialisadas em salina tamponada com fosfato (PBS), concentradas e armazenadas a -20° C para posterior utilização.

3.10 Dosagem protéica das amostras

O método de Bradford (1976) foi utilizado para a determinação da concentração protéica das amostras. Para isto, as amostras foram diluídas em PBS e distribuídas em placas de 96 poços em volume de 50 µl. Como curva padrão foi utilizada solução de soro albumina bovina (BSA, Sigma) na concentração de 500 µg/ml diluída na razão 1:2 (50 µl/poço). Após a distribuição das amostras e da curva padrão foi acrescentado 150 µl/poço do reagente de Bradford (Bio-Rad Laboratories) previamente diluído em água destilada (1:5). A placa foi lida em espectrofotômetro em filtro de 595 nm. O cálculo da concentração protéica foi feito utilizando o programa estatístico *Graphpad Instat* tendo como referência as densidades ópticas obtidas das amostras em relação à curva-padrão de BSA.

3.11 Ensaio *in vitro* de afinidade dos anticorpos IgM e IgG a diversas lectinas

A afinidade de ligação dos anticorpos IgM, IgG1 e IgG2a às diferentes lectinas foi avaliada por ensaio imunoenzimático (ELISA), usando placas de 96 poços (Costar) sensibilizadas com 1 µg/ml das seguintes lectinas: *Canavalia ensiformis*, *Limulus polyphemus*, *Sambucus nigra*, *Datura stramonium*, *Ulex europaeus* I, *Bauhinia purpúrea* ou *Erythrina cristagali* (Sigma) (Tabela 1) previamente diluídas em PBS pH 7,2 e incubadas por 18 horas a 4 °C. As placas foram lavadas com PBS Tween e bloqueadas com 200 µl/poço de PBS Tween acrescido de 3% de gelatina, por 3 horas a 37 °C.

As placas foram lavadas com solução PBS Tween por 3 vezes e os anticorpos purificados do sobrenadante foram adicionados na concentração de 5 µg/ml (100 µl/poço). Uma nova incubação foi feita por 1 hora a 37 °C, seguida de 3 lavagens com PBS Tween. Posteriormente foram adicionado 100 µl/poço dos anticorpos anti-IgM, anti-IgG1 ou anti-IgG2a de camundongo biotinilados (1 µg/ml). As placas foram novamente incubadas por mais 1 hora a 37 °C e lavadas 3 vezes com PBS Tween. O conjugado de estreptoavidina-peroxidase (diluído 1/6000) foi distribuído nas placas e outra incubação de 1 hora a 37 °C foi realizada. A reação foi revelada adicionando-se 100 µl/poço do substrato enzimático contendo 10 mg do cromógeno OPD e 10 µl de peróxido de hidrogênio 30% diluídos em 10 ml de tampão citrato de sódio 0,1 M. A reação foi parada após 15 minutos com solução de ácido sulfúrico (2 %) e a leitura das placas feita em leitor de ELISA (Electron Corporation).

Tabela 1 – Afinidade das lectinas por monossacarídeos

LECTINA	α man	α Glc	α Fuc	β Gal	α Gal	α GlcNac	β GlcNac	Neuac
<i>Canavalia ensiformis</i>	+	+				+		
<i>Limulus polyphemus</i>								+
<i>Sambucus nigra</i>				+				+
<i>Datura stramonium</i>							+	
<i>Ulex europeaus I</i>			+					
<i>Bauhina purpurea</i>						+	+	
<i>Erythrina cristagalli</i>				+	+	+	+	

Fonte: Ey Laboratories, Inc.

Man=manose; Glc=glucose; Fuc=fucose; Gal=galactose; GlcNac= acetilglucosamina; Neuac= ácido siálico

3.12 Análise estatística

A comparação entre os grupos experimentais foi feita utilizando-se o teste ANOVA (do inglês, *analysis of variance*), seguida por análise de comparações múltiplas, segundo o método de Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Prisma 4 (Graph Pad Software).

4 RESULTADOS

4.1 Ativação policlonal dos linfócitos B na ausência das moléculas MyD88, CD1d, I-A^b, CD4 e CD28 durante a infecção pelo *P. chabaudi*

Uma vez que a ativação policlonal durante a infecção pelo *P. chabaudi* resulta em produção de anticorpos, preferencialmente IgM e IgG2a (Falanga et al., 1987; D'Império Lima et al., 1991; D'Império Lima et al., 1996; Sardinha et al., 2002), o nosso objetivo inicial foi determinar o papel de diversas moléculas que estão envolvidas na ativação T-independente e T-dependente dos linfócitos B. Assim, camundongos das linhagens C57BL/6, MyD88^{-/-}, CD1d^{-/-}, I-A^{b/-} (moléculas de classe II MHC^{-/-}), CD4^{-/-} e CD28^{-/-} foram infectados com 10⁶ EP, as parasitemias foram acompanhadas diariamente através da análise de esfregaços sangüíneos corados por Giemsa e as populações celulares foram analisadas por citometria de fluxo. A infecção pelo *P. chabaudi* induz nos camundongos C57BL/6 um aumento no número de linfócitos B (B220⁺) no dia 4 de infecção. Três dias mais tarde, quando a parasitemia alcançou seu pico máximo com aproximadamente 40% dos eritrócitos infectados observamos uma redução no número de linfócitos B, o que se correlacionava com o aparecimento dos plasmócitos (B220^{LO}CD138⁺) (**Figura 1A**). Além disso, os dados mostraram um aumento na expressão da molécula CD69 nos linfócitos B no dia 7 de infecção nos camundongos C57BL/6 (**Figura 1B**). Nos camundongos deficientes nas moléculas I-A^b, CD4 e CD28 as médias de fluorescência eram significativamente menores em relação aos animais C57BL/6, MyD88^{-/-} e CD1d^{-/-}. Mais ainda, no dia 4 de infecção, as porcentagens de linfócitos B que proliferaram na presença de EP encontravam-se diminuídas na ausência das moléculas MyD88, I-A^b, CD4 e CD28, quando comparadas com aquelas dos controles C57BL/6 e dos animais CD1d^{-/-} no mesmo dia de infecção. Para complementar estes dados, os números de células produtoras de anticorpos foram determinados no dia 7 de infecção pela técnica de Elisaspot. Foi observado que a ausência das moléculas de I-A^b, CD4 e CD28 resulta em números menores de células produtoras de IgM, IgG2a e IgG1, quando comparados aos valores observados nos animais C57BL/6, MyD88^{-/-} e CD1d^{-/-}. Neste sentido a ausência das moléculas MyD88 e CD1d não parece influenciar no número de células produtoras de IgM e IgG2a. Porém, os camundongos MyD88^{-/-} apresentaram um aumento significativo ($p < 0,001$) no número de células produtoras de IgG1 com relação aos camundongos C57BL/6. Assim, estes resultados mostraram em conjunto que os

linfócitos T CD4⁺ restritos por I-A^b participam da ativação dos linfócitos B na fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*, contribuindo para o aumento da expressão do CD69, assim como para a proliferação e produção de anticorpos do tipo IgM, IgG2a e IgG1. A molécula CD28 também parece estar envolvida nesse processo. Por outro lado, a molécula CD1d não influencia a ativação policlonal dos linfócitos B, enquanto a molécula MyD88 parece estar envolvida apenas parcialmente na proliferação dos linfócitos B, sendo que a sua ausência determina um aumento na produção de IgG1.

Figura 1. Ativação policlonal dos linfócitos B na ausência das moléculas MyD88, CD1d, I-A^b, CD4 e CD28 durante a infecção pelo *P. chabaudi*. (A) Parasitemia, número de linfócitos B220⁺ e células B220^{LO}CD138⁺ (plasmócitos) no baço de camundongos C57BL/6 infectados com 10⁶ EP (dias 4 e 7) e controles não infectados. (B) Expressão de CD69 nos linfócitos B, número de células produtoras de IgM, IgG2a e IgG1 no baço de camundongos C57BL/6 (B6), MyD88^{-/-}, CD1d^{-/-}, I-A^{b/-}, CD4^{-/-} e CD28^{-/-} infectados com 10⁶ EP (dia 7) e controles não infectados. Porcentagens de proliferação dos linfócitos B (CD19⁺CFSE^{LO}) do baço de camundongos C57BL/6, MyD88^{-/-}, CD1d^{-/-}, I-A^{b/-}, CD4^{-/-} e CD28^{-/-} no dia 4 de infecção, estimulados por 72 horas *in vitro* na presença de EP. (A) Os valores representam a média de parasitemia de 4 animais, ou o valor individual de 4-5 animais por grupo. (B) Cada barra representa a média de 3-4 animais por grupo $\pm$ desvio padrão. (A) ***p<0,001 entre os animais controles e infectados. (B) #p<0,05, ##p<0,01 e ###p<0,001 entre os animais *knockouts* (MyD88^{-/-}, CD1d^{-/-}, I-A^{b/-}, CD4^{-/-}, CD28^{-/-}) e C57BL/6 infectados.

4.2 Caracterização dos linfócitos T CD4⁺ na fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi* em camundongos C57BL/6 e CD28^{-/-}

Uma vez que na fase inicial da doença observamos a participação dos linfócitos T CD4⁺ restritos por moléculas de classe II do MHC na ativação e proliferação dos linfócitos B, assim como na produção de anticorpos IgM, IgG2a e IgG1, os experimentos seguintes tiveram como finalidade caracterizar os linfócitos T CD4⁺ responsáveis por essa ativação. Dado o envolvimento da molécula CD28 nesse processo, avaliamos a expressão de moléculas de superfície envolvidas na ativação dos linfócitos B e que caracterizam as sub-populações de linfócitos T_{EFH} e T_{FH} em camundongos C57BL/6 e CD28^{-/-}. Os resultados mostraram que, no dia 4 da infecção, ocorre um aumento exacerbado na expressão das moléculas ICOS e OX40 que tende a aumentar ainda mais no dia 7 de infecção (**Figura 2A**). Os linfócitos T CD4⁺ aumentam a expressão de CD69 nos dias 4 e 7 de infecção, porém no dia 7 de infecção o aumento é menor em camundongos CD28^{-/-} quando comparados com os animais controles. Com relação às moléculas de CD28 e CD40L, foi observado um ligeiro aumento, sendo mais perceptível no dia 7 de infecção. No entanto, os camundongos deficientes na molécula CD28 apresentaram níveis menores do ICOS e OX40, quando comparados com os animais C57BL/6. Mais ainda, os nossos resultados mostraram que a ausência do CD28 resulta em uma redução total da expressão do CD40L. Como pode ser visualizada nos dias 4 e 7 de infecção (**Figura 2B**), a população de linfócitos T CD4⁺ com níveis altos da molécula ICOS expressam simultaneamente a molécula OX40.

Uma vez que os nossos dados mostraram que os linfócitos T CD4⁺ da fase aguda aumentam a expressão de moléculas que participam na interação T-B, o passo seguinte foi determinar as características topológicas dos linfócitos T CD4⁺ mediante a expressão de receptores para quimiocinas. Para isto, as células do baço foram avaliadas quanto à expressão de CXCR5 e CXCR4. Os linfócitos T CD4⁺ apresentam um aumento na expressão do CXCR4 durante a fase inicial da infecção (dias 4 e 7 de infecção). Com relação à expressão do CXCR5 não foi observada nenhuma mudança no dia 4 de infecção, porém no dia 7 houve um ligeiro aumento nos níveis do CXCR5 quando comparado com o controle não infectado. Mais ainda, o aumento do CXCR4 se refere à população de linfócitos T CD4⁺OX40⁺ (**Figura 2C**) e linfócitos T CD4⁺ICOS⁺ (dado não mostrado), observada tanto nos animais

controles como nos infectados (dia 4 e 7 de infecção). Além disso, é interessante notar que a ausência do CD28 parece não alterar ou até resultar no aumento na expressão de CXCR4 nos linfócitos T CD4⁺OX40⁺ no dia 4 de infecção, quando comparado com os níveis observados nos camundongos C57BL/6 no mesmo dia de infecção. Quando observamos a população de linfócitos T CD4⁺ com relação à expressão de CXCR5, não houve diferenças nos níveis apresentados por parte dos linfócitos T CD4⁺OX40⁺ e linfócitos T CD4⁺OX40⁻ nos dias 4 e 7 de infecção (**Figura 2D**).

Considerados em conjunto, estes resultados mostram o perfil de ativação dos linfócitos T CD4⁺, com altos níveis de moléculas importantes na interação T-B mediada por ligações entre CD28/B7, CD40L/CD40, ICOS/ICOSL, OX40/OX40L, o que poderia possibilitar a cooperação com os linfócitos B na fase inicial da infecção. Mais ainda, a expressão de CXCR4 nos linfócitos T CD4⁺ sugere a possibilidade de que essa interação ocorra na região extra-folicular do baço.

Figura 2. Caracterização dos linfócitos T CD4⁺ na fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi* em camundongos C57BL/6 e CD28^{-/-}. (A,B) Expressão de CD28, CD40L, ICOS, OX40, CXCR5 e CXCR4 nos linfócitos T CD4⁺ do baço de camundongos C57BL/6 (B6) e CD28^{-/-} infectados com 10⁶ EP (dias 4 e 7) e controles não infectados. (C) Histograma da expressão do receptor CXCR4 e (D) CXCR5 a partir da janela de linfócitos T CD4⁺OX40⁺ (histograma aberto) e linfócitos T CD4⁺OX40⁻ (histograma fechado) nos camundongos C57BL/6 e CD28^{-/-} infectados (dias 4 e 7) e controles não infectados. Dado representativo de dois experimentos realizados em separado (n=3).

4.3 Ativação policlonal dos linfócitos B *naives* induzida *in vitro* pelos linfócitos T provenientes da fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*

A fim de estabelecer um modelo *in vitro* que permitisse determinar os mecanismos envolvidos na ativação policlonal dos linfócitos B, e uma vez que nossos dados anteriores (**Figura 2**) mostraram que os linfócitos T CD4⁺ do dia 4 de infecção apresentam altos níveis de moléculas importantes na interação T-B, linfócitos T e B foram cultivados na presença e ausência de EP. Os linfócitos T foram

purificados por seleção negativa a partir de células do baço de camundongos C57BL/6 no dia 4 de infecção utilizando-se uma mistura de anticorpos anti-I-A^b, anti-CD19, anti-CD11c e anti-CD11b. A seguir, os linfócitos T foram cultivados *in vitro* com células do baço de camundongos NUDE, utilizadas como fonte de linfócitos B *naïves*. Nós observamos que, na presença de EP, os linfócitos T são capazes de ativar os linfócitos B, induzindo o aumento da expressão de CD69 em praticamente todas as células após 24 horas *in vitro*. Porém, nas 72 horas de cultura, os níveis de CD69 eram menores comparados com os observados anteriormente. Com relação à proliferação dos linfócitos B, observamos que apenas o estímulo gerado pela presença dos linfócitos T do dia 4 de infecção e EP, em conjunto, resulta na proliferação dos linfócitos B nas 72 horas (**Figura 3**), o que não acontece quando colocamos linfócitos T *naïves*. Mais ainda, apenas na presença de EP e linfócitos T do dia 4 de infecção, os linfócitos B produzem altos níveis de anticorpos IgM e IgG (**Figura 4A**), preferencialmente dos isotipos IgG1 e IgG2a (**Figura 4B**). O análise da afinidade das lectinas dos anticorpos IgG1 e IgG2a provenientes das culturas de linfócitos B estimulados pelos linfócitos T do dia 4 de infecção e EP mostrou baixos níveis de glicosilação na porção Fc (**Figura 4C**).

Figura 3. Ativação policlonal dos linfócitos B *naïves* induzida *in vitro* pelos linfócitos T provenientes da fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*. Cultura de células do baço de camundongos NUDE *naïves* na presença ou ausência de EP (4×10^6), juntamente com linfócitos T de camundongos C57BL/6 (B6) *naïves* (0d) ou do dia 4 após infecção (4d). Histogramas da expressão de CD69 e proliferação a partir da janela de linfócitos CD19⁺ após 24 ou 72 horas *in vitro*.

Com a finalidade de entender o padrão de reconhecimento desses anticorpos IgM e IgG, nós testamos os sobrenadantes das culturas de linfócitos B estimulados por EP e linfócitos T ativados com relação ao reconhecimento de antígenos próprios e de patógenos (**Tabela 2**). Para isto, nós utilizamos como antígenos próprios de tecidos a MBP (proteína básica da mielina) e tiroglobulina, assim como o DNA de fita dupla e histonas, antígenos presentes no núcleo celular. Como antígenos de patógenos, nós utilizamos extratos de *P. chabaudi* e *Mycobacterium bovis* BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) e LPS. Os nossos resultados mostraram que os anticorpos IgM eram capazes de reconhecer tanto auto-antígenos quanto os antígenos dos patógenos. Assim, a IgM reconhecia DNA de fita dupla e tiroglobulina com títulos baixos (1/8 e 1/2, respectivamente), histonas e LPS com títulos semelhantes (1/16), mas menores que o título apresentado para MBP (1/32). Mais ainda, a IgM presente nas nossas culturas reconhecia os extratos de *P. chabaudi* e BCG com títulos superiores a 1/128. Com relação ao anticorpo IgG, nós observamos

que, de forma semelhante à IgM, era capaz de reagir com alta intensidade com os extratos de *P. chabaudi* e BCG, com títulos maiores que 1/128. Além disso, neste caso, a IgG reagia com a MBP com títulos maiores que 1/128. A IgG produzida nas culturas reconhecia também tiroglobulina, histonas e DNA, embora com títulos menores que aos observados para a IgM em relação às mesmas moléculas. Cabe mencionar que a IgG não teve a capacidade de reconhecer o LPS.

Estes resultados sugerem que o nosso modelo *in vitro* é ideal para o estudo da ativação policlonal dos linfócitos B na fase aguda da doença, uma vez que observamos que os linfócitos B *naïves* não apenas aumentam a expressão do CD69 e proliferam, mas também são capazes de produzir anticorpos IgM e IgG com baixos níveis de glicosilação e uma ampla variedade de reconhecimento, que inclui desde antígenos próprios até antígenos de patógenos, e que essa ativação depende da presença de EP e de linfócitos T ativados na fase aguda da infecção.

Figura 4. Produção de anticorpos pelos linfócitos B *naives* estimulada *in vitro* pelos linfócitos T provenientes da fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*. (A,B) Produção de anticorpos IgM e IgG, assim como os isótipos IgG2a, IgG1, IgG2b e IgG3 avaliada nos sobrenadantes das culturas descritas na figura 3 (após 10 dias de cultura *in vitro*). Cada barra representa a média dos valores 1/título obtidos a partir da D.O. a 650nm. Os dados são representativos de três experimentos realizados em separado. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ entre os sobrenadantes das culturas de células de camundongos NUDE na presença de EP e linfócitos T do dia 4 de infecção e linfócitos B. (C) Afinidade das lectinas pelos anticorpos IgG1 e IgG2a provenientes das culturas de células de camundongos NUDE na presença de EP e linfócitos T do dia 4 de infecção .

Tabela 2 - Títulos de anticorpos IgM e IgG frente a antígenos próprios e de patógenos produzidos por linfócitos B *naïves* cultivados *in vitro* na presença de EP e linfócitos T.

Antígeno		Título	
		IgM	IgG
Tecido	MBP	1/32	>1/128
	Tiroglobulina	1/2	1/1
Núcleo	Histona	1/16	1/2
	DNA	1/8	1/1
Patógenos	LPS	1/16	ND
	<i>M. bovis</i> BCG	>1/128	>1/128
	<i>P. chabaudi</i>	>1/128	>1/128

A presença de anticorpos IgM e IgG foi avaliada nos sobrenadantes das culturas após 10 dias *in vitro*. Os valores dos títulos são representativos de dois experimentos realizados em separados. N.D. se refere a não detectado.

4.4 Ativação policlonal *in vitro* na ausência da molécula de classe II do MHC expressa nos linfócitos B

Para avaliar os mecanismos envolvidos na ativação policlonal dos linfócitos B induzida pelos linfócitos T provenientes da fase inicial da infecção pelo *P. chabaudi*, e uma vez que nossos dados anteriores mostraram que essa interação resulta na ativação, proliferação e produção de anticorpos, os experimentos seguintes tiveram como objetivo verificar a participação da molécula de classe II do MHC neste processo. Para isto, linfócitos T do dia 4 de infecção foram cultivados *in vitro* com linfócitos B *naïves* deficientes na molécula de classe II do MHC, na presença ou ausência de EP. Como pode ser visualizada na figura 5A, a ausência da molécula de classe II do MHC nos linfócitos B se reflete não apenas em uma diminuição da ativação e proliferação dessas células, mas também em uma redução significativa dos níveis de anticorpos IgM e IgG produzidos, em relação às culturas que apresentam linfócitos B normais. Para entender se a ativação das células B estaria relacionada diretamente com a sinalização mediada pela molécula de classe II do MHC presente na sua superfície ou por mecanismos que envolvem a sinalização do linfócito T resultante da ativação via complexo MHC-TCR, nós adicionamos células

do baço de camundongo NUDE naive nas culturas de linfócitos B I-A^{b-/-}, e linfócitos T na presença ou ausência de EP (**Figura 5B**). Os dados mostraram que nas culturas onde foram adicionadas APCs I-A^{b+/+}, os linfócitos B I-A^{b-/-} apresentavam níveis similares da expressão do CD69 em comparação com os linfócitos B I-A^{b+/+} após 24 horas *in vitro*. Além disso, apesar de que a porcentagem de linfócitos B I-A^{b-/-} em proliferação foi menor que a de linfócitos B I-A^{b+/+}, houve um incremento de até duas vezes quando comparada com os resultados observados na figura 4A referente à proliferação dos linfócitos B I-A^{b-/-} na presença de EP e células T ativadas. Em conjunto estes resultados mostraram que a molécula de classe II do MHC é crucial na ativação dos linfócitos B. Mais ainda, os nossos resultados sugerem que o papel dessa molécula está relacionado principalmente à ativação do linfócito T.

Figura 5. Ativação policlonal *in vitro* na ausência da molécula de classe II do MHC expressa nos linfócitos B. (A) Expressão de CD69, proliferação e produção de anticorpos IgM e IgG por linfócitos B purificados do baço de camundongos C57BL/6 (B6) e I-A^{b-/-} *naïves*, na presença ou ausência de EP (4×10^6), estimulados com linfócitos T do dia 4 após a infecção pelo *P. chabaudi*. A produção de anticorpos IgM e IgG foi avaliada nos sobrenadantes das culturas descritas anteriormente (após 10 dias de cultura *in vitro*). Cada barra representa a média dos valores 1/título obtidos a partir da D.O a 650nm. (B) Expressão de CD69 e proliferação nas células CD19⁺ I-A^{b+/+} ou CD19⁺ I-A^{b-/-} após 24 (histograma) ou 72 horas *in vitro* (gráfico de barra). Os dados são representativos de dois experimentos realizados em separado. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ entre os linfócitos B I-A^{b+/+} e linfócitos B I-A^{b-/-}.

4.5 Ativação dos linfócitos B *in vitro* na presença de anticorpos anti-CD40L, anti-CD40, anti-ICOS e anti-OX40L e na ausência da molécula CD28

Com a finalidade de avaliar a participação da molécula CD28 na ativação policlonal dos linfócitos B *in vitro*, nós purificamos linfócitos T de camundongos C57BL/6 e CD28^{-/-} no dia 4 de infecção, e cultivamos com linfócitos B purificados do baço de camundongos C57BL/6 *naïves*, na presença ou ausência de EP. Conforme apresentado na figura 6A, a ausência da interação T-B mediada pela molécula CD28 resulta em uma diminuição significativa ($p < 0,001$), tanto da expressão da molécula

CD69, como da porcentagem de células B que proliferam. O índice de divisão celular também é menor na presença de linfócitos T CD28^{-/-} (**Figura 6B**). Mais ainda, quando avaliamos a produção dos anticorpos IgM e IgG nos sobrenadantes dessas culturas (**Figura 6C**), observamos que os níveis se encontravam reduzidos ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente) em comparação com os sobrenadantes provenientes das culturas controles, ou seja na presença de linfócitos T que expressam CD28 na sua superfície.

A interação CD40L-CD40 é importante para o desenvolvimento da resposta humoral T-dependente (Armitage et al., 1992; Lane et al., 1992; Noelle et al., 1992; Van den Eertwegh et al., 1993; Kawabe et al., 1994). Para verificarmos a importância dessa interação no nosso modelo experimental nós inibimos a sinalização via CD40, utilizando um anticorpo neutralizante que se liga ao CD40L presente no linfócito T. Assim, nós observamos que de forma semelhante ao observado na ausência da molécula CD28, a ativação, proliferação e produção de anticorpos se encontravam seriamente afetadas.

Mais ainda, uma vez que a interação B7-CD28 resulta na ativação dos linfócitos T (Lenschow e Walunas, 1996; Lanzavecchia et al., 1999), aumentando a expressão do CD40L na sua superfície (Sharpe e Freeman, 2002), e nos nossos resultados anteriores observamos que a ausência do CD28 afeta a ativação dos linfócitos B, nós utilizamos um anticorpo agonista para CD40 nas nossas culturas que tinham linfócitos T deficientes na molécula CD28, como tentativa de restabelecer a sinalização mediada por CD40 nos linfócitos B. Conforme o esperado, os linfócitos B que foram estimulados mediante a sinalização do CD40 não apenas se ativaram e proliferaram, mas também produziram altos níveis de IgM. Porém, os dados mostraram que a estimulação via CD40, na ausência da sinalização via CD28 não é suficiente para induzir mudança isotípica, o que se reflete nos baixos níveis de IgG.

Figura 6. Ativação policlonal dos linfócitos B induzida *in vitro* na presença de anticorpos anti-CD40L, anti-CD40, anti-ICOS e anti-OX40L e na ausência da molécula CD28. (A) Expressão de CD69 e proliferação por linfócitos B *naïves*, na presença ou ausência de EP (4×10^6), estimulados por linfócitos T purificados do baço de camundongos C57BL/6 e $CD28^{-/-}$ no dia 4 após infecção pelo *P. chabaudi* na presença do anticorpo monoclonal CD40L, CD40, ICOS ou OX40L. (B) Índice de divisão celular em linfócitos B e (C) produção de anticorpos IgM e IgG nas culturas descritas no item 6A. A produção de anticorpos foi avaliada nos sobrenadantes das culturas descritas anteriormente (após 10 dias *in vitro*). Cada barra representa a média dos valores equivalentes a 1/título obtidos a partir da D.O a 650nm. Os dados são representativos de três experimentos realizados em separado. NR se refere a não realizado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparados com o grupo que contém linfócitos B estimulados com linfócitos T do dia 4 de infecção na presença de EP. # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ comparados com o grupo que contém linfócitos B estimulados com linfócitos T do baço de camundongos $CD28^{-/-}$ no dia 4 de infecção na presença de EP.

Sabendo que a indução da molécula ICOS nos linfócitos T ativados depende da sinalização via CD28 (Riley et al., 2001; Beier et al., 2000; McAdam et al., 2000), e que a molécula ICOS é uma característica importante nos linfócitos T responsáveis pela produção extra-folicular de anticorpos (T_{EFH}), o nosso objetivo seguinte foi avaliar a participação desta molécula na ativação policlonal dos linfócitos B, quando estimulados por linfócitos T do dia 4 de infecção, na presença de EP. Para isto, nós utilizamos um anticorpo inibidor da molécula ICOS e avaliamos os parâmetros descritos anteriormente. Os nossos resultados mostram que a inibição de ICOS determina uma redução parcial da expressão de CD69, assim como da proliferação dos linfócitos B, em relação às culturas controles. Para confirmar o nosso dado relacionado com a porcentagem de células em proliferação, nós analisamos o índice de divisão celular, o que mostrou uma diferença significativa entre esses dois grupos ($p < 0,01$). Com relação à produção de anticorpos, quando inibimos a molécula ICOS, os títulos de IgM e IgG diminuam drasticamente, chegando a níveis quase imperceptíveis na ausência de CD28 e ICOS.

Outra molécula que poderia participar nesta interação T-B seria o OX40L, uma molécula presente no linfócito B que se liga ao OX40 no linfócito T. Assim, conforme descrito acima, o anticorpo OX40L foi adicionado nas culturas e a ativação, proliferação e produção de anticorpos pelos linfócitos B foram avaliadas. Vale lembrar que estes anticorpos ligam-se nos linfócitos B, podendo ter atividade agonista. Os resultados mostraram que o anticorpo anti-OX40L parece resultar em uma diminuição parcial da expressão de CD69. Neste caso, observamos também que apesar do índice de divisão celular não se mostrar estatisticamente diferente em relação ao grupo controle, o perfil de proliferação se mostrou diferente. Mais ainda, os sobrenadantes apresentaram níveis baixos de IgM, mas a produção de IgG foi semelhante àquela do grupo controle. Ainda assim, o tratamento simultâneo com anticorpos anti-ICOS e anti-OX40L teve um efeito aditivo em relação à inibição da produção de IgG, quando comparado com a inibição apenas da molécula ICOS. É interessante notar ainda que nas culturas em que os linfócitos B foram estimulados com linfócitos T $CD28^{-/-}$, a adição de anticorpos anti-OX40L induziu um aumento na produção de IgG ($p < 0,05$).

Em conjunto, estes resultados sugerem que a colaboração T-B mediada pelas interações CD28/B7, CD40L/CD40 e ICOS/ICOSL é importante na ativação

policlonal dos linfócitos B na fase inicial da infecção pelo *P. chabaudi*. O papel na interação OX40/OX40L ainda não está claro, podendo ter influência na mudança de classe para IgG.

4.6 Ativação policlonal dos linfócitos B induzida *in vitro* pelos linfócitos T CD4⁺ICOS^{HIGH} e T CD4⁺ICOS^{LOW} da fase aguda da infecção

Os nossos resultados anteriores mostraram que no dia 4 de infecção os linfócitos T CD4⁺ expressam altos níveis da molécula ICOS (**Figura 2A**), que parecem ser importantes não apenas para a ativação dos linfócitos B, mas também para que estes proliferem e produzam anticorpos IgM e IgG (**Figura 6**). Em vista disso, nós decidimos avaliar o grau de participação dos linfócitos T CD4⁺ICOS^{HIGH} e CD4⁺ICOS^{LOW} na ativação policlonal dos linfócitos B. Para isto, a população de linfócitos T CD4⁺ provenientes de um camundongo no dia 4 de infecção foi separada por citometria de fluxo com relação à expressão da molécula ICOS. As células foram a seguir cultivadas com linfócitos B *naïves* na presença de EP.

De maneira geral, foi observado que os linfócitos B que foram estimulados pelos linfócitos T CD4⁺ICOS^{HIGH} foram capazes de aumentar a expressão do CD69 na sua superfície, o que não aconteceu na população de linfócitos B estimulada com os linfócitos T CD4⁺ICOS^{LOW} (**Figura 7A**). Mais ainda, os linfócitos T CD4⁺ICOS^{HIGH} estimularam a proliferação de mais de 90% dos linfócitos B presentes nas culturas. Na ausência de interação através da molécula ICOS, esses valores diminuíram para 40%. Além disso, nós observamos que apenas a população de linfócitos T CD4⁺ICOS^{HIGH} foi capaz de induzir a produção de anticorpos IgM e IgG (**Figura 7B**). Com base nestes resultados, podemos concluir que a população de linfócitos T CD4⁺ICOS^{HIGH} é responsável pela ativação policlonal dos linfócitos B durante a fase inicial da infecção pelo *P. chabaudi*.

Figura 7. Ativação policlonal dos linfócitos B induzida *in vitro* pelos linfócitos T CD4⁺ICOS^{HIGH} e T CD4⁺ICOS^{LOW} da fase aguda da infecção. (A) Pureza das populações T CD4⁺ICOS^{HIGH} e T CD4⁺ICOS^{LOW}. Expressão de CD69 e proliferação em linfócitos CD19⁺ após 72 horas *in vitro* na presença de EP (4x10⁶) e linfócitos T CD4⁺ICOS^{HIGH} e T CD4⁺ICOS^{LOW} purificados por citometria de fluxo do baço de camundongos C57BL/6 (B6) do dia 4 de infecção. (B) Produção de anticorpos IgM e IgG nas culturas descritas no item A (após 10 dias *in vitro*). Cada barra representa a média dos valores 1/título obtidos a partir da D.O a 650nm. Os dados são representativos de dois experimentos realizados em separado. *** p<0,001 entre os sobrenadantes das culturas de linfócitos B estimulados com linfócitos T CD4⁺ICOS^{HIGH} e linfócitos B estimulados com linfócitos T CD4⁺ICOS^{LOW}.

4.7 Ativação policlonal dos linfócitos B MZ e FO induzida *in vitro* pelos linfócitos T da fase aguda da infecção e mediada pela molécula ICOS

Uma vez que os linfócitos B MZ e FO se diferenciam não apenas por características fenotípicas, mas também pelo seu comportamento frente a diversos estímulos, o nosso experimento seguinte teve como finalidade determinar quais dessas populações participam da resposta policlonal induzida *in vitro* pelos linfócitos T da fase inicial da infecção pelo *P. chabaudi*, assim como o envolvimento da molécula ICOS nesse processo. Para isso, nós separamos por citometria de fluxo as duas populações com relação à expressão dos marcadores CD21 e CD23. Os linfócitos B MZ e FO *naïves* foram colocadas *in vitro* com linfócitos T do dia 4 de infecção e EP, na presença e ausência do anticorpo anti-ICOS. Os nossos resultados mostraram que os linfócitos T são capazes de estimular as duas populações de linfócitos B esplênicos, induzindo o aumento da expressão de CD69 e a proliferação (**Figura 8A**). Mais ainda, a inibição da molécula ICOS reduz

parcialmente a expressão de CD69 e inibe substancialmente a proliferação das duas populações de linfócitos B. Mais evidente em relação aos linfócitos B FO, observando-se níveis menores da expressão de CD69 e das porcentagens de células B que proliferam quando comparadas com as culturas que não foram inibidas com anticorpos anti-ICOS. Com relação à produção de anticorpos, observamos que ambas as populações produzem níveis semelhantes de IgM e IgG e que na ausência de ICOS esses níveis diminuem significativamente (**Figura 7B**).

Figura 8. Ativação policlonal dos linfócitos B MZ e FO induzida *in vitro* pelos linfócitos T da fase aguda da infecção e mediada pela molécula ICOS. (A) Pureza dos linfócitos B MZ e FO. Expressão de CD69 e proliferação de linfócitos CD19⁺ após 72 horas *in vitro* na presença de EP (4x10⁶), cultivados com linfócitos T purificados do baço de camundongos C57BL/6 (B6) do dia 4 de infecção (4d). (B) Produção de anticorpos IgM e IgG das culturas acima descritas. A produção de anticorpos IgM e IgG foi avaliada nos sobrenadantes das culturas após 10 dias *in vitro*. Cada barra representa a média dos valores 1/título obtidos a partir da D.O a 650nm. Os dados são representativos de dois experimentos realizados em separado. ***p<0,001 entre as culturas de linfócitos B MZ e FO estimulados na presença ou ausência de anti-ICOS.

A fim de avaliarmos o padrão de reconhecimento dos anticorpos IgM e IgG produzidos por ambas as populações, nós testamos os sobrenadantes das culturas

de linfócitos B MZ e FO com relação ao reconhecimento de antígenos próprios como MBP, tiroglobulina, DNA e histonas, assim como antígenos de patógenos como *P. chabaudi*, *M. bovis* BCG e LPS (**Tabela 3**). Os nossos resultados mostraram que os anticorpos IgM e IgG provenientes de ambas as populações apresentavam um padrão semelhante de reconhecimento para os antígenos que foram testados com exceção da IgM produzida pelos linfócitos B MZ e FO que foram capazes de reconhecer as histonas com títulos como 1/16 e 1/4, respectivamente. Neste sentido, a IgM foi capaz de detectar a MBP (1/256), mas com títulos menores que o observado para IgG em relação à mesma proteína (>1/2040). Mais ainda, a IgM e a IgG presentes nas nossas culturas reconheciam os extratos de *P. chabaudi* e BCG com títulos maiores que 1/2040. Cabe mencionar que os antígenos como tiroglobulina, DNA e LPS não foram detectados no nosso ensaio.

Em conjunto estes resultados sugerem que na fase aguda da infecção os linfócitos T participam na ativação dos linfócitos B MZ e FO mediante mecanismos que envolvem a molécula ICOS. Além disso, no nosso modelo *in vitro*, os anticorpos produzidos por ambas as populações parecem ter um perfil semelhante de reconhecimento para moléculas próprias e de patógenos.

Tabela 3 - Títulos de anticorpos IgM e IgG frente a antígenos próprios e de patógenos produzidos pelos linfócitos B MZ ou B FO na presença de EP e linfócitos T.

Antígeno		B MZ		B FO	
		IgM	IgG	IgM	IgG
Tecido	MBP	1/256	>1/2040	1/256	>1/2040
	Tiroglobulina	ND	ND	ND	ND
Núcleo	Histona	1/16	ND	1/4	ND
	DNA	ND	ND	ND	ND
Patógenos	LPS	ND	ND	ND	ND
	<i>M. bovis</i> BCG	>1/2040	>1/2040	>1/2040	>1/2040
	<i>P. chabaudi</i>	>1/2040	>1/2040	>1/2040	>1/2040

A presença de anticorpos IgM e IgG foi avaliada nos sobrenadantes das culturas após 10 dias *in vitro*. Os valores dos títulos são representativos de dois experimentos realizados em separado. N.D. se refere a não detectado.

5 DISCUSSÃO

A fase inicial de infecções causadas por vírus e protozoários caracteriza-se por uma intensa ativação policlonal (Montes et al., 2007). No entanto, os mecanismos envolvidos nesta resposta são pouco conhecidos. Os estudos realizados durante este trabalho tiveram como objetivo central descrever os mecanismos envolvidos na ativação policlonal dos linfócitos B do baço durante a infecção pelo *P. chabaudi*. De forma geral, o nosso estudo sugere o envolvimento dos linfócitos T nos mecanismos que induzem a ativação policlonal dos linfócitos B causando a proliferação e diferenciação para produção de anticorpos na malária. Neste sentido, trabalhos anteriores mostraram no modelo murino que a administração *in vivo* de anticorpos anti-L3T4 (CD4) no início da infecção pelo *T. cruzi* resulta na diminuição da ativação policlonal dos linfócitos B como consequência da eliminação dos linfócitos Th (Minoprio et al., 1987). Hunziker et al (2003) constatou que camundongos infectados com o vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV) produziram altos níveis de anticorpos policlonais, em um processo dependente de linfócitos T CD4⁺ ativados. Esse estudo mostrou ainda que a interação T-B depende da molécula de classe II do MHC presente nos linfócitos B e que a ativação e diferenciação dos linfócitos B em células produtoras de anticorpos são independentes da especificidade do seu BCR.

O nosso estudo mostra que a ativação dos linfócitos B depende da molécula de classe II do MHC em um processo que parece estar relacionado à ativação dos linfócitos T. Certamente estes resultados sugerem a capacidade dos linfócitos B de apresentar antígenos do parasita, porém, não está claro ainda, os mecanismos envolvidos na captação de antígenos pelos linfócitos B. Um estudo realizado em camundongos BCR deficientes (Casola et al., 2004) mostraram a formação de centros germinativos no intestino em um processo dependente da interação com linfócitos T e independente da captação de antígenos via BCR. Para isto, linfócitos B que possuem a proteína LMP2A do vírus Epstein-Barr no lugar do BCR foram utilizados. Neste trabalho observaram que a expressão do LMP2A não apenas garantia a sobrevivência dos linfócitos B, mas foi suficiente para gerar hipermutação somática assim como a maquinaria necessária para mudança de classe. É interessante mencionar que no nosso trabalho observamos que a ativação policlonal de ambas às populações de linfócitos B foi dependente dos linfócitos T e que, apesar dos linfócitos B MZ apresentarem altos níveis de CR2 (CD21) não houve

diferenças significativas quando comparados com os linfócitos B FO. Estes resultados sugerem que, no nosso modelo experimental, a captação de antígenos por receptores de complemento não parece ser essencial para os linfócitos B se ativarem e produzirem IgG. No entanto, não podemos descartar a possibilidade que na fase aguda da infecção os linfócitos B captem antígenos por receptores Fc (FcR), pinocitose ou via BCR.

A ativação policlonal dos linfócitos B se caracteriza pela produção de anticorpos de baixa afinidade como resultado da expansão clonal e que em alguns casos pode influenciar a geração de linfócitos B de memória (Bernasconi et al., 2002). Assim, na infecção pelo LCMV foi observado que a produção de anticorpos específicos se desenvolve após o dia 50 de infecção (Battegay et al., 1993). De forma semelhante, um estudo realizado por nosso grupo (Freitas do Rosário et al., 2008) em camundongos infectados com o *P. chabaudi*, sugere que a ativação policlonal dos linfócitos B compromete a geração de anticorpos específicos ao parasita, como consequência dos altos níveis de parasitemia na fase aguda da doença. No entanto, apesar da baixa afinidade dos anticorpos que caracterizam a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*, Mota et al (1998) mostrou que os anticorpos conferem uma pequena proteção mediada por mecanismos que promovem fagocitoses. Neste sentido, observamos que os anticorpos produzidos durante a ativação policlonal reconhecem uma ampla variedade de antígenos que incluem antígenos próprios e de patógenos como o *P. chabaudi* e *M. bovis* BCG. Este dado é interessante uma vez que sugere a possibilidade que os anticorpos produzidos na fase aguda podem conferir proteção contra outras infecções. Trabalhos recentes descrevem que a malária e tuberculose são doenças endêmicas em regiões tropicais, portanto co-infecção é muito comum em indivíduos que se encontram em zonas de alta transmissão (Hawkes et al., 2010). No entanto, pouco se sabe da modulação da resposta frente ao *Plasmodium* em indivíduos previamente infectados com *Mycobacterium*. Por um lado foi mostrado que camundongos C57Bl/6 que se encontravam no transcurso da infecção com *M. tuberculosis* (Mtb) eram resistentes a infecção com *P. yoelii* em um processo dependente do IFN- γ e TNF- α (Page et al., 2005). Em contrapartida, foi observado também que camundongos infectados com *P. chabaudi* AS incrementaram a sua resposta aguda frente ao micobacterium, comprometendo a integridade estrutural

dos granulomas (Hawkes et al., 2010). Este trabalho sugere que a interação destes patógenos poderia potencializar a infecção pelo Mtb. Apesar de não ter sido avaliada a resposta humoral neste tipo de resposta, os nossos dados sugerem que camundongos que se encontram durante uma fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi* poderiam conferir algum tipo de proteção frente a uma infecção pelo *M. bovis* BCG. No entanto, mais estudos precisam ser realizados para entender os mecanismos envolvidos neste tipo de resposta.

Os nossos dados mostraram que os linfócitos T CD4⁺ que caracterizam a fase aguda da infecção aumentam a expressão de CXCR4 e de moléculas importantes na interação T-B como CD28, CD40L, ICOS e OX40. Neste sentido, foi observado que camundongos MRL^{lpr}, isto é, que desenvolvem lúpus como resultado de uma mutação no gene *fas*, apresentam uma população de linfócitos T CD4⁺ que expressam CXCR4 e que se localizam na região extra-folicular (Odegard et al., 2008). Neste trabalho os autores observaram que a formação de IgG extra-folicular depende do CD40L, IL-21 e ICOS. Estes dados sugerem a possibilidade de uma interação T-B extra-folicular que resulta na produção de anticorpos policlonais na fase aguda da malária em um processo dependente de CD40L e ICOS para a mudança de classe. Portanto, podemos especular que a interação T-B não seria um processo exclusivo das áreas foliculares, mas precisaria da presença de linfócitos Th com capacidade de mudar a expressão de seus receptores de quimiocinas em função de sua localização.

A análise do perfil dos linfócitos T CD4⁺ revelou que na ausência da molécula CD28 a expressão do CD40L, OX40 e ICOS se encontravam afetadas. Neste sentido, Elias et al (2005) observara que as porcentagens de linfócitos T CD4⁺ que expressam CD40L se encontravam diminuídos em camundongos deficientes na molécula CD28, assim os autores especularam que o papel principal da molécula CD28 na fase inicial da infecção pelo *P. chabaudi* estaria relacionado a necessidade da sinalização mediada por CD28 nos linfócitos T para aumentar o CD40L e induzir mudança isotípica. No entanto, os nossos resultados *in vitro* permitiram visualizar que apesar da diminuição nas porcentagens de linfócitos B que se ativam e proliferam, a interação CD40/CD40L não parece estar relacionada à mudança de classe, uma vez que ao adicionarmos o anticorpo anti-CD40 nas nossas culturas com a finalidade de induzir mudança de classe não observamos aumento nos níveis

de IgG policlonal. Estes resultados sugerem a possibilidade que outra molécula envolvida na interação T-B seja responsável da mudança isotípica na fase aguda da infecção. Assim podemos especular neste sentido que a interação OX40L/OX40 pode ter influência na mudança de classe uma vez que na ausência da molécula CD28 a sinalização mediada por OX40L foi capaz de estimular a produção de IgG. Resultados anteriores mostraram claramente que a expressão de OX40 *in vitro* e *in vivo* é CD28-dependente (Walker et al., 1999). Neste trabalho os autores observaram que bloqueando a interação OX40/OX40L utilizando um competidor solúvel (OX40-Ig) a formação de centros germinativos diminuía e a produção de anticorpos extra-foliculares aumentava. Em contrapartida, o grupo de Stuber et al (1995) mostrou que a inibição da interação OX40/OX40L utilizando um anticorpo anti-OX40 policlonal afeta a diferenciação dos linfócitos B em células produtoras de anticorpos porém não influencia a geração de centros germinativos ou linfócitos B de memória.

Como mencionado anteriormente, observamos que a ausência da sinalização via CD28 resulta na diminuição da frequência de linfócitos T CD4⁺ que expressam ICOS na sua superfície. Trabalhos anteriores mostraram que o aumento da expressão do ICOS é mediado pela sinalização do TCR e CD28 (McAdam et al., 2000; Riley et al., 2001). Neste sentido, McAdam et al (2008) questiona a importância da sinalização mediada por ICOS e sugere a possibilidade que algumas funções atribuídas à sinalização do CD28 possam ser mediados por ICOS. É interessante destacarmos que nosso modelo *in vitro* se mostrou uma estratégia funcional, apresentando resultados semelhantes aos modelos *in vivo*, possibilitando o estudo das moléculas envolvidas na interação T-B. Assim, nós constatamos a participação do ICOS na ativação policlonal dos linfócitos B, sendo importante não apenas para induzir o aumento do CD69 e a proliferação dos linfócitos B, mas principalmente na produção de anticorpos. Observamos ainda, que na ausência da sinalização das moléculas CD28 e ICOS os níveis de anticorpos foram quase imperceptíveis. Estudos anteriores realizados em humanos e camundongos mostraram a importância da molécula ICOS na mudança de classe, maturação de afinidade e formação de centro germinativo (Dong et al., 2001; Grimbacher et al., 2003; Mak et al., 2003; McAdam et al., 2001). Um trabalho em particular realizado em camundongos duplo *knockout* (DKO) para as moléculas ICOS e CD28 (Suh et

al., 2004) mostrou, diferente dos nossos resultados, que os níveis de IgM produzido após a infecção com o vírus da estomatitis vesicular (VSV) eram semelhantes entre os camundongos selvagens, os DKO e os deficientes nas moléculas ICOS ou CD28. No entanto, os níveis de anticorpos IgG neutralizantes nos dias 8 e 12 após infecção diminuíam na ausência das moléculas ICOS e CD28, sendo severamente afetados nos animais DKO. Este estudo mostrou também que a deficiência na produção de anticorpos neutralizantes era consistente com a diminuição no número de centros germinativos no baço dos animais CD28KO e ICOSKO, assim como a total ausência de centros germinativos no baço dos camundongos DKO. Os autores mostraram ainda, que o comprometimento da resposta humoral estava relacionado à deficiência na proliferação e produção de citocinas por parte dos linfócitos T que foram ativados na ausência de ambas as moléculas. Por outro lado, estudos *in vitro* realizados em linfócitos T CD4⁺ de humanos (McAdam et al., 1998) e camundongos (McAdam et al., 2001) constataram que a estimulação mediada por ICOS era capaz de induzir o aumento da expressão de CD40L, mostrando que existe uma interação entre as vias de sinalização mediadas por ICOS e CD40. Em vista disto, podemos sugerir que na fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*, a sinalização mediada por ICOS tem um papel importante na produção de anticorpos policlonais e que na ausência da sinalização via CD28, a molécula ICOS seria uma das moléculas responsáveis da resposta humoral T-dependente.

Neste estudo acompanhamos o envolvimento da população de linfócitos B MZ na fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*, uma vez que resultados anteriores mostraram que se ativam logo após infecção e que aproximadamente 10% dos linfócitos B que expressam IgG2a na sua superfície com o decorrer da infecção, apresentam características fenotípicas dos linfócitos B MZ (Achtman et al., 2003; Castillo-Méndez et al., 2007). Assim, como mencionamos anteriormente, a ativação de ambas as populações de linfócitos B foram dependentes da interação com linfócitos T e, apesar dos linfócitos B MZ e FO se diferenciarem pelo seu comportamento frente a diversos estímulos, no nosso modelo não observamos diferenças no padrão de reconhecimento dos anticorpos produzidos. Portanto, podemos sugerir que em termos de ativação, proliferação e produção de anticorpos os linfócitos B MZ se comportam de forma semelhantes aos linfócitos B FO. No entanto, não podemos descartar a possibilidade que durante a fase inicial da

infecção pelo *P. chabaudi*, os linfócitos B MZ possam estar envolvidos no transporte de antígenos ligados a imunocomplexos até as FDC, uma vez que a expressão de CD21 (CR2) na sua superfície é importante para a remoção de imunocomplexos (Lopes-Carvalho et al., 2005; Ferguson et al; 2004; Batista et al., 2009). Neste sentido, podemos sugerir ainda que os linfócitos B MZ poderiam colaborar diretamente com os linfócitos B FO, entregando-lhes diretamente os antígenos.

É interessante mencionar que a análise da glicosilação dos anticorpos produzidos *in vitro* mostrou baixos níveis de ácido siálico na porção Fc. Neste sentido, foi observado que a IgG do soro humano contém ácido siálico, o que estaria relacionado a uma ação anti-inflamatória e que após contato com um patógeno um tipo de IgG específica com baixos níveis de ácido siálico é gerado (Kaneko et al., 2006). No modelo murino foi observado que a capacidade da IgG1 de mediar um processo anafilático estava relacionado a presença do ácido siálico na sua porção Fc (Silva et al., 2008) e que a remoção do ácido siálico resultava na redução da sua capacidade de induzir degranulação de mastócitos. Assim, podemos sugerir que os anticorpos IgG1 e IgG2a obtidos das nossas culturas teriam a capacidade de mediar uma resposta inflamatória. Futuros experimentos precisam ser realizados com a finalidade de constatar se a atividade efetora desses anticorpos estaria relacionada à ativação de macrófagos, produção de óxido nítrico ou promovendo fagocitose.

Em conjunto, este trabalho realizado no modelo experimental da infecção pelo *P. chabaudi* contribui para a compreensão dos mecanismos envolvidos na ativação policlonal dos linfócitos B, possibilitando a elaboração de estratégias contra a ativação exacerbada que caracteriza a fase aguda da resposta com a finalidade de gerar uma imunidade protetora.

6 CONCLUSÕES

Obtidas a partir dos estudos *in vivo* das células do baço de camundongos na fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*:

1. Os linfócitos T CD4⁺ restritos por moléculas de classe II do MHC têm um papel importante na ativação policlonal dos linfócitos B, contribuindo para o aumento da expressão de CD69, proliferação e produção de anticorpos IgM, IgG2a e IgG1.
2. A molécula CD28 está envolvida na ativação e proliferação dos linfócitos B, assim como na produção de anticorpos IgM, IgG2a e IgG1.
3. Os linfócitos T CD4⁺ restritos por moléculas CD1d não são essenciais para a ativação policlonal dos linfócitos B.
4. A ausência da molécula MyD88 reduz a proliferação dos linfócitos B e aumenta a produção de anticorpos IgG1 em resposta à infecção, ainda que a expressão de CD69 e a produção de anticorpos IgM e IgG2a permaneça semelhante as observadas nos controles infectados.
5. Os linfócitos T CD4⁺ responsáveis pela ativação policlonal dos linfócitos B apresentam um aumento significativo da expressão das moléculas ICOS e OX40 na superfície, enquanto as moléculas CD28 e CD40L encontram-se apenas ligeiramente aumentadas.
6. O aumento da expressão do receptor para quimiocinas CXCR4, mas não CXCR5, nos linfócitos T CD4⁺ sugere que a interação com os linfócitos B ocorre na região extra-folicular do baço.
7. O aumento da expressão da molécula CD40L nos linfócitos T CD4⁺ não acontece em camundongos deficientes em CD28, enquanto a expressão das moléculas ICOS e OX40 é apenas parcialmente afetada e a de CXCR4 não se altera ou até sofre um acréscimo.

Obtidas a partir dos estudos *in vitro* em culturas de linfócitos B *naïves* estimulados com linfócitos T da fase aguda da infecção e EP

8. Os linfócitos T da infecção aguda, quando na presença de EP, são capazes de estimular linfócitos B *naïves*, aumentando a expressão de CD69, induzindo

a proliferação e a produção de anticorpos IgM e IgG, principalmente dos isótipos IgG2a e IgG1 com baixos níveis de ácido siálico.

9. Estes anticorpos parecem ser polirreativos, uma vez que reconhecem uma ampla variedade de antígenos, incluindo o extrato de patógenos (*P. chabaudi* e micobactéria) e moléculas próprias (proteína básica da mielina e histona).
10. A presença da molécula de classe II do MHC nos linfócitos B parece ser necessária para a ativação dos linfócitos T.
11. As moléculas CD28, CD40L e ICOS presentes nos linfócitos T são essenciais para a ativação e proliferação dos linfócitos B, assim como para a produção de anticorpos IgM e IgG. Na ausência conjunta das moléculas CD28 e ICOS, os níveis de anticorpos IgM e IgG são quase imperceptíveis.
12. A sinalização dos linfócitos B através da molécula CD40 é capaz de resgatar a capacidade dos linfócitos T deficientes em CD28 de induzir a expressão de CD69, a proliferação e a produção de IgM, mas não é suficiente para induzir a mudança isotípica para IgG.
13. A sinalização dos linfócitos B através da molécula OX40L parece induzir o aumento da produção de IgG na ausência de CD28.
14. A ativação policlonal dos linfócitos B é mediada pelos linfócitos T CD4⁺COS^{HIGH}.
15. Os linfócitos B MZ e FO são ativados de forma semelhante pelos linfócitos T da fase aguda da infecção, através de mecanismos dependentes da molécula ICOS.
16. Os anticorpos produzidos pelos linfócitos B MZ e FO parecem ter um perfil semelhante de reconhecimento de antígenos próprios e de patógenos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

- Achtman A, Mahmood K, MacLennan IC, Langhorne J. *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice induces strong B cell responses and striking but temporary changes in splenic cell distribution. J Immunol. 2003;171:317-24.
- Adu D, Williams DG, Quakyi IA, Voller A, Anim-Addo Y, Bruce-Tagoe AA, Johnson GD, Holborow EJ. Anti-ssDNA and antinuclear antibodies in human malaria. Clin. Exp. Immunol. 1982;49:310-6.
- Amano M, Baumgarth N, Dick D, Brossay L, Kronenberg L, Herzenberg A, Strober S. CD1 expression defines subsets of follicular and marginal zone B cells in the spleen: β_2 -microglobulin-dependent and independent forms. J Immunol. 1998;161:1710-7.
- Amlot PL, Grennan D, Humphrey JH. Splenic dependence of the antibody response to thymus-independent (TI-2) antigens. Eur J Immunol. 1985;15:508-12.
- Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, Sato TA, Clifford KN, Macduff BM, Anderson DM, Gimpel SD, Davis-Smith T, Maliszewski CR. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. Nature. 1992;357(6373):80-2.
- Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. Annu Rev Immunol. 2007;25:21-50.
- Attanavanich K, Kearney J. Marginal zone, but not Follicular B cells, are potent activators of naïve CD4 T cells. J Immunol. 2004;172:803-11.
- Baird JK, Jones TR, Danudirgo EW, Annis BA, Bangs MJ, Basri H, Purnomo, Masbar S. Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1991;45(1):65-76.
- Banchereau J, Briere F, Liu YJ, Rousset F. Molecular control of B lymphocyte growth and differentiation. Stem Cells. 1994;12:278-88.
- Batista FD, Harwood NE. The who, how and where of antigen presentation to B cells. Nat Rev. Immunol. 2009;9:15-27.

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

Battegay M, Moskophidis D, Waldner H, Bründler MA, Fung-Leung WP, Mak TW, Hengartner H, Zinkernagel RM. Impairment and delay of neutralizing antiviral antibody responses by virus-specific cytotoxic T cells. J Immunol. 1993;151(10):5408-15.

Baumgarth N, Herman OC, Jager GC, Brown LE, Herzenberg LA, Chen J. B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. J Exp Med. 2000;192(2):271-80.

Baumgarth N, Tung JW, Herzenberg LA. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. Springer Semin Immunopathol. 2005;26(4):347-62.

Beier KC, Hutloff A, Dittrich AM, Heuck C, Rauch A, Büchner K, Ludewig B, Ochs HD, Mages HW, Kroczeck RA. Induction, binding specificity and function of human ICOS. Eur J Immunol. 2000;30(12):3707-17.

Bermejo DA, Amezcua-Vesely MC, Montes CL, Merino MC, Gehrau RC, Cejas H, Acosta-Rodríguez EV, Gruppi A. BAFF mediates splenic B cell response and antibody production in experimental Chagas disease. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(5):e679.

Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of Serological Memory by Polyclonal Activation of Human Memory B Cells. Science. 2002; 298:2199-2202.

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

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

Bouharon-Tayoun H, Attanath P, Sabchareon A, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P. Antibodies which protect man against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion *in vitro* but act in cooperation with monocytes. J Exp Med. 1990;172(6):1633-41.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-54.

Briles DE, Nahm M, Schroer K, Davie J, Baker P, Kearney J, Barletta R. Antiphosphocholine antibodies found in normal mouse serum are protective against intravenous infection with type 3 streptococcus pneumoniae. J Exp Med. 1981;153(3):694-705.

Brocker T, Gulbranson-Judge A, Flynn S, Riedinger M, Raykundalia C, Lane P. CD4 T cell traffic control: *in vivo* evidence that ligation of OX40 on CD4 T cells by OX40-ligand expressed on dendritic cells leads to the accumulation of CD4 T cells in B follicles. Eur J Immunol. 1999;29:1610-16.

Bryant VL, Ma CS, Avery DT, Li Y, Good KL, Corcoran LM, de Waal Malefyt R, Tangye SG. Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5⁺ T follicular helper cells. J Immunol. 2007;179(12):8180-90.

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

Calderhead DM, Buhlmann JE, van den Eertwegh AJ, Claassen E, Noelle RJ, Fell HP. Cloning of mouse Ox40: a T cell activation marker that may mediate T-B cell interactions. J Immunol. 1993;151:5261-71.

Carroll MC. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. Annu Rev Immunol. 1998;16:545-68.

Casola S, Otipoby KL, Alimzhanov M, Humme S, Uyttersprot N, Kutok JL, Carroll MC, Rajewsky K. B cell receptor signal strength determines B cell fate. Nat Immunol. 2004;5:317-27.

Castillo-Méndez SI, Zago CA, Sardinha LR, Freitas do Rosário AP, Alvarez 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(2-3):309-19.

Cavinato RA, Bastos KR, Sardinha LR, Elias RM, Alvarez JM, D'imperio Lima MR. Susceptibility of the different developmental stages of the asexual (schizogonic) erythrocyte cycle of *Plasmodium chabaudi chabaudi* to hyperimmune serum, immunoglobulin (Ig) G1, IgG2a and F (ab')₂ fragments. Parasite Immunol. 2001;23:587-97.

Chen Y, Park YB, Patel E, Silverman GJ. IgM antibodies to apoptosis-associated determinants recruit C1q and enhance dendritic cell phagocytosis of apoptotic cells. *J Immunol.* 2009;182(10):6031-43.

Chen AI, McAdam AJ, Buhlmann JE, Scott S, Lupher ML Jr, Greenfield EA, Baum PR, Fanslow WC, Calderhead DM, Freeman GJ, Sharpe AH. OX40 ligand has a critical costimulatory role in dendritic cell: T cell interactions. *Immunity.* 1999;11(6):689-98.

Chtanova T, Tangye SG, Newton R, Frank N, Hodge MR, Rolph MS, Mackay CR. T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *J Immunol.* 2004;173(1):68-78.

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

Clark IA, Schofield L. Pathogenesis of malaria. *Parasitol Today.* 2000;16(10):451-4.

Clynes R, Ravetch JV. Cytotoxic antibodies trigger inflammation through Fc receptors. *Immunity.* 1995;3(1):21-6.

Coutelier JP, Johnston SJ, El Idrissi M el-A, Pfau CJ. Involvement of CD4⁺ cells in lymphocytic choriomeningitis virus-induced autoimmune anaemia and hypergammaglobulinaemia. *J Autoimmun.* 1994;7(5):589-99.

Coutinho A, Moller G. Immune activation of B cells: evidence for "one non-specific triggering signal" not delivered by the Ig receptors. *Boll Ist Sieroter Milan.* 1974;53:131-43.

Cox J, Semoff S, Hommel M. *Plasmodium chabaudi*: a rodent malaria model for *in vivo* and *in vitro* cytoadherence of malaria parasites in the absence of knobs. *Parasite Immunol.* 1987;9(5):543-61.

Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nature Immunol.* 2001;2:203-9.

Coyle AJ, Lehar S, Lloyd C, Tian J, Delaney T, Manning S, Nguyen T, Burwell T, Schneider H, Gonzalo JA, Gosselin M, Owen LR, Rudd CE, Gutierrez-Ramos JC. The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity*. 2000;13:95-105.

Crotty S, Kersh EN, Cannons J, Schwartzberg PL, Ahmed R. SAP is required for generating long-term humoral immunity. *Nature*. 2003;421:282-7.

Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony O, Tarkowski A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):109-21.

Daniel-Ribeiro C, De Oliveira-Ferreira J, Banic DM, Galvao-Castro B. Can malaria-associated polyclonal B-lymphocyte activation interfere with the development of anti sporozoite specific immunity? *Trans R. Soc Trop Med Hyg*. 1989;3:289-92.

De Paoli P, Basaglia G, Gennari D, Crovatto M, Modolo ML, Santini G. Phenotypic profile and functional characteristics of human gamma and delta T cells during acute toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 1992;30(3):729-31.

Dong C, Juedes AE, Temann UA, Shresta S, Allison JP, Ruddle NH, Flavell RA. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature*. 2001;409:97-101.

Dubois P, Pereira Da Silva L. Towards a vaccine against asexual blood stage infection by *Plasmodium falciparum*. *Res Immunol*. 1995;146:263-75.

D'império Lima MR, Alvarez JM, Furtado GC, Kipnis TL, Coutinho A, Minóprio P. Ig-isotype patterns of primary and secondary responses to *Plasmodium chabaudi chabaudi* correlate with IFN- γ and IL-4 cytokine production and with CD45RB expression by CD4⁺ spleen cells. *Scand J Immunol*. 1996;43:263-70.

D'Império Lima MR, Bandeira A, Falanga P, Freitas AA, Kipnis TL, Pereira Da Silva L, Coutinho A. Clonal analysis of B lymphocyte responses to *Plasmodium chabaudi* infection of normal and immunoprotected mice. *Int Immunol*. 1991;3:1207-16.

Ehrenstein MR, Notley CA. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(11):778-86.

Ehrenstein MR, O'Keefe TL, Davies SL, Neuberger MS. Targeted gene disruption reveals a role for natural secretory IgM in the maturation of the primary immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(17):10089-93.

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

Fairhurst RM, Wang CX, Sieling PA, Modlin RL, Braun J. CD1-restricted T cells and resistance to polysaccharide-encapsulated bacteria. *Immunol Today*. 1998;19:257-9.

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

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

Fazilleau N, Mark L, McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity*. 2009;30:324-35.

Ferguson AR, Youd ME, Corley RB. Marginal zone B cells transport and deposit IgM-containing immune complexes onto follicular dendritic cells. *Int Immunol*. 2004;16:1411-22.

Ferguson SE, Han S, Kelsoe G, Thompson CB. CD28 is required for germinal center formation. *J Immunol*. 1996;156:4576-81.

Ferreira MU, Kimura EA, De Souza JM, Katzin AM. The isotype composition and avidity of naturally acquired anti-*Plasmodium falciparum* antibodies: differential patterns in clinically immune africans and amazonian patients. *Am J Trop Med Hyg*. 1996;55(3):315-23.

Flynn S, Toellner KM, Raykundalia C, Goodall M, Lane P. CD4 T cell cytokine differentiation: the B cell activation molecule, OX40 ligand, instructs CD4 T cells to express IL-4 and upregulates expression of the chemokine receptor, BLr-1. *J Exp Med*. 1998;188(2):297-304.

Franklin BS, Parroche P, Ataíde MA, Lauw F, Ropert C, de Oliveira RB, Pereira D, Tada MS, Nogueira P, da Silva LH, Bjorkbacka H, Golenbock DT, Gazzinelli RT. Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of toll-like receptor expression and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(14):5789-94.

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

Fridman WH, Teillaud JL, Bouchard C, Teillaud C, Astier A, Tartour E, Galon J, Mathiot C, Sautès C. Soluble Fc gamma receptors. *J Leukoc Biol*. 1993;54(5):504-12.

Früh K, Doumbo O, Müller HM, Koita O, McBride J, Crisanti A, Touré Y, Bujard H. Human antibody response to the major merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum* is strain specific and short-lived. *Infect Immun*. 1991;59(4):1319-24.

Giha HA, Staalsoe T, Dodoo D, Roper C, Satti GM, Arnot DE, Hviid L, Theander TG. Antibodies to variable *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte surface antigens are associated with protection from novel malaria infections. *Immunol Lett*. 2000;71:117-26.

Gobet R, Cerny A, Ruedi E, Hengartner H, Zinkernagel RM. The role of antibodies in natural and acquired resistance of mice to vesicular stomatitis. virus. *Exp Cell Biol*. 1988;56:175–80.

Gramaglia I, Jember A, Pippig SD, Weinberg AD, Killeen N, Croft M. The OX40 costimulatory receptor determines the development of CD4 memory by regulating primary clonal expansion. *J Immunol*. 2000;165:3043-50.

Gramaglia I, Weinberg AD, Lemon M, Croft M. OX40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. *J Immunol*. 1998;161:6510-7.

Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Drager R, Eibel H, Fischer B, Schaffer AA, Mages HW, Kroczeck RA, Peter HH. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol*. 2003;4(3):261-8.

Hawkes M, Li X, Crockett M, Diassiti A, Liles WC, Liu J, Kain KC. Malaria exacerbates experimental mycobacterial infection *in vitro* and *in vivo*. *Microbes and Infection*. 2010;12:864-74.

Haynes NM, Allen CD, Lesley R, Ansel KM, Killeen N, Cyster JG. Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1 high germinal center-associated subpopulation. *J Immunol*. 2007;179:5099-108.

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

Ho M, Tongtawe P, Kriangkum J, Wimonwattrawatee T, Pattanapanyasat K, Bryant L, Shafiq J, Suntharsamai P, Looareesuwan S, Webster HK, Elliott JF. Polyclonal expansion of peripheral gamma delta T cells in human *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun*. 1994;62(3):855-62.

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

Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, Kroczeck RA. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*. 1999;397:263-6.

Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004;5:987-95.

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

Jefferis R. Glycosylation of natural and recombinant antibody molecules. *Adv Exp Med Biol*. 2005;564:143-8.

Jefferis R, Lund J. Interaction sites on human IgG-Fc for FcγR: current models. *Immunol Lett*. 2002;82(1-2):57-65.

Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science*. 2006;313(5787):670-3.

Kawabe T, Naka T, Yoshida K, Tanaka T, Fujiwara H, Suematsu S, Yoshida N, Kishimoto T, Kikutani H. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity*. 1994;1(3):167-78.

King C, Tangye SG, Mackay CR. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:741-66.

Kitayama D, Sakamoto A, Arima M, Hatano M, Miyazaki M, Tokuhisa T. A role for Bcl6 in sequential class switch recombination to IgE in B cells stimulated with IL-4 and IL-21. *Molec Immunol*. 2008;45:1337-45.

Kopf M, Ruedl C, Schmitz N, Gallimore A, Lefrang K, Ecabert B, Odermatt B, Bachmann MF. OX40-deficient mice are defective in TH cell proliferation but are competent in generating B cell and CTL responses after virus infection. *Immunity*. 1999;11(6):699-708.

Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*. 1995;374:546-9.

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

Kuchen S, Robbins R, Sims GP, Sheng C, Phillips TM, Lipsky PE, Ettinger R. Essential role of IL-21 in B cell activation, expansion, and plasma cell generation during CD4⁺ T cell-B cell collaboration. *J Immunol*. 2007;179:5886-96.

Lane P, Traunecker A, Hubele S, Inui S, Lanzavecchia A, Gray D. Activated human T cells express a ligand for the human B cell-associated antigen CD40 which participates in T cell-dependent activation of B lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1992;22(10):2573-8.

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

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

Lanzavecchia A, Lezzi G, Viola A. From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell*. 1999;96(1):1-4.

Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:233-58.

Lim HW, Kim CH. Loss of IL-7 Receptor alpha on CD4⁺ T cells defines terminally differentiated B cell-helping effector T cells in a B cell-rich lymphoid tissue. *J Immunol*. 2007;179:7448-56.

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

Mak TW, Shahinian A, Yoshinaga SK, Wakeham A, Boucher LM, Pintilie M, Duncan G, Gajewska BU, Gronski M, Eriksson U, Odermatt B, Ho A, Bouchard D, Whorisky JS, Jordana M, Ohashi PS, Pawson T, Bladt F, Tafuri A. Costimulation through the inducible costimulator ligand is essential for both T helper and B cell functions in T cell-dependent B cell responses. *Nat Immunol*. 2003;4:765-72.

Malherbe L, Mark L, Fazilleau N, McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Vaccine adjuvants alter TCR-based selection threshold. *Immunity*. 2008;28:698-709.

Marsh K, Kinyanjui S. Immune effector mechanism in malaria. *Parasitic Immunol*. 2006; 28:51-60.

Martin F, Kearney JF. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:323-35.

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

Maxwell JR, Weinberg A, Prell RA, Vella AT. Danger and OX40 receptor signaling synergize to enhance memory T cell survival by inhibiting peripheral deletion. *J Immunol.* 2000;164:107-12.

McAdam AJ, Chang TT, Lumelsky AE, Greenfield EA, Boussiotis VA, Duke-Cohan JS, Chernova T, Malenkovich N, Jabs C, Kuchroo VK, Ling V, Collins M, Sharpe AH, Freeman GJ. Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4⁺ T cells. *J Immunol.* 2000;165(9):5035-40.

McAdam AJ, Greenwald RJ, Levin MA, Chernova T, Malenkovich N, Ling V, Freeman GJ, Sharpe AH. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature.* 2001;409:102-5.

McAdam AJ, Schweitzer NA, Sharpe AH. The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Immunol Rev.* 1998;165: 231-247.

McHeyzer-Williams LJ, Pelletier N, Mark L, Fazilleau N, McHeyzer-Williams MG. Follicular helper T cells as cognate regulators of B cell immunity. *Curr Opin Immunol.* 2009;21(3):266-73.

Miller LH, Good MF, Milon G. Malaria pathogenesis. *Science.* 1994;264:1878-83.

Mills DM, Cambier JC. B lymphocyte activation during cognate interactions with CD4⁺ T lymphocytes: molecular dynamics and immunologic consequences. *Semin Immunol.* 2003; 15:325-9.

Minoprio P, Eisen H, Joskowicz M, Pereira P, Coutinho A. Suppression of polyclonal antibody production in *Trypanosoma cruzi*-infected mice by treatment with anti-L3T4 antibodies. *J Immunol.* 1987;139(2):545-50.

Minoprio P. Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches? *Int J Parasitol.* 2001;31(5-6):588-91.

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

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

Montes CL, Acosta-Rodríguez EV, Mucci J, Zuniga EI, Campetella O, Gruppi A. A *Trypanosoma cruzi* antigen signals CD11b⁺ cells to secrete cytokines that promote polyclonal B cell proliferation and differentiation into antibody-secreting cells. Eur J Immunol. 2006;36(6):1474-85.

Montes CL, Vottero-Cima E, Gruppi A. *Trypanosoma cruzi* cytosolic alkaline antigens (FI) induce polyclonal activation in murine normal B cells. Scand J Immunol. 1996;44(2):93-100.

Montes CL, Zuñiga E, Minoprio P, Vottero-Cima E, Gruppi A. A *Trypanosoma cruzi* alkaline antigen induces polyclonal B-cell activation of normal murine spleen cells by T-cell-independent, BCR-directed stimulation. Scand J Immunol. 1999;50(2):159-66.

Montes CL, Zuñiga EI, Vazquez J, Arce C, Gruppi A. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial malate dehydrogenase triggers polyclonal B-cell activation. Clin Exp Immunol. 2002;127(1):27-36.

Mota MM, Brown KN, Holder AA, Jarra W. Acute *Plasmodium chabaudi chabaudi* malaria infection induces antibodies which bind to the surfaces of parasitized erythrocytes and promote their phagocytosis by macrophages in vitro. Infect Immun. 1998;66:4080-6.

Munk ME, Fazioli RA, Calich VL, Kaufmann SH. Paracoccidioides brasiliensis-stimulated human gamma/delta T cells support antibody production by B cells. Infect Immun. 1995;63(4):1608-10.

Murata K, Ishii N, Takano H, Miura S, Ndhlovu LC, Nose M, Noda T, Sugamura K. Impairment of antigen-presenting cell function in mice lacking expression of OX40 ligand. J Exp Med. 2000;191:365-74.

Muxel SM, Freitas do Rosário AP, Sardinha LR, Castillo-Méndez SI, Zago CA, Rodriguez-Málaga SM, Alvarez Mosig JM, D'Império Lima MR. 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.

Muxel SM, Freitas do Rosário AP, Sardinha LR, Zago CA, Castillo-Méndez SI, Rodriguez-Málaga SM, Alvarez Mosig JM, D'Império Lima MR. The spleen CD4⁺ T

cell response to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria develops in two phases characterized by different properties. 2011. In press.

Naik RS, Branch OH, Woods AS, Vijaykumar M, Perkins DJ, Nahlen BL, Lal AA, Cotter RJ, Costello CE, Ockenhouse CF, Davidson EA, Gowda DC. Glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*: molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis. J Exp Med. 2000;192(11):1563-76.

Nashar TO, Hirst TR, Williams NA. Modulation of B-cell activation by the B subunit of Escherichia coli enterotoxin: receptor interaction up-regulates MHC class II, B7, CD40, CD25 and ICAM-1. Immunology. 1997;91(4):572-8.

Nimmerjahn F, Ravetch JV. Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. Science. 2005;310(5753):1510-2.

Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcgamma receptors: old friends and new family members. Immunity. 2006;24(1):19-28.

Noelle RJ, Roy M, Shepherd DM, Stamenkovic I, Ledbetter JA, Aruffo A. A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Jul 15;89(14):6550-4.

Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L, Wang YH, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q, Dong C. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1,2, or 17 cell lineages. Immunity. 2008;29(1):138-49.

Ochsenbein AF, Fehr T, Lutz C, Suter M, Brombacher F, Hengartner H, Zinkernagel RM. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. Science. 1999;286(5447):2156-9.

Odegard JM, Marks BR, DiPlacido LD, Poholek AC, Kono DH, Dong C, Flavell RA, Craft J. ICOS-dependent extrafollicular helper T cells elicit IgG production via IL-21 in systemic autoimmunity. J Exp Med. 2008;205(12):2873-86.

Ogden CA, Kowalewski R, Peng Y, Montenegro V, Elkon KB. IgM is required for efficient complement mediated phagocytosis of apoptotic cells in vivo. Autoimmunity. 2005;38(4):259-64.

Ohshima Y, Tanaka Y, Tozawa H, Takahashi Y, Maliszewski C, Delespesse G. Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells. *J Immunol.* 1997;159:3838-48.

Oliver, A., F. Martin, R. Gartland, H. Carter, and J. F. Kearney. Marginal zone B cells exhibit unique activation proliferative and immunoglobulin secretory responses. *Eur J Immunol.* 1997;27(9):2366-74.

Oliver AM, Martin F, Kearney JF. IgM^{high}CD21^{high} lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J Immunol.* 1999;162(12):7198-207.

Okkenhaug K, Wu L, Garza KM, La Rose J, Khoo W, Odermatt B, Mak TW, Ohashi PS, Rottapel R. A point mutation in CD28 distinguishes proliferative signals from survival signals. *Nat Immunol.* 2001;2:325-32.

Owusu-Agyei S, Koram KA, Baird JK, Utz GC, Binka FN, Nkrumah FK, Fryauff DJ, Hoffman SL. Incidence of symptomatic and asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection following curative therapy in adult residents of northern Ghana. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65(3):197-203.

Ozaki K, Spolski R, Ettinger R, Kim HP, Wang G, Qi CF, Hwu P, Shaffer DJ, Akilesh S, Roopenian DC, Morse HC 3rd, Lipsky PE, Leonard WJ. Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J Immunol.* 2004;173:5361-71.

Page KR, Jedlicka AE, Fakheri B, Noland GS, Kesavan AK, Scott AL, Kumar N, Manabe YC. Mycobacterium-induced potentiation of type 1 immune responses and protection against malaria are host specific. *Infect. Immun.* 2005;73:8369-880.

Pan American Health Organization. Malaria in the Americas: time series epidemiological data from 2000 to 2007. 2008. Available from: <http://www.paho.org/Project.asp?SEL=TP&LNG=ENG&ID=55>. [2010 Apr 20].

Parker DC. The functions of antigen recognition in T cell-dependent B cell activation. *Semin Immunol.* 1993;5:413-20.

Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, Latz E, Monks BG, Visintin A, Halmen KA, Lamphier M, Olivier M, Bartholomeu DC, Gazzinelli RT, Golenbock DT. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(6):1919-24.

Pippig SD, Peña-Rossi C, Long J, Godfrey WR, Fowell DJ, Reiner SL, Birkeland ML, Locksley RM, Barclay AN, Killeen N. Robust B cell immunity but impaired T cell proliferation in the absence of CD134 (OX40). *J Immunol.* 1999;163(12):6520-9.

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

Pozdnyakova O, Guttormsen HK, Lalani FN, Carroll MC, Kasper DL. Impaired antibody response to group B streptococcal type III capsular polysaccharide in C3- and complement receptor 2-deficient mice. *J Immunol.* 2003;170(1):84-90.

Qi H, Cannons JL, Klauschen F, Schwartzberg PL, Germain RN. SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal center formation. *Nature.* 2008 ;455:764-9.

Quartier P, Potter PK, Ehrenstein MR, Walport MJ, Botto M. Predominant role of IgM-dependent activation of the classical pathway in the clearance of dying cells by murine bone marrow-derived macrophages in vitro. *Eur J Immunol.* 2005;35(1):252-60.

Quigley MF, Gonzalez VD, Granath A, Andersson J, Sandberg JK. CXCR5⁺CCR7⁻ CD8 T cells are early effector memory cells that infiltrate tonsil B cell follicles. *Eur J Immunol.* 2007;37:3352-62.

Ramos OP, Silva EE, Falcão DP, de Medeiros BM. Production of autoantibodies associated with polyclonal activation in *Yersinia enterocolitica* O: 8-infected mice. *Microbiol Immunol.* 2005;49(2):129-37.

Rasheed AU, Rahn HP, Sallusto F, Lipp M, Müller G. Follicular B helper T cell activity is confined to CXCR5(hi)ICOS(hi) CD4 T cells and is independent of CD57 expression. *Eur J Immunol.* 2006;36(7):1892-903.

Reina-San-Martin B, Degraeve W, Rougeot C, Cosson A, Chamond N, Cordeiro-Da-Silva A, Arala-Chaves M, Coutinho A, Minoprio P. A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. *Nat Med.* 2000;6(8):890-7.

Reinhardt RL, Liang HE, Locksley RM. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat Immunol.* 2009;10(4):385-93.

Riley JL, Blair PJ, Musser JT, Abe R, Tezuka K, Tsuji T, June CH. ICOS costimulation requires IL-2 and can be prevented by CTLA-4 engagement. *J Immunol*. 2001;166(8):4943-8.

Rogers PR, Song J, Gramaglia I, Killeen N, Croft M. OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long term survival of CD4 T cell. *Immunity*. 2001;15:445-55.

Roll Back Malaria. What is malaria? 2010. Available from: <http://www.rbm.who.int/malariaMessages.html>. [2010 Dez 06].

Roozendaal R, Carroll MC. Complement receptors CD21 and CD35 in humoral immunity. *Immunol Rev*. 2007;219:157-66.

Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, Attanath P, Bouharoun-Tayoun H, Chantavanich P, Foucault C, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 1991;45(3):297-308.

Sanchez-Torres L, Rodriguez-Ropon A, Aguilar-Medina M, Favila-Castillo L. Mouse splenic CD4⁺ and CD8⁺ T cells undergo extensive apoptosis during a *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS infection. *Parasite Immunol*. 2001;23(12):617-26.

Sardinha LR, D'Império Lima MR, Alvarez JM. Influence of the polyclonal activation induced by *Plasmodium chabaudi* on ongoing OVA-specific B- and T-cell responses. *Scand. J Immunol*. 2002;56(4):408-16.

Schofield L, Hackett F. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J Exp Med*. 1993;177(1):145-53.

Schofield L, Villaquiran J, Ferreira A, Schellekens H, Nussenzweig R, Nussenzweig V. Gamma interferon, CD8⁺ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature*. 1987;330(6149):664-6.

Schwartzberg PL, Mueller KL, Qi H, Cannons JL. SLAM receptors and SAP influence lymphocyte interactions, development and function. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(1):39-46.

Sedgwick JD, Holt PG. The ELISA-plaque assay for the detection and enumeration of antibody-secreting cells. An overview. *J Immunol Methods*. 1983; 87(1): 37-44.

Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP, Kündig TM, Kishihara K, Wakeham A, Kawai K, Ohashi PS, Thompson CB, Mak TW. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science*. 1993;261:609-12.

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

Silva EE, Ramos OP, Bauab TM, Falcão DP, de Medeiros BM. *Yersinia enterocolitica* O:3 isolated from patients with or without reactive arthritis induces polyclonal activation of B cells and autoantibody production in vivo. *Autoimmunity*. 2003;36(5):261-8.

Silva SR, Casabuono A, Jacysyn JF, Favoretto BC, Fernandes I, Macedo MS, Couto AS, Faquim-Mauro EL. Sialic acid residues are essential for the anaphylactic activity of murine IgG1 antibodies. *J Immunol*. 2008;181(12):8308-14.

Smith KM, Brewer JM, Webb P, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos C, Garside P. Inducible costimulatory molecule-B7-related protein 1 interactions are important for the clonal expansion and B cell helper functions of naïve, Th1, and Th2 T cells. *J Immunol*. 2003;170:2310-5.

Song H, Cerny J. Functional heterogeneity of marginal zone B cells revealed by their ability to generate both early antibody-forming cells and germinal centers with hypermutation and memory in response to a T-dependent antigen. *J Exp Med*. 2003;198(12):1923-35.

Spencer J, Perry ME, Dunn-Walters DK.. Human marginal-zone B cells. *Immunol Today*. 1998;19:421-26.

Stevenson PG, Doherty PC. Non-antigen-specific B-cell activation following murine gammaherpesvirus infection is CD4 independent in vitro but CD4 dependent in vivo. *J Virol*. 1999 Feb;73(2):1075-9.

Stüber E, Strober W. The T cell–B cell interaction via OX40–OX40L is necessary for the T cell–dependent humoral immune response. *J. Exp. Med*. 1996;183:979–89.

Suh W, Tafuri A, Berg-Brown NN, Shahinian A, Plyte S, Duncan GS, Okada H, Wakeham A, Odermatt B, Ohashi PM, Mak TW. The inducible costimulator plays the major costimulatory role in humoral immune responses in the absence of CD28. *J Immunol.* 2004; 172:5917-23.

Tafuri A, Shahinian A, Bladt F, Yoshinaga SK, Jordana M, Wakeham A, Boucher LM, Bouchard D, Chan VS, Duncan G, Odermatt B, Ho A, Itie A, Horan T, Whoriskey JS, Pawson T, Penninger JM, Ohashi PS, Mak TW. ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature.* 2001;409:105-9.

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:335-76.

Thurnheer MC, Zuercher AW, Cebra JJ, Bos NA. B1 cells contribute to serum IgM, but not to intestinal IgA, production in gnotobiotic Ig allotype chimeric mice. *J Immunol.* 2003;170(9):4564-71.

Timens W, Boes A, Poppema S. Human marginal zone B cells are not an activated B cell subset: strong expression of CD21 as a putative mediator for rapid B cell activation. *Eur J Immunol.* 1989;19:2163-6.

Van den Eertwegh AJ, Noelle RJ, Roy M, Shepherd DM, Aruffo A, Ledbetter JA, Boersma WJ, Claassen E. In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. I. In vivo expression of CD40 ligand, cytokines, and antibody production delineates sites of cognate T-B cell interactions. *J Exp Med.* 1993;178(5):1555-65.

Van Der Heyde HC, Elloso MM, Chang WL, Kaplan M, Manning DD, Weidanz WP. Gamma delta T cells function in cell-mediated immunity to acute blood-stage *Plasmodium chabaudi adami* malaria. *J Immunol.* 1995;154:3985-90.

Vinuesa CG, Tangye SG, Moser B, Mackay CR. Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:853-65.

Vogelzang A, McGuire HM, Yu D, Sprent J, Mackay CR, King C. A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells. *Immunity.* 2008;29(1):127-37.

Waldschmidt TJ. Cytokine Regulation of Humoral Immunity: Basic and Clinical aspects. New York: Wiley; 1996. *B-cell subpopulations and microenvironments*; p. 73.

Walker LS, Gulbranson-Judge A, Flynn S, Brocker T, Raykundalia C, Goodall M, Förster R, Lipp M, Lane P. Compromised OX40 function in CD28-deficient mice is linked with failure to develop CXC chemokine receptor 5-positive CD4 cells and germinal centers. *J Exp Med*. 1999;190(8):1115-22.

Weiss GE, Traore B, Kayentao K, Ongoiba A, Doumbo S, Doumtabe D, Kone Y, Dia S, Guindo A, Traore A, Huang CY, Miura K, Mircetic M, Li S, Baughman A, Narum DL, Miller LH, Doumbo OK, Pierce SK, Crompton PD. *The Plasmodium falciparum*-specific human memory B cell compartment expands gradually with repeated malaria infections. *PLoS Pathog*. 2010;6(5):e1000912.

Weller S, Braun MC, Tan BK, Rosenwald A, Cordier C, Conley ME, Plebani A, Kumararatne DS, Bonnet D, Tournilhac O, Tchernia G, Steiniger B, Staudt LM, Casanova JL, Reynaud CA, Weill JC. Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood*. 2004;104:3647-54.

Whipple EC, Shanahan RS, Ditto AH, Taylor RP, Lindorfer MA. Analyses of the *in vivo* trafficking of stoichiometric doses of an anti-complement receptor 1/2 monoclonal antibody infused intravenously in mice. *J Immunol* 2004;173:2297-2306.

Wipasa J, Elliott S, Xu H, Good MF. Immunity to asexual blood stage malaria and vaccine approaches. *Immunol Cell Biol*. 2002; 80(5):401–14.

Wipasa J, Suphavitai C, Okell LC, Cook J, Corran PH, Thaikla K, Liwisaee W, Riley EM, Hafalla JC. Long-lived antibody and B Cell memory responses to the human malaria parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *PLoS Pathog*. 2010 Feb 19;6(2):e1000770.

Won WJ, Kearney JF. CD9 is a unique marker for marginal zone B cells, B1 cells, and plasma cells in mice. *J Immunol*. 2002;168:5605-11.

World Health Organization (WHO). Portal WHO World Malaria Report. 2009 Available from: http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2009/en/index.html. [2010 Dez 06].

Zuñiga E, Motran C, Montes CL, Diaz FL, Bocco JL, Gruppi A. *Trypanosoma cruzi*-induced immunosuppression: B cells undergo spontaneous apoptosis and lipopolysaccharide (LPS) arrests their proliferation during acute infection. *Clin Exp Immunol*. 2000;119(3):507-15.