

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

Maria Luiza Mundim Porto Pedrosa

**ANÁLISE EM ALTA DIMENSÃO DO DESENVOLVIMENTO IMUNE
ESPLÊNICO PÓS-NATAL UTILIZANDO UMA NOVA TÉCNICA DE
MICROSCOPIA CONFOCAL 7 CANAIS**

Belo Horizonte

2022

Maria Luiza Mundim Porto Pedrosa

**ANÁLISE EM ALTA DIMENSÃO DO DESENVOLVIMENTO IMUNE
ESPLÊNICO PÓS-NATAL UTILIZANDO UMA NOVA TÉCNICA DE
MICROSCOPIA CONFOCAL 7 CANAIS**

Versão final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes

Belo Horizonte

2022

043

Pedrosa, Maria Luiza Mundim Porto.

Análise em alta dimensão do desenvolvimento imune esplênico pós-natal utilizando uma nova técnica de microscopia confocal 7 canais [manuscrito] / Maria Luiza Mundim Porto Pedrosa. – 2022.

78 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Baço. 3. Leucócitos. 4. Sistema Imunitário. I. Menezes, Gustavo Batista de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado DE MARIA LUIZA MUNDIM PORTO PEDROSA. Aos trinta dias do mês de agosto de 2022 às 13:00 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Teams”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Análise em alta dimensão do desenvolvimento imune esplênico pós-natal utilizando uma nova técnica de microscopia confocal 7 canais ", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Gustavo Batista de Menezes, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Erika Cristina Jorge (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Leda Quercia Vieira (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Gustavo Batista de Menezes - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA

REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 30 de agosto de 2022.

Dra. Erika Cristina Jorge (UFMG)

Dra. Leda Quercia Vieira (UFMG)

Dr. Gustavo Batista de Menezes - Orientador (UFMG)

Este trabalho foi realizado no Center for Gastrointestinal Biology, do Departamento de Morfologia, localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Contamos com o apoio financeiro das agências CAPES, FAPEMIG e CNPq.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos, pelo incentivo, amor e apoio incondicionais. Obrigada, pai, meu exemplo de pessoa e profissional, por trabalhar tão arduamente afim de prover o melhor para nossa família, e por estar sempre presente. Obrigada, mãe, pelo amor sem limites, pelo suporte e por ser a minha grande companheira. Vocês são a razão de tudo!

Ao Rodolfo, pelo companheirismo, parceria, amizade, carinho, amor e incentivo; nos bons momentos e nos momentos críticos. Obrigada por me abrir os olhos para as coisas que realmente importam nessa vida!

Ao Gustavo, pela oportunidade, confiança, pelos aprendizados e orientação. Obrigado pelos desafios que propiciaram meu crescimento e por acreditar tanto em mim.

A todo o pessoal do CGB – grupo de excelência –, pelo aprendizado, coleguismo, ajuda nos experimentos e pelos momentos vividos dentro e fora do laboratório.

À Camila, Brenda, Kassi, Mateus e Ariane por todo o suporte, ajuda, paciência e por me ensinarem tanto ao longo destes dois anos. Vocês se tornaram meus grandes amigos!

À Cris, por todo o trabalho que realiza no laboratório de forma tão primorosa, por estar sempre disponível e apta a ajudar, e pelo vínculo de amizade e confiança que construímos.

Ao André Oliveira, pela ajuda e colaboração.

À BD Biosciences pelagrande parceria e por prover os reagentes que propiciaram o desenvolvimento deste projeto de mestrado.

Finalmente, obrigada a todos que de alguma forma contribuíram de maneira direta ou indireta para que este trabalho fosse concluído, e para que esta etapa fosse encerrada da melhor maneira possível.

RESUMO

O baço é fundamental para a vigilância imunológica, atuando como uma linha de defesa para antígenos e parasitos que se espalham pelo sangue. Caracterizado como um órgão multifuncional, bastante singular e complexo, apresentando uma estrutura bem compartimentalizada e diferente dos demais órgãos linfoides, o baço integra as imunidades inata e adaptativa em um nível altamente organizado, além de manter a homeostase sanguínea. Cada região do órgão possui tipos celulares específicos, assim como funções e estruturas distintas. O desenvolvimento embrionário esplênico é conhecido e bem caracterizado. No entanto, o baço não está completamente desenvolvido no nascimento e o processo de organização do tecido é resultado de processos dinâmicos mantidos ao longo de toda a vida do indivíduo. E, as mudanças decorrentes deste processo, e suas particularidades, ainda não foram totalmente compreendidas no contexto esplênico até os dias atuais. Logo, o objetivo desse trabalho foi estudar a dinâmica dos leucócitos do baço no período pós-natal e como eles se organizam e interagem espacialmente *in vivo*. Para isso, usamos uma nova combinação de anticorpos selecionados e fluoróforos para criar imagens do ambiente imunológico do baço, descrevendo pela primeira vez a dinâmica do desenvolvimento imune em três fases de vida distintas: neonatal, infantil e adulta. Observamos um aumento expressivo no número de leucócitos totais no baço entre a 1ª e a 8ª semanas de vida; mais especificamente um aumento de 6 vezes. Também constatamos que a população de células B se caracteriza como a maior população celular imune no ambiente esplênico em todas as idades estudadas, permanecendo proporcionalmente estável ao longo da vida. A população de células T, por sua vez, apresenta um aumento significativo em sua frequência. Ainda, detectamos que a composição celular e a distribuição dos leucócitos esplênicos é bastante distinta nos neonatos, e bastante similar entre os infantes e adultos. Além disso, revelamos como as infecções – usando um modelo de malária – podem alterar o perfil imune e a organização celular do baço em adultos e infantes, o que pode ajudar no entendimento dos diferentes graus de gravidade da infecção. Este novo protocolo de microscopia pode, portanto, ser extremamente útil para diferentes grupos de pesquisa biológica, possibilitando o advento de novas abordagens, assim como avanços no campo dos estudos intravitalis.

Palavras-chave: baço, desenvolvimento esplênico pós-natal, células imunes, malária, microscopia confocal.

ABSTRACT

The spleen is a unique secondary lymphoid organ that presents many important functions in immunity and blood homeostasis. Splenic architecture and its multicellular composition allow for blood surveillance and facilitate interactions between antigen-presenting cells (APCs) and lymphocytes, integrating innate and adaptive immune responses in an organized way. The spleen hosts all subtypes of leukocytes, including myeloid and lymphoid cells. These cells are key protectors of the organism because they identify blood borne pathogens and cellular stress, remove dying cells and foreign material, regulate tissue homeostasis and inflammatory responses, and shape adaptive immunity during postnatal development. Additionally, they can be key players in different parasitic diseases, such as bacterial and protozoan infections. However, how spleen leukocytes evolve across the developmental phase, and how they spatially organize and interact *in vivo* is still poorly understood. Using a novel and unique combination of high dimensional intravital microscopy, here we revealed how the splenic immune system evolves during life, describing the main immunologic changes during postnatal development. We observed a significant increase in the number of total leukocytes in the spleen between the 1st and 8th weeks of life; more specifically a 6-fold magnification. We also found that the B cell population is characterized as the largest immune cell population in the splenic environment at all ages studied, remaining proportionally stable throughout life. The T cell population, in turn, shows a significant increase in its frequency. Furthermore, we detected that the cellular composition and distribution of splenic leukocytes is quite different in neonates, and quite similar between infants and adults. Also, we exhibited how infections – using a model of malaria - might change the spleen immune profile in adults and infants, which could become the key to understanding different severity grades of infection. Therefore, we laid the foundations for future studies aiming to image cells under their native environment, developing not only a novel panel of seven different fluorophores that works *in vivo*, but also all the paths to use conventional confocal microscopes to work as multi-channel imaging platforms. Our new imaging solutions can be extremely useful for different groups in all areas of biological investigation, paving the way for new intravital approaches and advances.

Keywords: spleen, postnatal splenic development, immune cells, malaria, confocal microscopy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1	Estrutura e organização do baço.....	16
Ilustração 2	Ciclo do <i>Plasmodium spp</i>	20
Ilustração 3	Alterações na estrutura esplênica ao longo da infecção malárica	22
Ilustração 4	Painel de fluoróforos da família dos Brilliant Violets (BVs)	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	“Setting” de configuração do microscópio	32
Figura 2	Diagrama do protocolo criado.....	33
Figura 3	Visualização <i>in vivo</i> de sete tipos distintos de leucócitos no baço ao longo do desenvolvimento	35
Figura 4	Estrutura vascular esplênica ao longo da vida.....	36
Figura 5	Distribuição das células imunes de linhagem mieloide no baço durante o desenvolvimento.....	39
Figura 6.	Distribuição das células imunes de linhagem linfoide no baço durante o desenvolvimento.....	40
Figura 7	Composição celular imune do baço em três fases distintas da vida	41
Figura 8	Perfil imune esplênico em cada fase da vida.....	44
Figura 9	Dinâmica das populações celulares agrupadas pela linhagem celular ...	44
Figura 10	Análise, por citometria de fluxo, das populações celulares imunes do baço em três fases distintas da vida.....	47
Figura 11	Susceptibilidade de camundongos infantês à infecção pelo <i>Plasmodium chabaudi</i>	50
Figura 12	Perturbações no perfil celular mieloide do baço em decorrência do quadro infeccioso.	52
Figura 13	Perturbações no compartimento celular linfoide do baço em decorrência da infecção.....	53
Figura 14	Comparação do perfil celular do baço em decorrência da infecção parasitária.....	54
Figura 15	Modificações nas populações de leucócitos induzidas pela malária.....	55
Figura 16	Áreas lesionadas do baço de camundongos infectados.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Painel de anticorpos conjugados a fluoróforos selecionados para execução do projeto.....	34
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

BV – *Brilliant Violet*

DCs – células dendríticas

GFP – *green fluorescent protein*; proteína fluorescente verde

HSCs – *haematopoietic stem cells*; células-tronco hematopoiéticas

IFN – Interferon

IL – Interleucina

i.p. - intraperitoneal

i.v. - intravenoso

iRBC - Eritrócito infectado

IVM - Microscopia intravital

MARCO - *macrophage receptor with collagenous structure*

MMM – Macrófagos marginais metalofílicos

MZM – Macrófagos da zona marginal

NK – Células *natural killer*

NKT - Células T *natural killer*

PALS – *periarteriolar lymphoid sheath*

PECAM-1 – *platelet/endothelial cell adhesion molecule 1*

TNF – Fator de necrose tumoral

SIGNR1 – *SIGN-related 1*

Siglec1 - *Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins-1*

SUMÁRIO

1. Introdução	14
1.1. O baço.....	14
1.2. O baço nos períodos embrionário e neonatal.....	16
1.3. Malária: aspectos epidemiológicos e patológicos.....	18
1.4. O baço no contexto infeccioso da malária.....	20
1.5. Microscopia e o advento de marcadores fluorescentes.....	23
2. Objetivos	26
2.1. Objetivo geral.....	26
2.2. Objetivos específicos	26
3. METODOLOGIA.....	27
3.1. Animais experimentais	27
3.2. Microscopia confocal intravital <i>in vivo</i>	27
3.3. Modelo de infecção por <i>Plasmodium chabaudi</i>	28
3.4. Identificação das populações celulares e quantificação por tipo celular.....	28
3.5. Análise das áreas de lesão	28
3.6. Citometria de fluxo	29
3.6.1. Isolamento das células imunes do baço.....	29
3.6.2. Citometria.....	29
3.6.3. Estratégia de gates	29
3.7. Análise Estatística.....	30
4. RESULTADOS	31
4.1. Um novo protocolo habilita a realização da microscopia confocal intravital com sete canais.....	31
4.2. Distintas populações imunes no baço de camundongos são visualizadas <i>in vivo</i> utilizando marcadores alvo-específicos para receptores de superfície celular.....	34
4.3. A arquitetura dos vasos esplênicos e/ou a expressão de CD31 pelas células endoteliais se altera ao longo do tempo	36
4.4. A composição e a organização das populações celulares imunes do baço sofrem perturbações ao longo do desenvolvimento	37
4.5. Células de mesma linhagem apresentam uma dinâmica similar ao longo do desenvolvimento.....	43

4.6. Uma outra dinâmica é observada ao utilizar a citometria de fluxo como método experimental.....	45
4.7. Camundongos infantis são mais suscetíveis à infecção por <i>Plasmodium chabaudi</i>	49
4.8. O perfil celular imune é reduzido drasticamente tanto em camundongos infantis, quanto em adultos infectados	51
5. DISCUSSÃO	57
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXOS	72

1. INTRODUÇÃO

1.1. O baço

Um tanto peculiar e singular, o baço é um órgão linfoide secundário que realiza funções diversas e fundamentais ao organismo. Localizado do lado esquerdo da cavidade abdominal, justaposto ao fígado, estômago e intestino, é o único órgão linfoide interposto na circulação sanguínea, o que significa que os antígenos chegam ao tecido via sangue, não pelos vasos linfáticos (Lewis, Williams and Eisenbarth, 2019). A arquitetura esplênica e sua composição multicelular permitem uma constante vigilância do sangue, e facilitam as interações entre as células apresentadoras de antígenos (APCs) e os linfócitos, integrando as imunidades inata e adaptativa em um nível altamente organizado (Zhao *et al.*, 2015). Ademais, o baço é responsável pela destruição dos eritrócitos senescentes e danificados (Kristiansen *et al.*, 2001; Connell, Shurin and Schiffman, 2018), tem função na homeostase lipídica (Fernández-García *et al.*, 2020), atua como reservatório de monócitos (Swirski *et al.*, 2009) e precursores de células mieloides (Bronte and Pittet, 2013), atua como um sítio de hematopoiese extramedular em resposta a injúrias (Golub *et al.*, 2018), além de agir como um “filtro” fagocitário (Mebius and Kraal, 2005).

Aspectos histológicos permitem a divisão do baço em duas regiões distintas: a polpa vermelha e a polpa branca. Entre essas duas regiões há ainda uma terceira localidade denominada zona marginal, nos roedores, ou zona perifolicular, em humanos (Steiniger, 2015). Cada uma destas regiões possui tipos celulares específicos, assim como funções e estruturas distintas, observando-se uma arquitetura muito bem planejada (Ilustração 1). A polpa vermelha é constituída majoritariamente por macrófagos, eritrócitos, células dendríticas (DCs) e plasmócitos. Células NK também estão presentes na polpa vermelha. A zona marginal compreende dois diferentes subtipos de macrófagos, diferentes populações de DCs e um tipo distinto de célula B. A polpa branca, por sua vez, é predominantemente tecido linfoide, organizada em zonas de linfócitos T e B, denotando a região de maior volume/concentração celular do órgão (Desanti *et al.*, 2007). O sangue chega ao órgão pela artéria esplênica, flui pelas arteríolas da polpa branca e é entregue aos cordões esplênicos da polpa vermelha. Após sua passagem pela polpa vermelha em sistema aberto, o sangue é coletado pelos seios esplênicos, flui até a veia esplênica

e segue para o espaço porta-hepático (Mebius and Kraal, 2005; Lewis, Williams and Eisenbarth, 2019). Ao redor das arteríolas centrais forma-se a bainha linfoide periarteriolar (PALS), uma zona de células T e local de interação entre DCs e linfócitos.

Dentre as populações imunes do baço, os linfócitos B, os macrófagos e as células dendríticas compreendem os tipos celulares mais bem estudados, com maior aporte de informações na literatura. Em específico, os macrófagos apresentam quatro populações heterogêneas no órgão, com localizações, origens e funções distintas (Epelman, Lavine and Randolph, 2014; Borges Da Silva *et al.*, 2015). Os macrófagos da polpa vermelha são células que cobrem uma vasta área da região pela qual levam o nome e, em camundongos, são caracterizados pela expressão de F4/80^{high}. São responsáveis pela fagocitose das células vermelhas do sangue, pelo metabolismo do ferro, pela diferenciação de linfócitos T naíve em linfócitos T_{reg} e atuam em infecções por parasitas (Kurotaki, Uede and Tamura, 2015). Na zona marginal encontramos os macrófagos da zona marginal (MZMs), que expressam tipicamente em sua superfície SIGNR1 e MARCO, e os macrófagos marginais metalofílicos (MMMs), definidos principalmente pela expressão de Siglec-1 (CD169) e MOMA-1. Trabalhos indicam o papel destas células no reconhecimento e fagocitose de partículas opsonizadas e não-opsonizadas (Kraal and Mebius, 2006). Por último, os macrófagos de corpos tingíveis situam-se nos folículos de linfócitos B da polpa branca e são característicos pela expressão de CD68, com funções ainda pouco conhecidas (Gordon and Taylor, 2005; Davies *et al.*, 2013).

Diante de tal descrição, é possível ter uma leve percepção do quão complexo o baço é e como ainda possui muitos aspectos a serem desvendados e estudados de forma mais aprofundada. Portanto, trata-se de um órgão linfoide singular devido à sua localização no sistema circulatório e à estrutura diferenciada de seus compartimentos linfoides. E, apesar de ainda pouco compreendido em sua totalidade, ele se mostra muito importante ao organismo, integrando e regulando respostas imunes locais e sistêmicas, e atuando como um dos sítios responsáveis por manter a homeostase sanguínea (Bronte and Pittet, 2013; Borges Da Silva *et al.*, 2015).

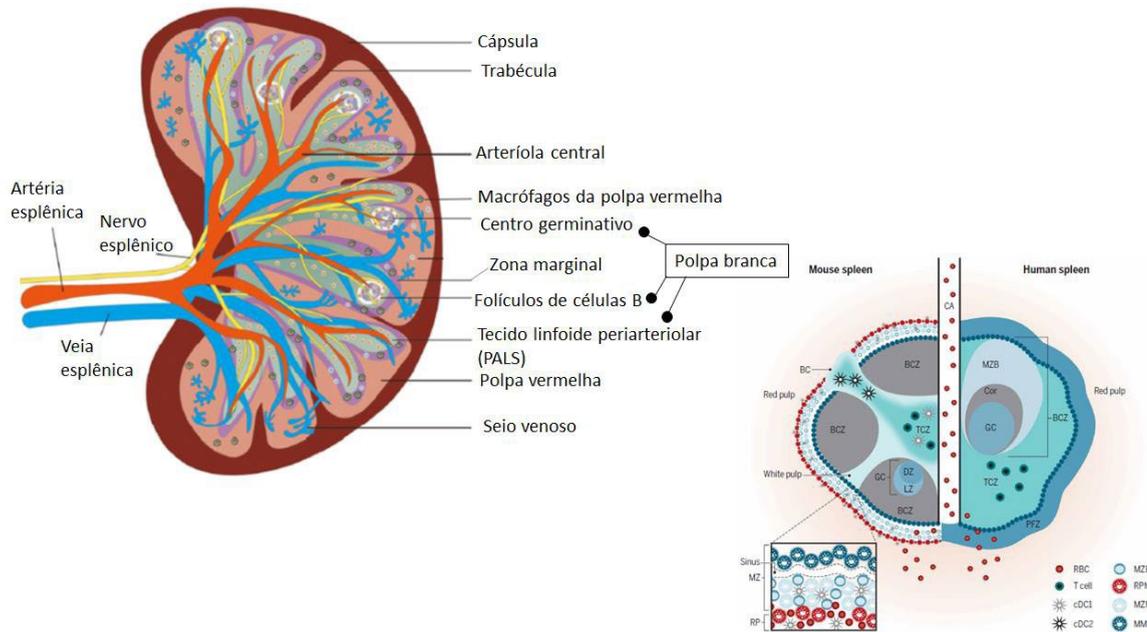


Ilustração 1. Estrutura e organização do baço. Organização dos compartimentos esplênicos. Polpa branca, composta pelos folículos de células B (BCZ), centros germinativos (GC) e pela zona de células T (TCZ), é envolta pela polpa vermelha. Entre estas duas regiões, tem-se a zona marginal (MZ), em roedores, ou zona perifolicular (PFZ) nos humanos. Artéria esplênica, veia esplênica e nervo esplênico penetram o órgão pela região do hilo. BC: *bridging channel*; RBC: *red blood cell*; cDC: *conventional dendritic cell*; MZB: *marginal zone B cell*; RPM: *red pulp macrophages*; MZM: *marginal zone macrophages*; MMM: *marginal metalophilic macrophages*; DZ: *dark zone*; LZ: *light zone*. Adaptado de Lewis, Williams and Eisenbarth, 2019; Wei *et al.*, 2022.

1.2. O baço no período embrionário e neonatal

Considerando que uma gestação normal de camundongo dura de 19-21 dias, os primórdios do baço são detectados no tempo gestacional E10.5-11, aproximadamente (Desanti *et al.*, 2007). O processo se inicia pela condensação de células mesenquimais do mesogástrio dorsal, adjacente ao estômago e ao pâncreas dorsal, e uma cascata genética controla o desenvolvimento inicial do órgão (Brendolan *et al.*, 2007). Células-tronco hematopoiéticas (HSCs) e células progenitoras são identificadas no baço fetal no dia E13 (Landreth, 2002). Inclusive, o baço compreende uma população de células precursoras derivadas do fígado fetal (Rosado *et al.*, 2009).

O baço fetal caracteriza-se como um órgão hematopoiético que é constantemente colonizado por HSCs circulantes (Christensen *et al.*, 2004; Bertrand *et al.*, 2006). No dia E12, macrófagos provenientes do saco vitelínico já colonizam o órgão, e nos dias E13-E13.5, os primeiros progenitores eritrocíticos, mielóides e linfóides são detectados, aumentando em número até o dia E16.5 (Desanti *et al.*, 2007). No tempo E15.5, o microambiente esplênico é amplamente composto por monócitos/macrófagos que se distribuem homoganeamente por todo o órgão (Bertrand *et al.*, 2006). Os subtipos celulares linfóides são então observados no dia E16.5, e suas respectivas populações aumentam consideravelmente até o nascimento (Desanti *et al.*, 2007). O desenvolvimento esplênico, entretanto, não está completo no nascimento e o processo de organização do tecido é resultado de processos dinâmicos mantidos ao longo de toda a vida do indivíduo, como nos demais órgãos linfóides secundários (Desanti *et al.*, 2007; Vondenhoff *et al.*, 2008).

Citocinas da superfamília do TNF, assim como quimiocinas específicas, têm um papel muito importante no processo do desenvolvimento esplênico, pois guiam e influenciam a compartimentalização do órgão. A linfotóxina- α (LT- α), por exemplo, se faz essencial para a estruturação de toda a polpa branca, especialmente, para a formação das células dendríticas foliculares e dos folículos em si (Beck *et al.*, 2007). A segregação dos folículos em zonas de linfócitos T e zonas de linfócitos B, em contrapartida, começa entre os dias 3 e 7 pós-nascimento e é mantida ao longo da vida por uma constante comunicação entre as células B, T e as células do estroma. As moléculas que atuam mantendo a segregação destas zonas T e B são as mesmas envolvidas na origem da polpa branca (LT α 1 β 2, TNF α , CXCL13, CCL19, CCL21, CCR5, CCR7) (Tumanov *et al.*, 2002; Mccarthy *et al.*, 2006). A regionalização em polpa vermelha e polpa branca ocorre entre o 5° e o 7° dia neonatal, e o estabelecimento da zona marginal acontece concomitantemente. Entretanto, os macrófagos da polpa vermelha são localizados nessa região do órgão apenas entre a segunda e a terceira semana pós-natal, quando a compartimentalização definitiva das polpas é evidente (A-Gonzalez *et al.*, 2013; A-Gonzalez and Castrillo, 2018). E, o processo de hematopoiese no baço é observado até a segunda semana de vida (Bertrand *et al.*, 2006). O estágio neonatal, portanto, constitui a fase de transição entre a função hematopoiética e o estabelecimento de um sistema imune esplênico eficiente ao combate de agentes infecciosos.

1.3. Malária: aspectos epidemiológicos e patológicos

Patógenos transmitidos pelo sangue e infecções causadas por parasitas, como é o caso da malária, induzem respostas esplênicas um tanto quanto pronunciadas, porém, variáveis. Observam-se alterações no tamanho do baço, em sua arquitetura e composição celular (Ferrer *et al.*, 2014; Ghosh and Stumhofer, 2021). A malária é uma doença infecto-parasitária transmitida pelo mosquito do gênero *Anopheles* infectado pelo protozoário do gênero *Plasmodium*, e que permanece como um problema de saúde pública em regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre (Escalante and Pacheco, 2019). Em 2020, a estimativa foi de 241 milhões de casos e 627 mil mortes em todo o mundo (WHO, 2021). Crianças de até 5 anos são o público mais vulnerável e afetado pela doença, representando cerca de 60% das mortes anuais (Varo, Chaccour and Bassat, 2020).

Alguns aspectos da doença variam entre as regiões onde a malária é endêmica, como: as espécies do parasita que causam a doença, a prevalência de infecções subclínicas, o surgimento de resistência aos tipos de tratamento e as intervenções realizadas. Um diverso grupo de espécies do gênero *Plasmodium* é capaz de infectar uma grande variedade de hospedeiros vertebrados. No caso dos humanos, quatro espécies são catalogadas, porém, a maioria dos casos severos e mortes ocorrem por infecções por *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* (Escalante and Pacheco, 2019). Dentre as espécies capazes de infectar roedores, podemos citar como exemplo o *P. chabaudi*, com diferentes cepas utilizadas em pesquisas laboratoriais que induzem condições imunológicas e patológicas que se assemelham à fisiopatologia observada em humanos (Craig *et al.*, 2012). Sendo assim, camundongos infectados com cepas de parasitos constituem modelos úteis no estudo, compreensão e descrição dos aspectos clínicos da doença, tanto em contexto sistêmico quanto órgão-específico.

A infecção malárica inicia-se quando a fêmea do mosquito, infectada pelo protozoário, inocula um número substancial de esporozoítos (forma infectante do parasito) no sangue do hospedeiro ao se alimentar (Ilustração 3). Os esporozoítos atingem, então, a corrente sanguínea, se dirigem ao fígado e infectam os hepatócitos (células parenquimais do fígado), estabelecendo-se dentro de um vacúolo parasitóforo (Varo, Chaccour and Bassat, 2020). Este vacúolo é essencial para a sobrevivência do parasito, sofrendo frequentes remodelamentos para escapar dos mecanismos de

defesa dos hepatócitos e para utilizá-lo como um canal absorvivo de nutrientes oriundos da célula hospedeira (Nyboer *et al.*, 2018). Quando bem-sucedido, ainda no hepatócito, o parasito sofre replicação e forma os merozoítos. Esta etapa classifica-se como o estágio pré-eritrocítico ou fase hepática do ciclo do parasita, caracterizando-se como o período silencioso da doença, uma vez que o hospedeiro ainda não manifesta quaisquer sintomas (Sturm *et al.*, 2016). Em seguida, os merozoítos são liberados na corrente sanguínea e inicia-se o estágio eritrocítico da doença, em que sintomas clínicos já são observados. Estes merozoítos maduros perdem a capacidade de infectar hepatócitos e passam a infectar os eritrócitos. Logo após a infecção dos glóbulos vermelhos (iRBCs), os parasitos aparecem morfológicamente como anéis dentro das iRBCs e se desenvolvem em trofozoítos, sofrem esquizogonia, e finalmente formam merozoítos diferenciados, que são novamente lançados na corrente sanguínea. Estas partículas podem, assim, invadir outros glóbulos vermelhos, mantendo o ciclo (Mota Maria M. *et al.*, 2001; Chang and Stevenson, 2004).

Os glóbulos vermelhos contendo parasitas em estágio de anel exibem pequenas modificações em sua superfície na forma de moléculas de adesão, permitindo assim que estes mantenham sua forma bicôncava e naveguem pelos cordões esplênicos antes de retornar à circulação. À medida que o parasita faz sua transição para o estágio de merozoíto diferenciado, o número de proteínas derivadas do parasito e expressas na superfície do eritrócito aumenta, ao mesmo tempo que a deformabilidade da célula diminui, aumentando sua probabilidade de ser retida e destruída pelos macrófagos do baço (Cranston *et al.*, 2016).

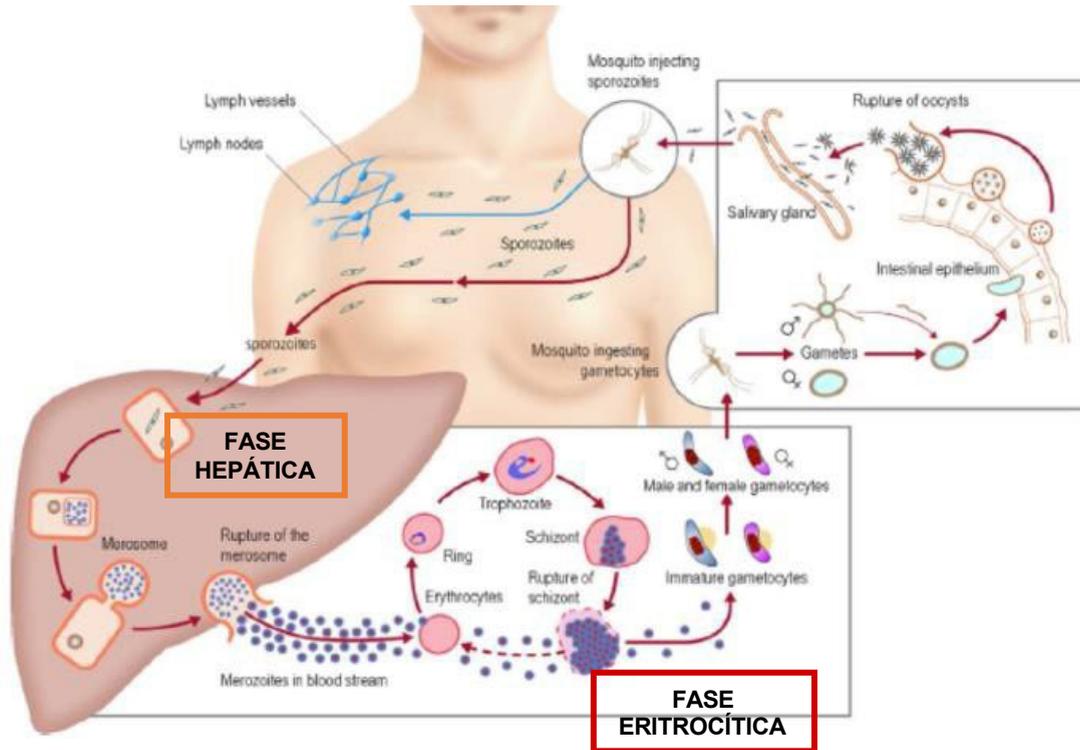


Ilustração 2. Ciclo do *Plasmodium* spp. Ciclo de vida do protozoário parasita, evidenciando os estágios hepático e eritrocítico da doença no hospedeiro vertebrado, e seus respectivos eventos sequenciais. Adaptado de Varo, Chaccour and Bassat, 2020.

1.4. O baço no contexto infeccioso da malária

Durante a infecção pelo *Plasmodium*, o baço transforma-se em uma “bolha de atividade” onde uma intensa progressão de eventos se passa (Ilustração 4). Nos primeiros estágios da infecção, se observa um quadro de esplenomegalia, e a ativação policlonal de células B promove a expansão e diferenciação destas em plasmablastos (Stevenson and Kraal, 1989; del Portillo *et al.*, 2012). Monócitos inflamatórios são recrutados e se diferenciam em macrófagos que auxiliam a fagocitose e eliminação das iRBCs (Ferrer *et al.*, 2014). Há, também, o desenvolvimento de progenitores de células B em linfócitos maduros, a ativação de células T CD4+ levando à sua diferenciação em tipos efetores, a migração e interação entre as células B e T, além da ocorrência das reações de centro germinativo (Urban *et al.*, 2005). Diferentes fenótipos de linfócitos T podem ser detectados no baço no clímax da resposta imune esplênica. Desse modo, a infecção induz uma resposta imune humoral lenta e com baixo nível de coordenação, promovendo a desintegração

da borda entre polpa branca e polpa vermelha, a disrupção da zona marginal e a desestruturação dos centros germinativos (Lewis, Williams and Eisenbarth, 2019). Em estágios mais tardios, observa-se uma alteração na coloração do órgão devido ao acúmulo de hemozoína no tecido, um pigmento produzido pelo *Plasmodium spp.* e produto da metabolização da hemoglobina hospedeira. Seguindo a resolução da infecção, o baço contrai significativamente seu tamanho, os centros germinativos contraem e a zona marginal é reestabelecida. Portanto, a estrutura esplênica original é restaurada. Finalmente, linfócitos B de memória deixam o órgão em direção aos demais órgãos linfoides, plasmócitos se dirigem à medula óssea e as distintas populações de linfócitos T de memória se distribuem de acordo com seus respectivos fenótipos (Ghosh and Stumhofer, 2021).

Uma consequência comum da infecção aguda pelo *Plasmodium* é a ocorrência de um quadro anêmico tanto pela grande retenção e fagocitose dos eritrócitos infectados, quanto por uma mudança na hematopoiese na medula óssea (Villeval *et al.*, 1990). A alta demanda por células mieloides para o *clearance* de iRBCs, reduz a capacidade da medula em produzir eritrócitos e linfócitos. Assim, com o intuito de tentar compensar tal prejuízo e dar um certo suporte, o baço assume um importante papel como sítio eritropoiético, e também passa a realizar a mielopoiese (Belyaev *et al.*, 2010, 2013). No entanto, esta hematopoiese extramedular foi investigada apenas em camundongos e não se sabe se mecanismos semelhantes ocorrem nos humanos (Asami *et al.*, 1992; Yap and Stevenson, 1992). Estudos utilizando modelos murinos mostram, ainda, que, no contexto infeccioso, a circulação aberta no baço passa para um sistema fechado temporário, pois ocorre a formação de uma barreira física constituída por fibroblastos - também denominados células de barreira (Weiss, 1991) -, associados à fibronectina e colágeno (Weiss, Geduldig and Weidanz, 1986). Ao que tudo indica, células progenitoras trazidas pela corrente sanguínea e células proliferativas no baço dão origem a estes fibroblastos.

Indivíduos que sofreram esplenectomia (retirada do baço) e que enfrentam uma infecção primária de malária apresentam casos mais severos da doença, além de maiores taxas de mortalidade em comparação a indivíduos que possuem o órgão. E, indivíduos que vivem em áreas endêmicas, possuem anticorpos específicos ao parasita e foram esplenectomizados, exibem cargas parasitárias mais altas e episódios mais frequentes de febre do que indivíduos com o baço intacto (Buffet *et al.*, 2011). Pelo que os dados na literatura indicam, as partículas parasitárias que sofrem

opsonização não são eliminadas tão rapidamente pelas populações de macrófagos do fígado e de outros órgãos, como acontece pelos macrófagos da polpa vermelha do baço (Quinn and Wyler, 1979; Dockrell, de Souza and Playfair, 1980). Desse modo, percebe-se que o baço desempenha funções essenciais na eliminação do parasita mesmo quando já existe uma imunidade previamente adquirida ao agente etiológico. Assim, dado o panorama atual da malária no mundo, se faz necessária a realização de estudos aprofundados para melhor entendimento da patofisiologia da doença, assim como o advento de novas ferramentas que auxiliem, pelo menos, na redução do número de mortes.

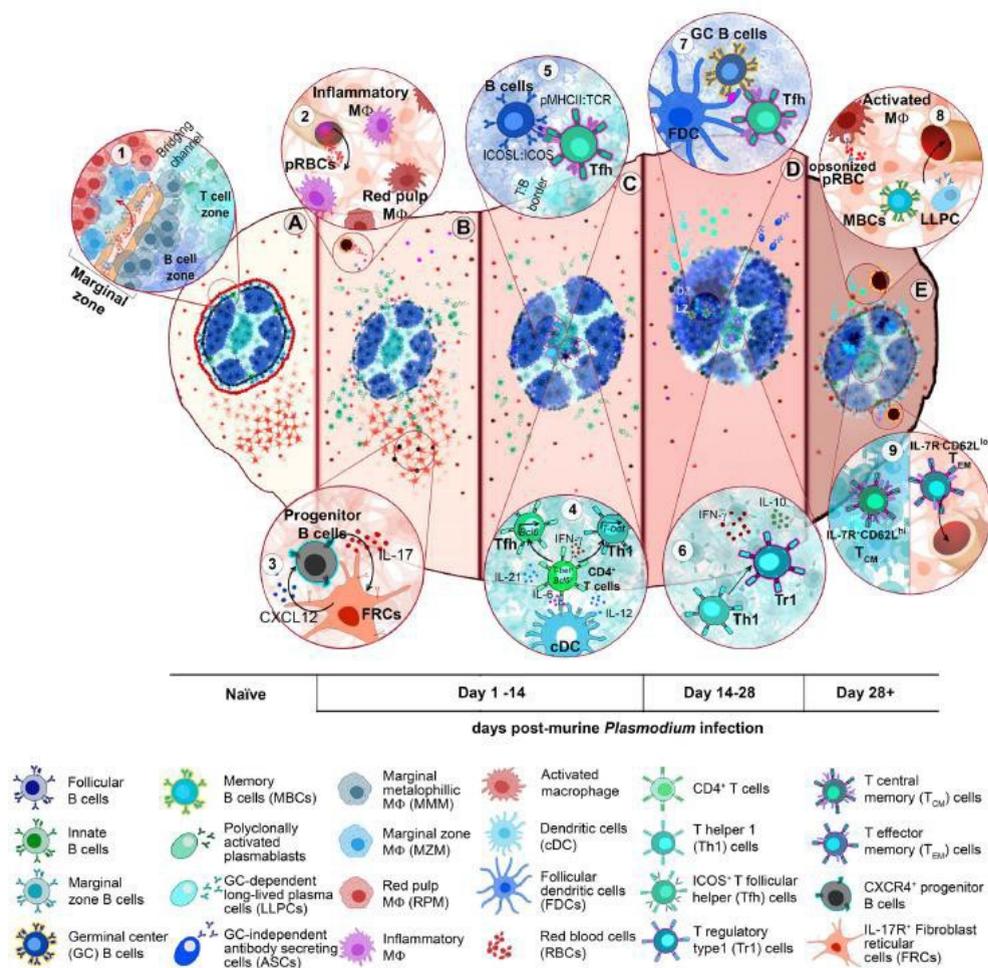


Ilustração 3. Alterações na estrutura esplênica ao longo da infecção malárica.

Sequência de eventos que compõem a resposta imune esplênica ao longo da infecção pelo agente parasitário causador da malária. No início da resposta vemos a chegada de monócitos inflamatórios ao baço e a ativação de linfócitos B, seguido pela ativação das células T. Concomitantemente, se observa a desorganização estrutural do órgão, em que ocorre uma perda da delimitação entre a polpa branca e polpa

vermelha, e desestruturação da zona marginal. Já nos estágios finais tem-se alteração na cor do tecido pelo acúmulo de hemozoína, e a restauração da estrutura esplênica original. Por fim, linfócitos B de memória, plasmócitos e as distintas populações de linfócitos T de memória deixam o órgão e distribuem-se em diferentes locais do corpo. Adaptado de Ghosh and Stumhofer, 2021.

1.5. Microscopia e o advento de marcadores fluorescentes

Os primeiros relatos do uso da microscopia intravital datam de estudos fisiológicos após a introdução do primeiro microscópio de fluorescência por Heimstadt, em 1911 (Secklehner, Celso and Carlin, 2017), e após o desenvolvimento de fluoróforos exógenos. O advento de proteínas fluorescentes e sondas fluorescentes têm desempenhado um papel importante no ramo de imagens científicas. O surpreendente advento da proteína fluorescente verde (GFP) - originalmente isolada de *Aequorea victoria* -, por exemplo, testemunhou um grande avanço no “mundo da imagem” (Shimomura, 1979). Desde então, a combinação de fluorescência geneticamente determinada com sondas exógenas catalisou uma enorme e rápida expansão em nossa capacidade de retratar fenômenos vivos (Tsien, Ernst and Waggoner, 2006).

Apesar da relevância da distribuição geográfica das células imunes e sua relação físico-dinâmica dentro do baço, muitos dos estudos realizados até o momento empregaram técnicas histológicas convencionais ou citometria de fluxo para entender a biologia do órgão. As limitações principais dessas duas abordagens incluem: i) visão estática de um ambiente extremamente dinâmico imposto pela histologia clássica; ii) perda de interação célula-célula e localização celular *in situ* devido aos procedimentos de digestão tecidual necessários para citometria de fluxo; iii) limitações dos marcadores fluorescentes nas técnicas convencionais de imunofluorescência, impossibilitando a imunofenotipagem precisa em amostras do baço.

Nas pesquisas, a microscopia é uma ferramenta utilizada com o intuito de fornecer informações espaciais, permitindo uma análise qualitativa do objeto de estudo, com um grande “apelo” visual (Stoltzfus *et al.*, 2020). Entretanto, a visualização e quantificação estrutural definida por múltiplas combinações de fluoróforos ainda é um grande desafio (Gerner *et al.*, 2012). A citometria de fluxo, em contraste, permite a análise quantitativa de populações celulares, porém, o agrupamento de células durante a análise é baseado apenas na similaridade,

desconsiderando informações sobre a localização ou suposta interação intercelular.

A demanda pelo desenvolvimento de novos fluoróforos que permitissem a imunofenotipagem em alta dimensão pela citometria de fluxo - incluindo até 50 parâmetros simultâneos em uma única amostra - criou uma infinidade de opções de moléculas no mercado. As novas gerações de polímeros, isto é, os corantes da família dos Brilliant Violets (BVs) possibilitam a excitação simultânea de várias moléculas usando uma única linha de laser (isto é, 405nm), mas com emissão em diferentes regiões do espectro visível, variando de 450 a > 780nm (Ilustração 4) (Chattopadhyay *et al.*, 2012). Isso permite a combinação de vários corantes do tipo BV com outros fluoróforos convencionais, aumentando o número de parâmetros analisados simultaneamente. Portanto, esses novos fluorocromos sintéticos catalisaram uma revolução no estudo de populações celulares distintas, permitindo a aquisição de dados mais confiáveis e a descrição de novos fenômenos celulares.

Por outro lado, a microscopia confocal intravital é uma técnica avançada que se tornou amplamente utilizada para visualizar tecidos e células em alta resolução em seu ambiente nativo (Smith, 2011). No entanto, devido a limitações técnicas inerentes ou desconhecimento das aplicações de corantes, a maioria dos trabalhos com imagens utilizam apenas dois ou três canais do microscópio, limitando as oportunidades de identificação de células e análises *in vivo*. Buscamos neste trabalho, portanto, descrever um novo protocolo para microscopia confocal intravital utilizando um painel de fluoróforos conjugados a anticorpos específicos. Tal metodologia foi aplicada com o intuito de visualizar populações de células do sistema imune de um jeito nunca antes feito, revelando as particularidades do desenvolvimento imune do baço no período pós-natal e as alterações celulares no microambiente esplênico frente a uma infecção parasitária aguda.

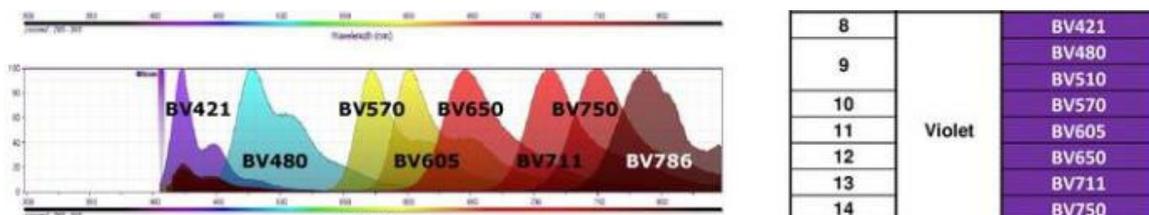


Ilustração 4. Painel de fluoróforos da família dos Brilliant Violets (BVs). Os diferentes fluorocromos que compõem a família dos Brilliant Violets são excitados por um feixe de luz de comprimento de onda similar (405nm), porém, cada um deles emite

essa energia, na forma de fluorescência, em diferentes comprimentos de onda. Isto é, cada um deles apresenta um pico de emissão característico e distinto dos demais, cobrindo diferentes regiões do espectro visível.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar o desenvolvimento imune celular do baço no período pós-natal, utilizando um novo protocolo em microscopia confocal.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Testar e comprovar a viabilidade de um novo protocolo em microscopia confocal;

2.2.2. Compreender a dinâmica de determinadas populações celulares no baço de camundongos em diferentes idades;

2.2.3. Caracterizar, mapear e quantificar as células imunes no órgão;

2.2.4. Descrever as mudanças/alterações observadas na arquitetura e organização do ambiente esplênico ao longo do desenvolvimento do camundongo;

2.2.5. Testar a viabilidade do novo protocolo em um modelo de infecção;

2.2.6. Estudar o quadro infeccioso em camundongos infantis e adultos, analisando as alterações no microambiente esplênico.

3. METODOLOGIA

3.1. Animais experimentais

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas da linhagem C57BL/6, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (Cebio) (ICB/UFMG). Estes animais foram organizados em matrizes (grupos de duas fêmeas para cada um macho) e as ninhadas provenientes dos cruzamentos foram mantidas para montagem de novas matrizes para geração de camundongos que seriam utilizados nos experimentos. Portanto, animais de diferentes idades (1, 3 e 8 semanas) foram gerados e todos os camundongos foram acondicionados em microisoladores com ração autoclavada (NUVILAB) e água *ad libitum*, em condições controladas de temperatura (24°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12/12h). Os procedimentos experimentais realizados estão de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CEUA 143/2022).

3.2. Microscopia confocal intravital *in vivo*

A microscopia intravital do baço de camundongos nas idades de 7 e 21 dias, e oito semanas, foi realizada utilizando o microscópio confocal Nikon Ti A1 (Nikon, Japão) e marcadores fluorescentes. Primeiramente, os camundongos receberam por via intravenosa (i.v.) uma solução de IgG (12,5 µg/g, Sigma-Aldrich) e, após 15 minutos, também por via intravenosa (i.v.), foi administrada uma solução contendo os seguintes anticorpos conjugados a fluorocromos: anti-CD31 BV421 (0,15 µg/g, clone 390, BD), anti-F4/80 BV480 (0,05 µg/g, clone T45-2342, BD), anti-Ly6C BV605 (0,1 µg/g, clone AL-21, BD), anti-Ly6G BV711 (0,1 µg/g, clone 1A8, BD), anti-CD19 BB515 (0,1 µg/g, clone 1D3, BD), anti-NK1.1 PE (0,06 µg/g, clone PK136, BD) e anti-CD3e APC (0,06 µg/g, clone 145-2C11, BD). Tais anticorpos foram desenhados por meio de uma parceria com a empresa BD Biosciences, sendo produzidos e fornecidos pela mesma. Em seguida, os animais foram anestesiados (4µl/g) com injeção subcutânea de xilazina (15 mg/Kg, Syntec) e ketamina (80 mg/Kg, Syntec) diluídos em salina, e submetidos à cirurgia para exposição do baço. Um suporte adaptado de acrílico foi utilizado para posicionar o animal, e o baço foi exposto sob uma lamínula de vidro. Com o animal já devidamente posicionado no microscópio, vídeos e imagens foram imediatamente adquiridas de diferentes campos do órgão, e em diferentes aumentos,

na nova configuração com sete canais ativos. Para análise do fluxo sanguíneo, alguns animais não receberam os anticorpos, mas FITC albumina diluída em salina (12,5 µg/g, Sigma-Aldrich), também por via intravenosa (i.v.), após a realização da cirurgia e no momento inicial da filmagem. Finalizada a aquisição, os arquivos foram gerados utilizando os softwares NIS-Elements AR Analysis 5.41.01(Nikon) e Velocity 6.3 (PerkinElmer).

3.3. Modelo de infecção por *Plasmodium chabaudi*

Amostras criopreservadas da cepa de *Plasmodium chabaudi chabaudi* (AS), foram descongeladas em temperatura ambiente e posteriormente inoculadas via intraperitoneal (100µL/animal). A manutenção da cepa foi feita em passagens seriais em camundongos C57BL/6, uma vez por semana, até dez vezes (dez semanas). Para infecção experimental, os camundongos foram inoculados por via intravenosa (i.v.), com 1×10^5 eritrócitos infectados, em duas diferentes idades: 2 e 7 semanas. Uma semana após o inóculo, os animais foram submetidos aos ensaios experimentais de microscopia confocal. Os animais do grupo “controle” receberam o mesmo volume de PBS estéril, administrado via intravenosa. A parasitemia foi quantificada por esfregaços sanguíneos corados por panótico rápido (Laborclin), e analisada em microscópio óptico, a cada dois dias, e a sobrevivência dos animais infectados foi analisada durante trinta dias após a infecção.

3.4. Identificação das populações celulares e quantificação por tipo celular

A quantificação celular foi feita manualmente com o auxílio do software ImageJ. Para definição de cada população celular foram utilizados dois critérios: marcação pelo anticorpo específico para o tipo celular e morfologia observada nas imagens. Foram contabilizadas 3 imagens por animal, utilizando todo o campo capturado, e o resultado de cada indivíduo foi obtido pela média das três contagens. Todas as três idades foram submetidas à contagem para posterior comparação, e um mínimo de 5 animais foi utilizado por grupo. Os resultados obtidos, por campo, para cada tipo celular, foram expressos em números absolutos e em porcentagem.

3.5. Análise das áreas de lesão

A quantificação das áreas lesionadas nos baços de camundongos infectados

pelo agente etiológico da malária foi realizada no software NIS-Elements AR Analysis 5.41.01 (Nikon). Tal levantamento foi feito manualmente e o resultado da área total de lesão de cada imagem foi expresso em porcentagem, e calculado fazendo a proporção da soma das áreas lesionadas em relação à área total de cada imagem.

3.6. Citometria de fluxo

3.6.1. Isolamento das células imunes do baço

Os camundongos foram anestesiados, e tiveram seus baços removidos e macerados diretamente no cell strainer. O produto obtido pela maceração, em conjunto com o meio RPMI, foi transferido para um tubo, e a solução foi centrifugada a 400 X g, a 4°C por dez minutos. Ao final do procedimento, o sobrenadante foi descartado e a solução de lise (ACK), adicionada. Após incubação e adição de PBS Wash, a solução foi mais uma vez centrifugada utilizando os mesmos parâmetros. Novamente o sobrenadante foi descartado e o pellet, ressuspendido.

3.6.2. Citometria

As células obtidas no isolamento do baço foram contadas, e 1×10^6 células de cada amostra foram marcadas com os mesmos marcadores utilizados na microscopia, com uma pequena modificação em que o anti-CD31 foi retirado e o anti-CD45 foi adicionado ao mix (Anexo I). Após a marcação, as amostras foram lidas utilizando o citômetro de fluxo Cytoflex (Beckman Coulter CytoFlex), e as análises dos dados obtidos realizadas no software FlowJo 10. Cada grupo estudado continha 8 camundongos.

3.6.3 Estratégia de gates

As populações de leucócitos foram definidas por meio da estratégia abaixo.

Populações	Estratégia
Macrófagos	F4/80+
Monócitos	Ly6C ^{hi} Ly6G ^{low} F4/80 ^{low}
Neutrófilos	Ly6G+Ly6C ^{low}
Células B	CD19+
Células T	CD3+NK1.1-

Células NK	NK1.1+CD3-
Células NKT	CD3+ NK1.1+

3.7. Análise estatística

Os gráficos e estatística foram feitos com o auxílio do software GraphPad Prism 6. Os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (SEM). A comparação entre os grupos foi feita utilizando-se one-way ANOVA, com pós-teste de Dunnett. Todos os grupos foram comparados ao grupo 8 semanas. Para os dados referentes aos animais infectados, a comparação com os respectivos grupos controle foi realizada utilizando teste t não-pareado, com correção de Welch. O nível de significância para os testes foi definido como $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. Um novo protocolo habilita a realização da microscopia confocal intravital com sete canais

Com o intuito de visualizar uma maior variedade de tipos celulares e realizar uma imunofenotipagem *in vivo* mais abrangente, um novo protocolo foi idealizado para a identificação de 7 tipos celulares distintos utilizando um microscópio confocal com 4 canais. Para a realização de tal proposta, algumas exigências foram cumpridas: a realização de alterações nas configurações convencionais do microscópio e a criação de um painel customizado de marcadores celulares conjugados a fluoróforos. Dessa maneira, no microscópio, uma primeira configuração foi ajustada para que todos os quatro canais operassem sob um mesmo laser de excitação. Isto é, os fluoróforos utilizados em cada um dos quatro canais desta primeira configuração foram todos excitados por um mesmo laser cujo comprimento de onda era de 405nm (Figura 1A). Em seguida, uma segunda configuração foi programada. Nessa, cada canal operava com um respectivo laser de comprimento de onda específico e diferente dos demais. Ou seja, o microscópio operava em sua conformação padrão para cada canal, porém com o canal do laser de 405nm inativo (Figura 1B). A combinação destas duas configurações utilizando a função λ (lambda) do próprio software do microscópio, possibilitou o escaneamento simultâneo de seções do tecido por 7 canais diferentes, e conseqüentemente, a captura de imagens e vídeos apresentando os diversos fenótipos celulares. No entanto, um segundo ponto foi considerado para que tal estratégia visual pudesse ser colocada em prática: a disponibilidade de fluoróforos que não apresentassem padrões de excitação e emissão coincidentes, além de fluoróforos que fossem excitados por um mesmo comprimento de onda, mas que divergissem nas regiões do espectro de luz visível quanto às suas respectivas emissões de fluorescência. Assim, um painel de anticorpos conjugados a fluoróforos foi montado e produzido de forma personalizada. Esse painel incluiu os seguintes fluoróforos: BV421 (laser de excitação: 406nm, emissão da fluorescência: 425-475nm), BV480 (laser de excitação: 406nm, emissão da fluorescência: 500-550nm), BV605 (laser de de excitação: 406nm, emissão da fluorescência: 570-620nm), BV711 (laser de excitação: 406nm, emissão da fluorescência: 633-738nm), BB515 (laser de excitação: 488nm, emissão da fluorescência: 500-550nm), ficoeritrina (PE; laser de excitação: 561nm, emissão da fluorescência: 570-620nm) e alofocianina (APC; laser

de excitação: 639nm, emissão da fluorescência: 633-738nm). Assim, os primeiros quatro fluoróforos, todos da família dos Brilliant Violets (BVs), foram utilizados para atender a primeira configuração de ajuste do microscópio, enquanto os outros 3 fluoróforos atenderam à demanda da segunda configuração programada na máquina. Portanto, combinando uma boa estratégia de ajuste no software do microscópio com a customização de anticorpos conjugados a fluoróforos específicos, foi possível desenvolver uma nova técnica de microscopia confocal intravital capaz de modificar o futuro das pesquisas na área da imunofenotipagem celular (Figura 2).

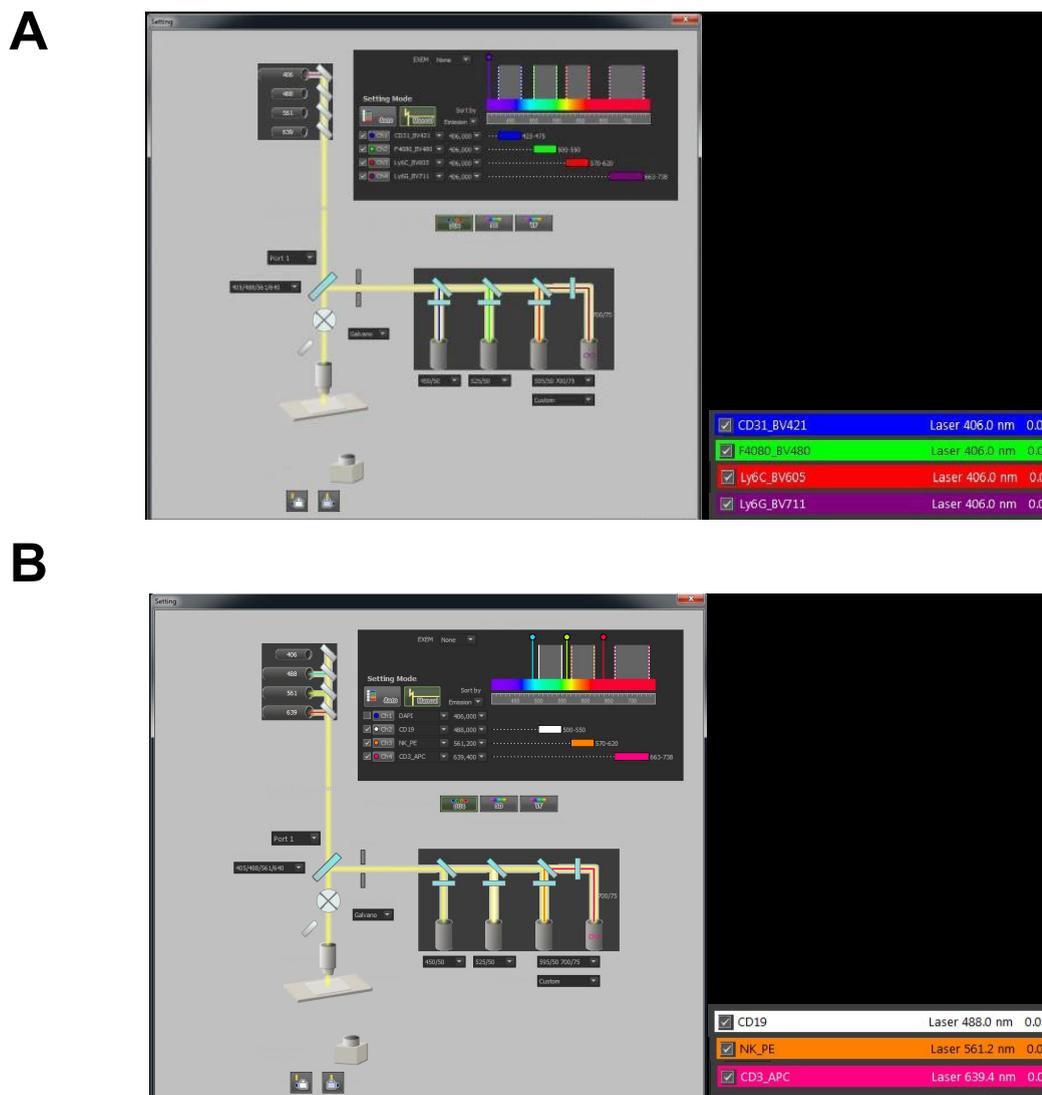


Figura 1. “Setting” de configuração do microscópio. (A) Mudanças na configuração padrão do microscópio permitem que os quatro canais operem sob um mesmo laser de excitação com comprimento de onda equivalente à 405nm. **(B)** Configuração padrão do microscópio em que cada canal opera sob um respectivo laser de comprimento de onda distinto, inativando o canal do laser de 405nm.

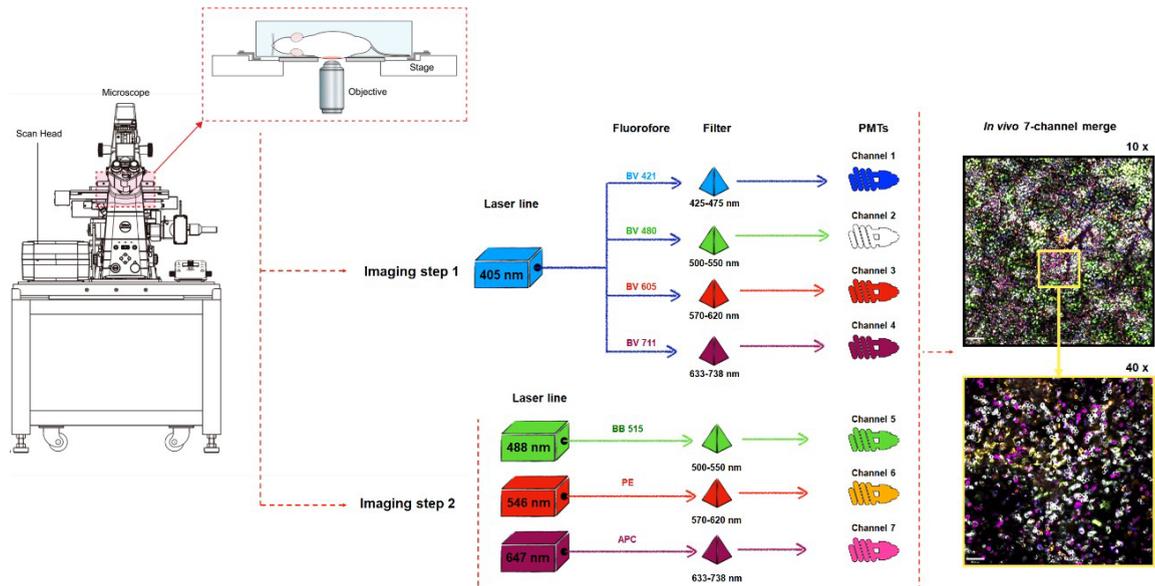


Figura 2. Diagrama do protocolo criado para microscopia confocal intravital *in vivo*. Desenho esquemático resumindo o protocolo utilizado. Na primeira configuração, vemos um único laser (405nm) trabalhando sob quatro canais, excitando 4 diferentes fluoróforos conjugados a anticorpos e permitindo a visualização de 4 tipos celulares distintos. Em uma segunda configuração, cada um dos três canais utilizados opera com seus respectivos lasers (488nm, 546nm e 6647nm) de forma padrão, obtendo, assim, mais 3 marcações celulares. De forma simultânea temos, então, a visualização de 7 tipos celulares.

4.2. Distintas populações imunes no baço de camundongos são visualizadas *in vivo* utilizando marcadores alvo-específicos para receptores de superfície celular

Uma vez que a estratégia óptica para a microscopia *in vivo* foi delineada, seguimos para a confecção de um painel de anticorpos específicos para receptores de superfície celular. Assim, foi feita uma seleção que viabilizaria a visualização e identificação dos principais subtipos de leucócitos (Tabela 1). Inicialmente, os anticorpos foram testados separadamente para ajustes de dosagem e calibragem do método. Em seguida, partimos aos testes com diferentes combinações até utilizarmos os sete anticorpos em conjunto. Por fim, as marcações foram realizadas com êxito, permitindo a visualização das estruturas vasculares, e de células linfoides e mieloides em todas as três idades estudadas (Figura 3).

Tabela 1. Painel de anticorpos conjugados a fluoróforos selecionados para execução do projeto.

Anticorpo	Célula-alvo
Anti-CD31	Células endoteliais (vasos)
Anti-F4/80	Macrófagos da polpa vermelha
Anti-Ly6C	Monócitos
Anti-Ly6G	Neutrófilos
Anti-CD19	Linfócitos B
Anti-NK1.1	Células NK e NKT
Anti-CD3	Linfócitos T e células NKT

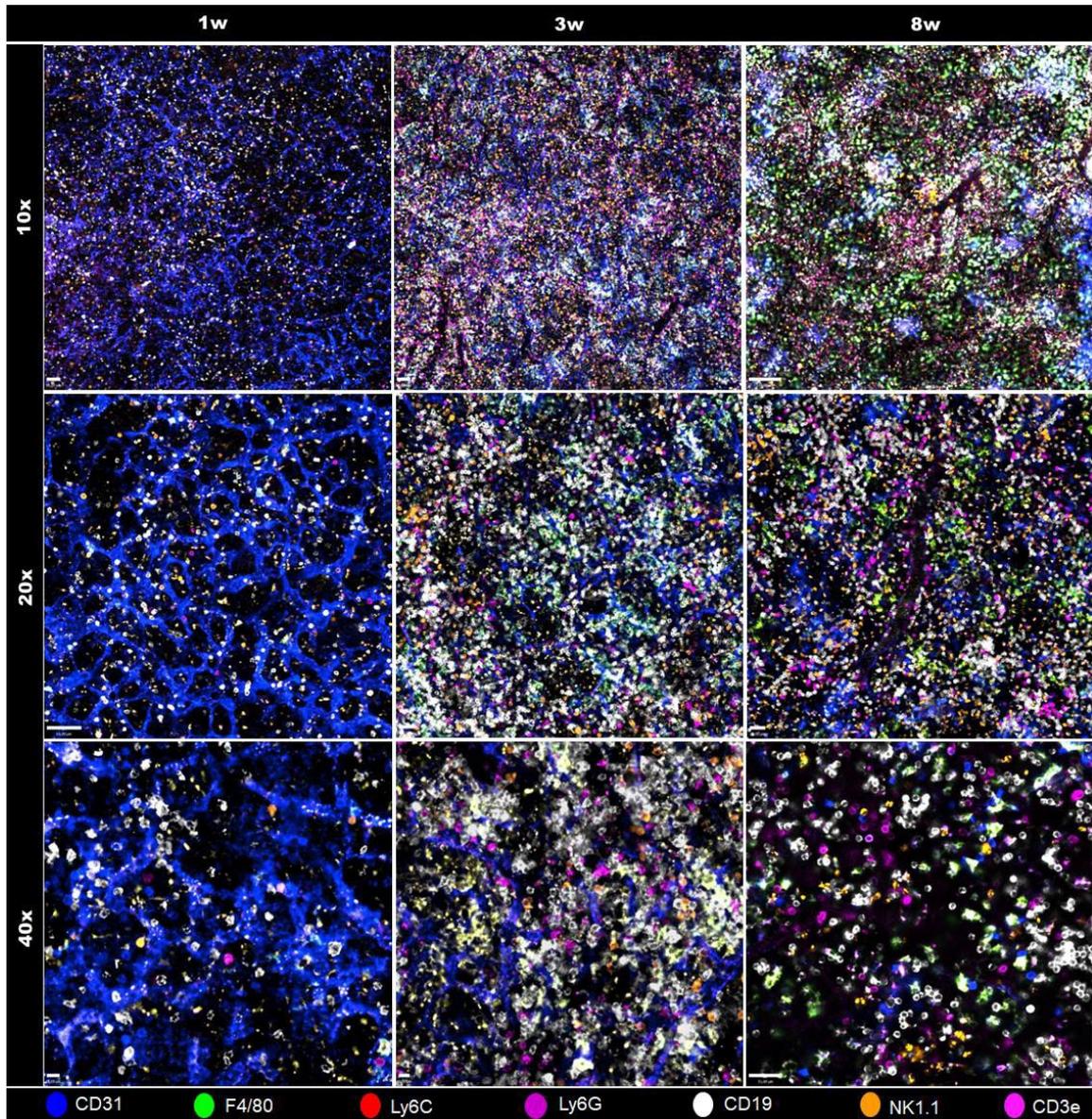


Figura 3. Visualização, *in vivo*, de sete tipos distintos de leucócitos no baço ao longo do desenvolvimento. Imagens de todos os canais mesclados mostrando as diferentes populações de células imunes no baço. Camundongos WT, em diferentes idades, receberam i.v. anti-CD31 (em azul), anti-F4-80 (em verde), anti-Ly6C (em vermelho), anti-Ly6G (em roxo), anti-CD19 (em branco), anti-NK1.1 (em laranja) e anti-CD3e (em magenta). A barra de escala representa 60 μ m.

4.3. A arquitetura dos vasos esplênicos e/ou a expressão de CD31 pelas células endoteliais se altera ao longo do tempo

Utilizando anti-CD31 BV421, uma molécula de adesão celular da superfamília das imunoglobulinas expressa por células endoteliais e alguns tipos celulares do sistema imune, buscamos visualizar a vasculatura do órgão por meio de microscopia, a fim de registrar e entender possíveis alterações no arranjo dos vasos ao longo do desenvolvimento. Grandes alterações puderam ser observadas na malha vascular (Figura 4). O camundongo com 7 dias de vida apresenta uma estrutura vascular esplênica distinta, que remete ao aspecto do arranjo de uma colméia. Isto é, vemos vasos curtos se ramificados, formando uma rede contínua. À partir da terceira semana de vida, essa arquitetura sofre perturbações: os vasos passam a se organizar de forma diferente e são mais alongados, de forma que não vemos mais uma rede interconectada, e mais áreas avasculares surgem. O que também se observa com o tempo é a chegada e o aumento de leucócitos no baço. Leucócitos estes que também expressam CD31, dificultando a distinção entre os componentes vasculares do órgão, uma vez que o número destas células é substancialmente alto. Na idade de 8 semanas, conseguimos visualizar apenas alguns vasos de maior calibre (ainda que com uma marcação bastante sutil) e algumas arteríolas no baço dos animais. Mais uma vez, o grande número de leucócitos torna a distinção da vasculatura um tanto quanto desafiadora.

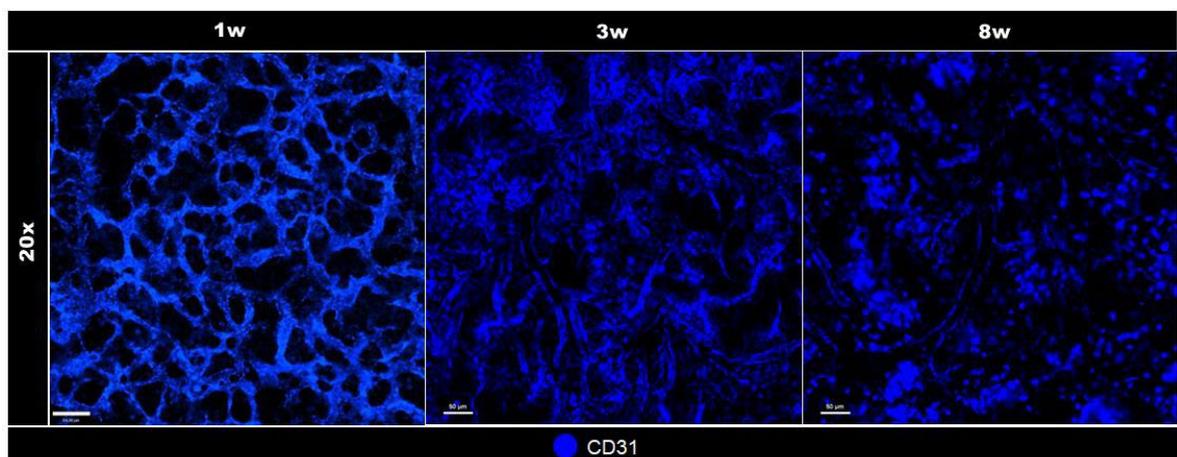


Figura 4. Estrutura vascular esplênica ao longo da vida. Imagens de microscopia mostrando os vasos (azul). A barra de escala representa 50µm.

4.4. A composição e a organização das populações celulares imunes do baço sofrem perturbações ao longo do desenvolvimento

Visto que a densidade celular do baço de neonatos é muito diferente comparado ao adulto, fizemos uma análise quantitativa da composição imune do ambiente esplênico nas diferentes idades, buscando identificar algumas das principais populações de leucócitos presentes. Para tal, as imagens capturadas por microscopia confocal foram submetidas à contagem manual. Ainda, como mencionado anteriormente, para identificação do tipo celular foi preciso criar um critério baseado não somente na marcação obtida pelos anticorpos utilizados, mas também na morfologia da célula estudada.

Nos animais recém-nascidos (1 semana; 1w), o baço demonstra um baixo volume celular imune total (Figuras 5 e 6). A população de macrófagos da polpa vermelha, definida como $F480^+Ly6C^{+/-}$, com morfologia estrelar e vacúolos no citoplasma, apresenta uma baixa frequência celular (menos de 1% das células totais) (Figura 7A e 7H). Os monócitos, células arredondadas $Ly6C^+F480^{int/+}Ly6G^{-/int}$, também constituem uma população pequena nessa idade (~3.5%) (Figura 7B), e os neutrófilos, células arredondadas e com perfil $Ly6G^+Ly6C^-F4/80^-$, são mais raros (~0,5%) (Figura 7C). Em relação às células de linhagem linfoide, os linfócitos B compreendem cerca de 77% das células totais (Figura 7D), e encontram-se mais distantes e esparsados entre si. Os linfócitos T, por sua vez, compõem cerca de 8% (Figura 7E) das células imunes esplênicas na primeira semana de vida, uma proporção bem reduzida em relação ao adulto. Por último, as populações de linfócitos NK e NKT compreendem, respectivamente, 9% e ~1,7% (Figura 7F-G) do sistema imune do baço.

Após 3 semanas de vida, observamos um aumento expressivo de células totais no ambiente esplênico, e mais especificamente, algumas alterações são observadas na composição celular imune destes camundongos infantis (Figuras 5 e 6). Os macrófagos já dispõem de uma população discretamente maior (~2,5%) (Figura 7A). Os monócitos apresentam um aumento populacional (~7%) (Figura 7B), mostrando-se como um grupo distinto comparado aos adultos. Neutrófilos sofrem uma modesta redução (~0,25%) (Figura 7C). Linfócitos B aumentam em número e permanecem como a maior população no baço (~73%) (Figura 7D), seguidos pelos linfócitos T (~13%) (Figura 7E). De forma mais detalhada, a partir desta idade, percebemos uma diferença quanto à organização das células B. Podemos ver que as mesmas

localizam-se bem próximas umas das outras, muitas vezes se arranjando em agregados celulares (“clusters”), e com um alto nível de contato entre si. Por fim, células NK sofrem uma certa redução em sua frequência (~4%) (Figura 7F), assim como as células NKT (~0,6%) (Figura 7G).

Seguindo para o camundongo adulto (8 semanas; 8w) ainda observamos algumas mudanças, apesar de bem mais sutis (Figuras 5 e 6). Dentre as células mieloides, testemunhamos uma pequena redução na população de macrófagos (~1,5%) (Figura 7A), assim como na população de monócitos (4,7%) (Figura 7B). Neutrófilos dobram sua frequência (~0,6%) quando comparado aos camundongos com três semanas de vida, porém, ainda constituem um grupo bastante reduzido (Figura 7C). Em relação ao compartimento linfoide, vemos mais uma discreta redução na proporção de linfócitos B (~68%) (Figura 7D), enquanto os linfócitos T seguem com um certo aumento em sua frequência (~18,5%) (Figura 7E), mantendo-se como a 2ª população imune mais representativa no baço (Figura 7H). Ao avaliar a população de linfócitos NK, ocorre um aumento discreto da mesma na 8ª semana (~6%) (Figura 7F), e as células NKT, mantêm sua frequência estável (Figura 7G), ainda como um grupo de pequena representatividade/ discreto.

Por fim, algumas observações que valem ser mencionadas e/ou reforçadas após essa caracterização/descrição: 1) os neutrófilos identificados e contabilizados foram avistados no interior dos vasos, e sua frequência é consideravelmente estável ao longo do desenvolvimento. Não conseguimos identificar neutrófilos residentes no parênquima esplênico. 2) A população de células B se constitui como a maior em todas as três idades (Figura 7H); 3) pelas imagens, é possível ver que os linfócitos T se localizam preferencialmente ao redor de estruturas vasculares. Uma outra interessante observação resultante dos vídeos 3D realizados, é que estas células se distribuem ao longo de todo o eixo transversal do órgão. Isto é, enquanto a maioria das populações celulares são vistas e/ou se concentram em uma região mais interna/central do baço, os linfócitos T são encontrados em todas as seções do órgão, desde uma “camada” superior mais próxima da cápsula até a seção mais próxima da cápsula na face oposta. 4) Pelas imagens, é possível concluir que o baço na terceira semana de vida já se assemelha mais ao baço adulto, tanto em questão à composição quanto à arquitetura, enquanto os neonatos possuem um órgão mais distinto em ambos os quesitos.

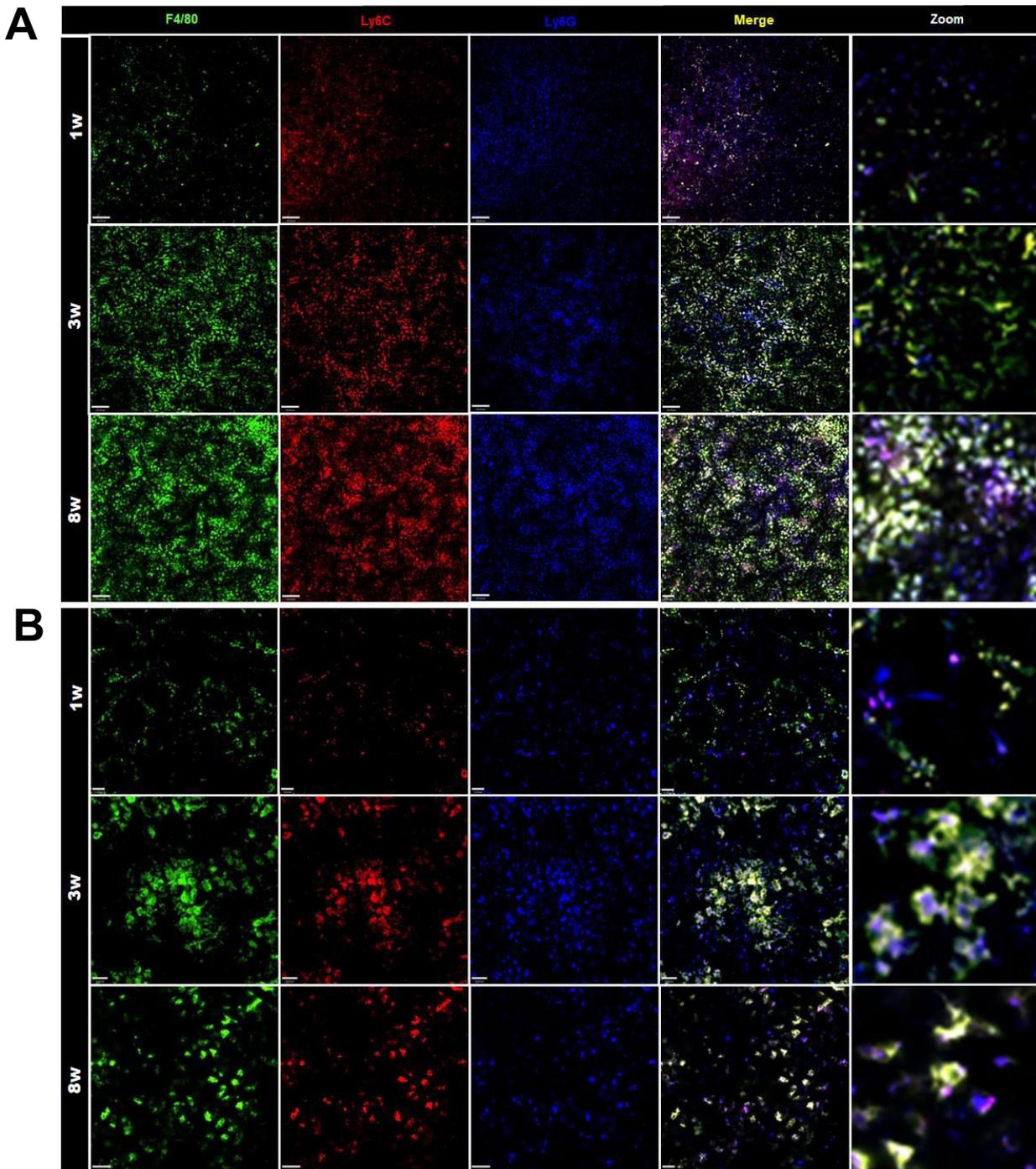


Figura 5. Distribuição das células imunes de linhagem mieloide no baço durante o desenvolvimento. (A) Painel de células no aumento de 10x. (B) Painel de células no aumento de 20x. Células F4/80⁺ (verde), Ly6C⁺ (vermelho), Ly6G⁺ (azul) e duplo-positivas (amarelo). A barra de escala representa 60µm.

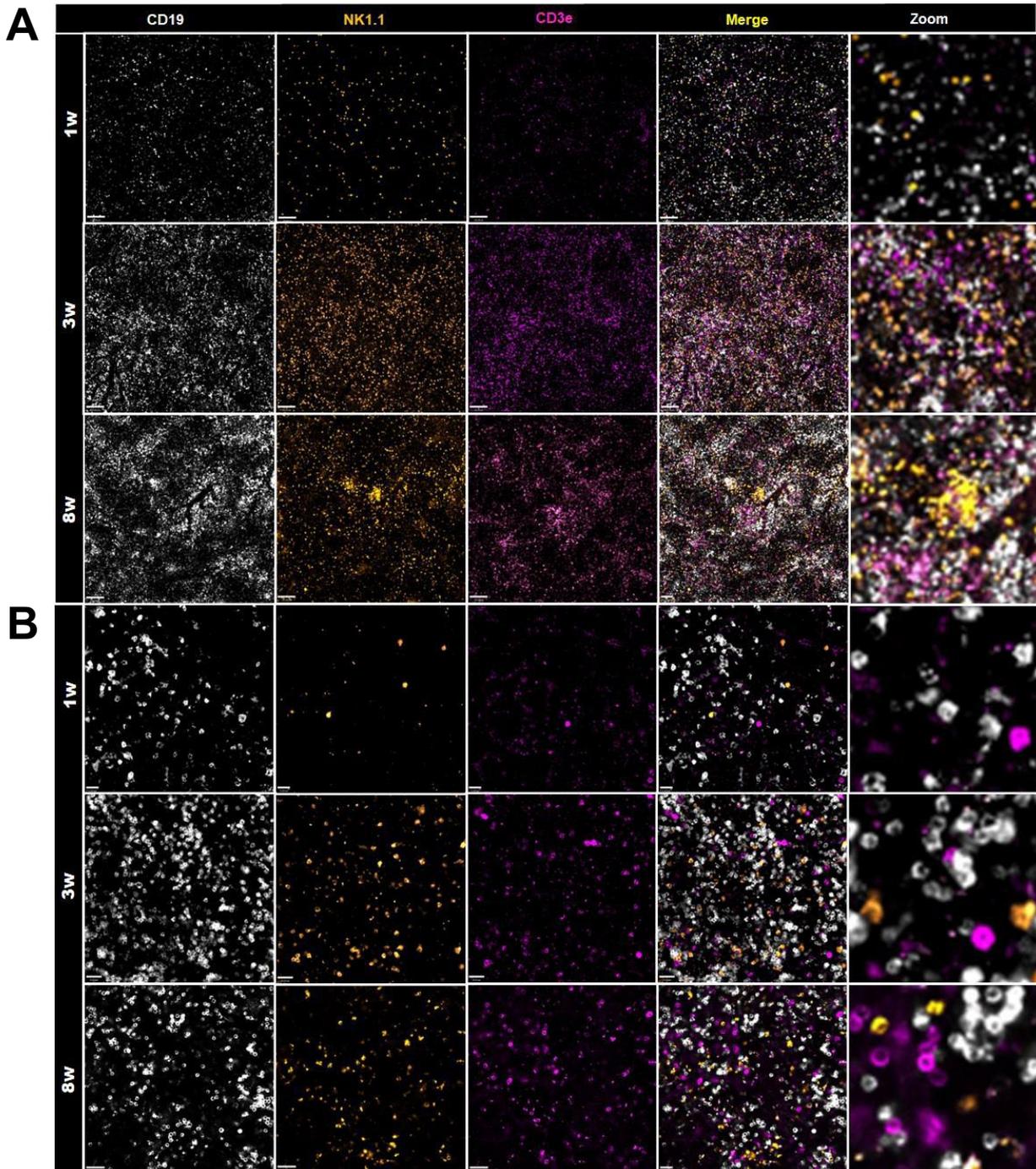
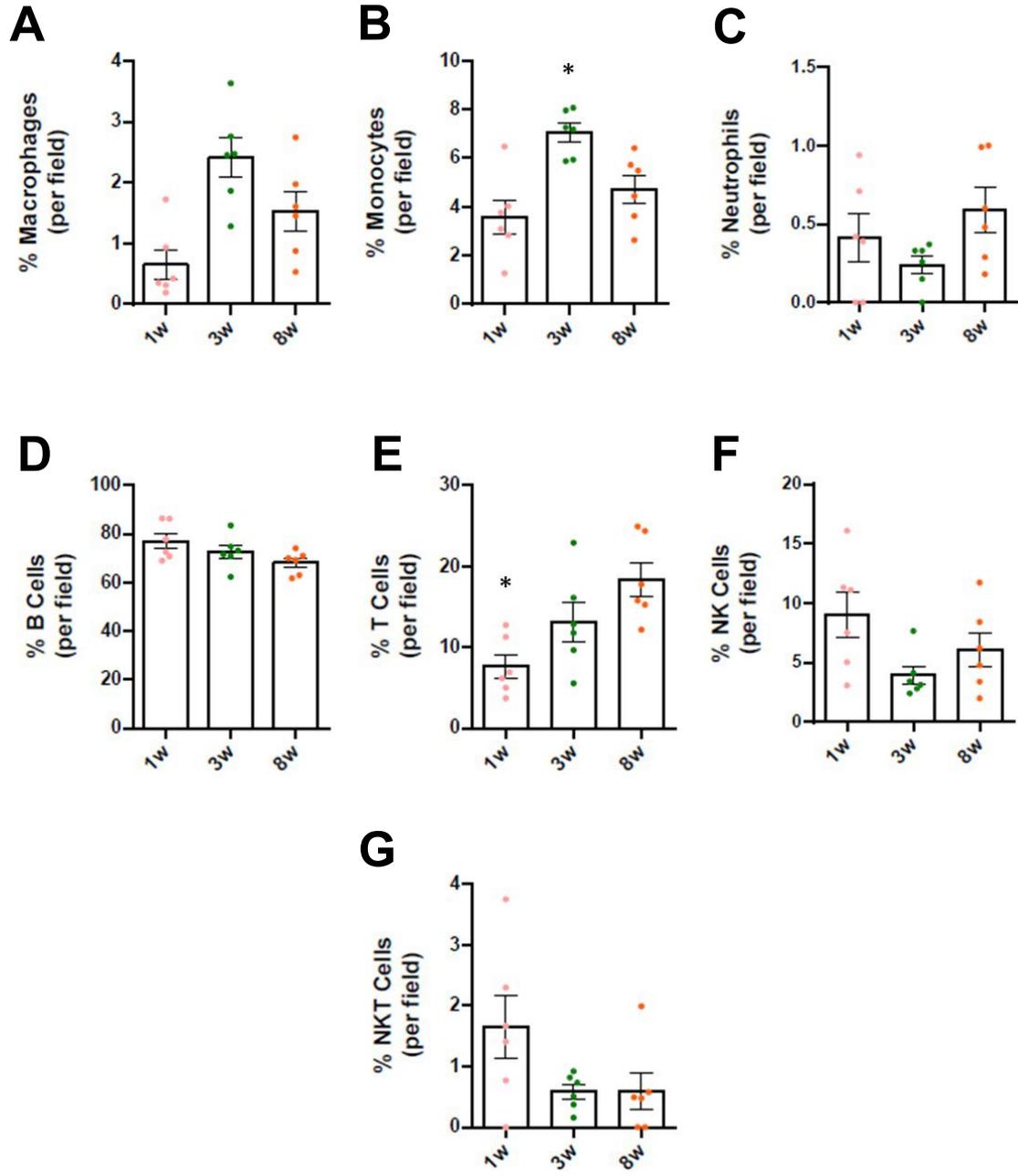


Figura 6. Distribuição das células imunes de linhagem linfoide no baço durante o desenvolvimento. (A) Painel de células no aumento de 10x. (B) Painel de células no aumento de 20x. Linfócitos CD19⁺ (branco), NK1.1⁺ (laranja) e CD3e⁺ (magenta). A barra de escala representa 60µm.



H

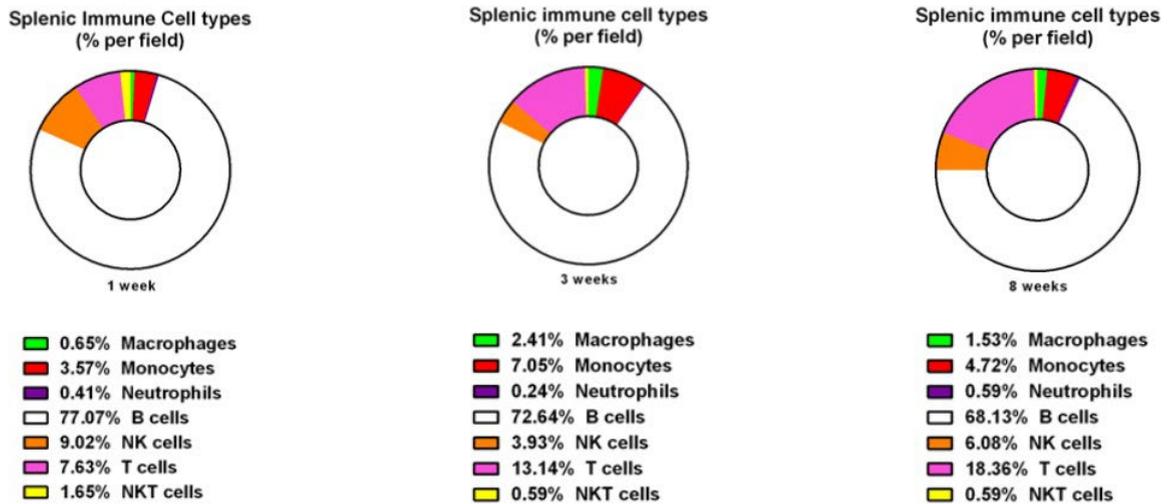


Figura 7. Composição celular imune do baço em três fases distintas da vida.

(A-G) Quantificação das populações de células. (A) Macrófagos. (B) Monócitos. (C) Neutrófilos. (D) Células B. (E) Células T. (F) Células NK. (G) Células NKT. (H) Gráficos de setor mostrando a constituição imune média do baço (%) em cada uma das idades estudadas. Número de animais por grupo = 6. Campos contados por animal = 3. *Indica significância estatística em relação ao camundongo de 8 semanas.

4.5. Células de mesma linhagem apresentam uma dinâmica similar ao longo do desenvolvimento

Para fins de comparação e investigação das diferenças no microambiente esplênico ao longo do desenvolvimento, buscamos diferentes maneiras de explorar os resultados obtidos por meio das quantificações das imagens. Realizamos, assim, uma análise de componente principal (PCA), que mostra que os grupos se arranjam, de certa forma, em clusters” separados (Figura 8). Isto é, há uma certa identidade imune-celular do baço para cada período da vida. No entanto, o grupo de 8 semanas é muito heterogêneo e essa grande dispersão dificulta a definição de um perfil celular característico para a idade adulta. Na análise de componente principal (PCA), a localização do ponto (representação de cada indivíduo) é importante, sendo definida por um conjunto de cálculos matemáticos, e quanto mais distante do eixo X ele se encontra, mais diferente ele é. Os pontos mais próximos neste tipo de representação manifestam perfis mais similares entre si, o que facilita a análise comparativa e auxilia na interpretação das relações entre os grupos, indivíduos e suas características.

Em seguida, também desenhamos um *heatmap* (Figura 9) na tentativa de construir uma relação entre os dados e passar a informação de forma mais didática/clara. Nele, a escala de cor não deve ser considerada de forma quantitativa, uma vez que a representação não considera apenas os resultados significativamente relevantes dos testes estatísticos. No entanto, esse diagrama é uma representação que possui um grande “apelo visual” e permite inferências sobre a dinâmica das populações nas diferentes idades. Fica fácil perceber que as dinâmicas de células linfoides e mieloides são semelhantes quando consideramos linhagem ao longo do tempo, mas aparentemente diferentes entre si dentro de uma mesma idade, com exceção das células T. Ainda, é possível inferir que os camundongos infantis (3 semanas) e adultos (8 semanas) são mais semelhantes entre si, fazendo com que o baço do neonato se destoe quanto ao seu perfil de composição celular.

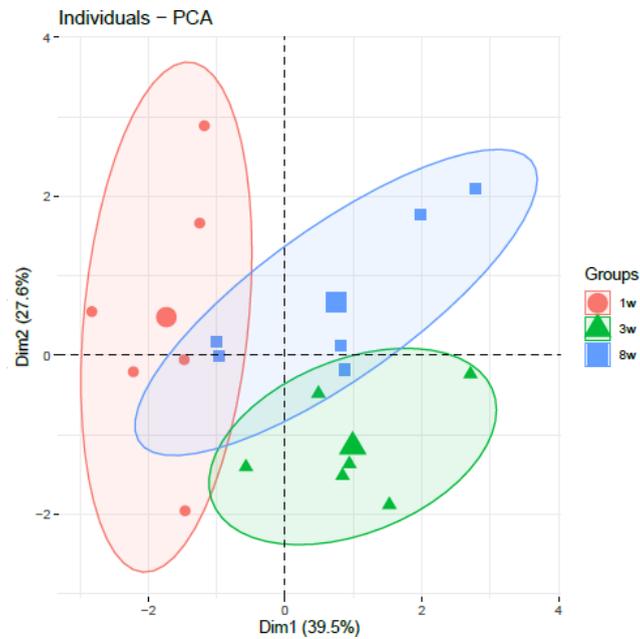


Figura 8. Perfil imune esplênico em cada fase da vida. Gráfico da análise de componente principal, mostrando a distribuição dos indivíduos (representados por pontos) dentro de cada grupo estudado.

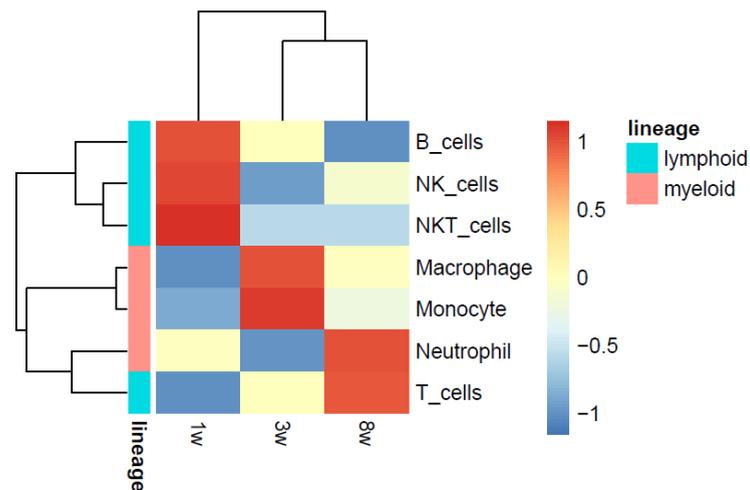


Figura 9. Dinâmica das populações celulares agrupadas pela linhagem celular. *Heatmap* representando, de forma qualitativa, a variação de cada população imune ao longo do desenvolvimento, e relacionando os tipos celulares que apresentam dinâmicas similares, assim como os grupos mais semelhantes entre si.

4.6. Uma outra dinâmica é observada ao utilizar a citometria de fluxo como método experimental

Em posse dos dados extraídos dos experimentos utilizando a microscopia confocal, decidimos avaliar a transição celular esplênica fazendo uso de uma outra técnica: a citometria de fluxo. Por ser um método com propósito puramente quantitativo, a citometria permite um entendimento e análise mais global acerca da composição celular do órgão a ser estudado, sendo amplamente utilizada e consagrada na pesquisa. Assim, utilizando um painel de anticorpos similar ao empregado na microscopia, exceto pela retirada do anti-CD31 e adição do anti-CD45, realizamos os experimentos em camundongos nas mesmas idades: 1,3 e 8 semanas.

Considerando os eventos CD45+, e de acordo com os marcadores escolhidos, identificamos as sete populações celulares estudadas pelo protocolo de microscopia, utilizando a estratégia de 'gates' descrita previamente.

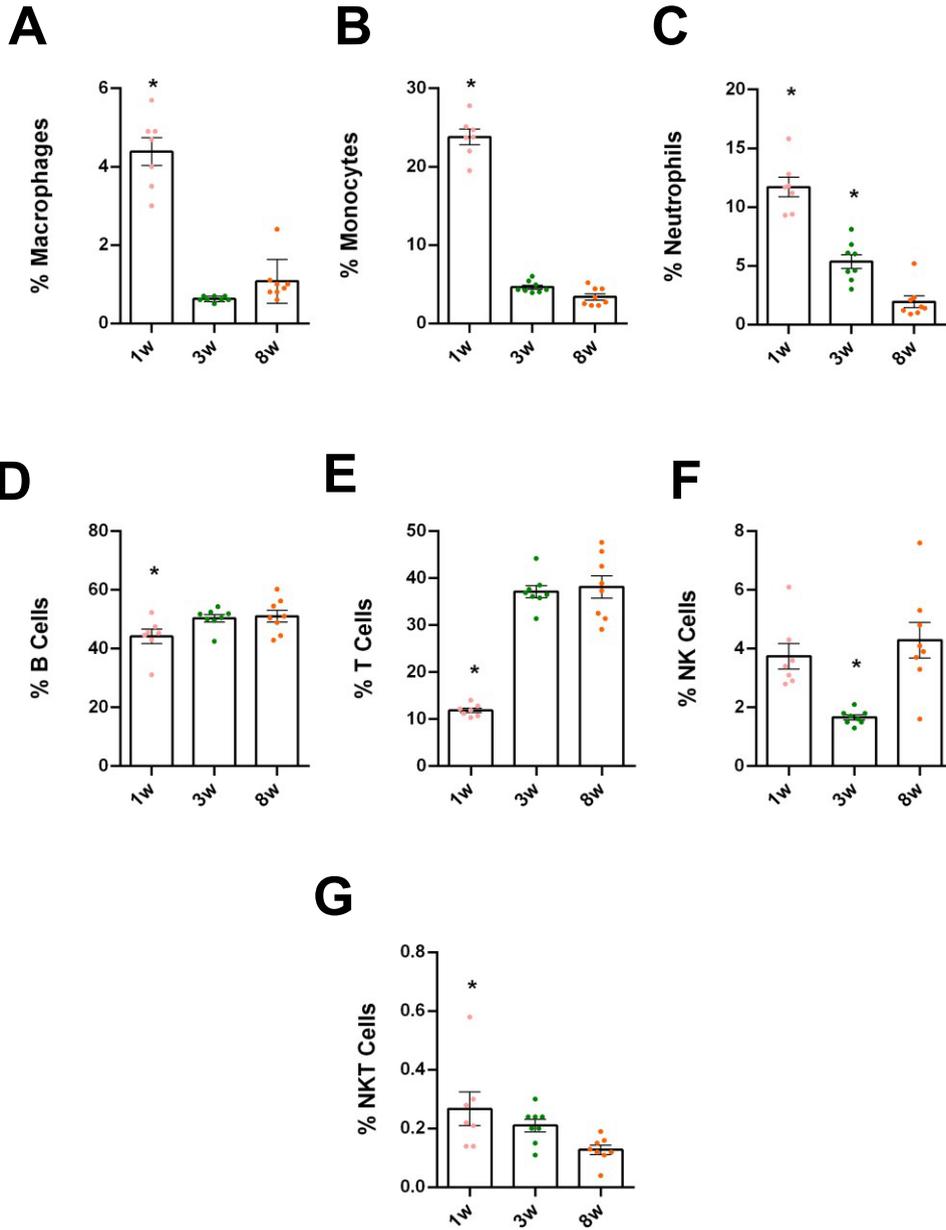
Com uma semana de vida, as células de linhagem mieloide apresentam populações significativamente maiores em comparação aos camundongos adultos. A população de macrófagos compreende uma média de 4,4% das células (Figuras 10A), monócitos representam a segunda maior população imune esplênica (~24%) (Figura 10B) e os neutrófilos ficam em torno de 12% (Figura 10C). Nesta idade, os linfócitos B já são o principal tipo celular imune presente no baço (~44%) (Figuras 10D e 10H) e os linfócitos T encontram-se reduzidos em relação ao adulto (~12%) (Figura 10E), enquanto as células NK e NKT possuem proporções bem similares (~4% e 0,3%, respectivamente) (Figura 10F-G).

Na terceira semana, a composição celular sofre uma profunda modificação, manifestando um perfil mais próximo ao encontrado no baço de camundongos adultos (Figura 9H). Macrófagos têm uma brusca redução em relação aos neonatos, passando para uma frequência média de 0,6% (Figura 10A). Monócitos também experenciam situação semelhante, passando a representar ~4,6% (redução de 19%) das células imunes (Figura 10B). Os neutrófilos também revelam uma queda populacional (~5,4%), mas ainda compõem um grupo diferente em relação ao avaliado nos adultos (Figura 10C). Os linfócitos B, como principal tipo celular, passam a compreender cerca de 50% das células imunes do baço (Figura 10D), e os linfócitos T mais que triplicam em quantidade (~37%) (Figura 10E), ambos já com um perfil populacional similar aos animais de oito semanas. As células NK sofrem uma redução

(~1,70%), mostrando-se um grupo distinto (Figura 10F). Por fim, uma certa estabilidade é observada em relação à população de células NKT (Figura 10G).

Ao fazermos um estudo do órgão no camundongo adulto, averiguamos um forte predomínio de células linfoides. Estas compreendem, aproximadamente, 94% do sistema imune esplênico na referida idade, sendo: ~50% linfócitos B, ~39% linfócitos T, ~5% células NK e 0,1% células NKT. Células de linhagem mieloide, em contrapartida, têm uma baixa representatividade. Macrófagos somam ~1,1% das células, monócitos, ~3,2%, e neutrófilos 2% (Figura 10H).

Pela citometria, observamos, portanto, uma tendência de redução das populações mieloides ao longo da vida, enquanto os tipos celulares linfoides aumentam em quantidade ou mantêm-se estáveis. Assim, apesar de diferenças em relação aos dados obtidos pela microscopia, confirmamos que os neonatos manifestam um perfil celular bem diferente, enquanto os infantes são mais semelhantes aos adultos. Portanto, profundas alterações ocorrem até a terceira semana de vida no microambiente esplênico, denotando um período de transição importante na vida do indivíduo.



H

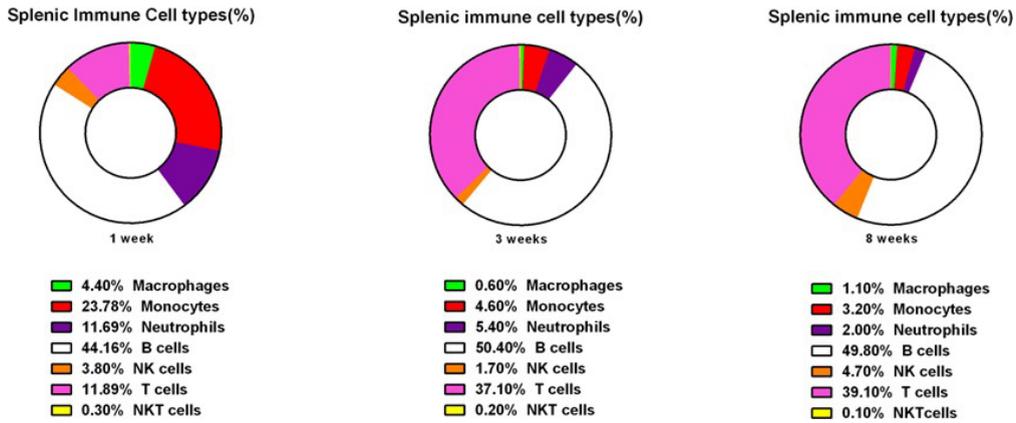


Figura 10. Análise, por citometria de fluxo, das populações celulares imunes do baço em três fases distintas da vida. (A-G) Quantificação das populações celulares. **(A)** Macrófagos. **(B)** Monócitos. **(C)** Neutrófilos. **(D)** Células B. **(E)** Células T. **(F)** Células NK. **(G)** Células NKT. **(H)** Gráficos de setor mostrando a constituição imune média do baço (%) em cada uma das idades estudadas. Número de animais por grupo = 8. *Indica significância estatística em relação ao camundongo de 8 semanas.

4.7. Camundongos infantis são mais suscetíveis à infecção por *Plasmodium chabaudi*

Uma vez validado o protocolo em microscopia confocal em organismos saudáveis, buscamos fazer essa validação também em um modelo de infecção bem estabelecido em murinos, e que acometesse o baço de forma notável. Assim, trabalhamos com o protozoário *Plasmodium chabaudi*, agente etiológico da malária em roedores. Para padronizar o modelo de infecção em camundongos, inoculamos 1×10^5 eritrócitos infectados com o *Plasmodium*, por via intravenosa, em animais nas idades de 2, 3 e 7-8 semanas de vida, e acompanhamos a progressão da doença.

Enquanto animais adultos (7-8 semanas) se mostraram resistentes à infecção, com 100% de sobrevivência dos indivíduos, camundongos infantis (3 e 4 semanas) foram mais susceptíveis, com uma taxa de 50% de mortalidade no grupo (Figura 11A). Por meio dos esfregaços sanguíneos, acompanhamos a parasitemia ao longo do quadro infeccioso, e verificamos que, enquanto o pico de eritrócitos infectados no adulto no 7º dia pós infecção é de ~30%, no infante este pico corresponde a ~55%, revelando uma hiper parasitemia (Figura 11B). Além disso, vimos que no 18º dia pós-infecção não se detecta mais eritrócitos parasitados na circulação dos camundongos adultos. Infantes, no entanto, ainda apresentam um quadro de parasitemia persistente, com uma média de 20% dos eritrócitos infectados até o vigésimo dia após o inóculo. Somente após o 20º dia o índice de células vermelhas infectadas começa a reduzir, e a partir do 22º dia a parasitemia passa a não ser evidente (>1%) no grupo dos infantis. Portanto, ao longo de todo o curso da infecção, a parasitemia nos infantis é maior do que no grupo em adultos.

Diante de tal cenário, observamos que a malária induz distintos perfis patológicos em infantis e nos adultos, o que condiz com dados clínicos publicados que evidenciam maiores índices de morbidade e mortalidade por malária em crianças.

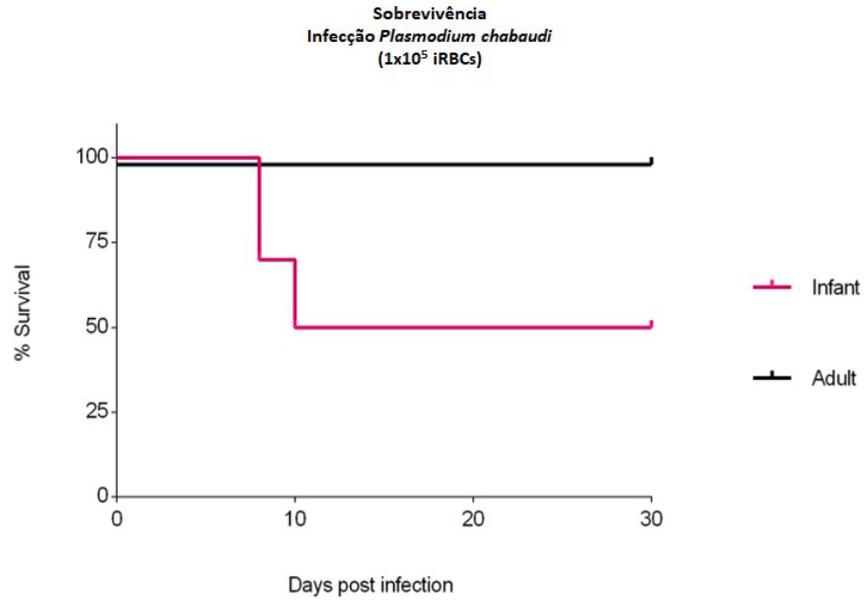
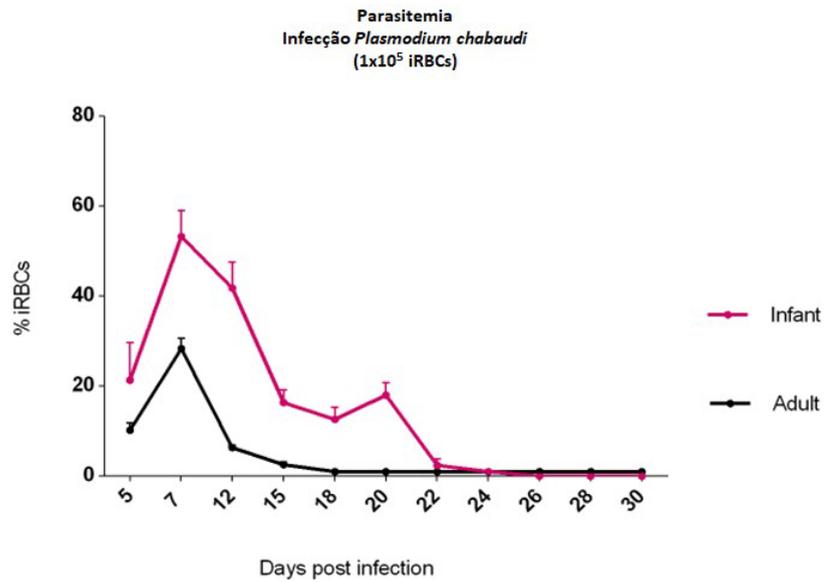
A**B**

Figura 11. Susceptibilidade de camundongos infantiles à infecção por *P. chabaudi*. (A) Curva de sobrevivência ao inóculo (i.v.) de 1×10^5 eritrócitos infectados (iRBCs). (B) Parasitemia observada durante 30 dias após o inóculo de 1×10^5 iRBCs.

4.8. O perfil celular imune é reduzido drasticamente tanto em camundongos infantes, quanto em adultos infectados

Para avaliar e tentar compreender os efeitos do contexto patológico da malária no microambiente esplênico, animais infectados pelo parasito, tanto adultos quanto infantes, foram submetidos à microscopia intravital 7 dias após a infecção. Pelas imagens (Figuras 12 e 13), é notável que a malária causa grandes perturbações na arquitetura e arranjo das células imunes no baço de ambos os grupos estudados. Também, por meio da observação das imagens, é perceptível a redução do número de células em camundongos infectados, quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 14).

Dessa forma, para fins de comparação, as imagens capturadas do baço de animais controle e de animais infectados, de cada uma das idades, foram submetidas ao mesmo processo de contagem manual realizado e descrito previamente. Ao contabilizarmos os leucócitos contidos no campo da imagem, verificamos uma redução de ~50% da celularidade total no baço dos camundongos infectados em comparação ao grupo controle (Figura 15A). De maneira mais detalhada, identificamos uma depleção significativa no número de monócitos, neutrófilos, linfócitos B, linfócitos T e células NKT em ambas as idades (Figura 15C-G). Os macrófagos (Figura 15B) e as células NK (Figura 15H), contudo, têm suas respectivas populações praticamente inalteradas ou sofrendo uma pequena redução devido ao quadro infeccioso.

Além disso, também notamos a ocorrência de regiões mais escuras e isentas de qualquer tipo celular no baço dos animais acometidos pela malária (Figura 16A). Tais regiões foram quantificadas e, em ambos os grupos – infantes e adultos -, elas correspondem a ~40% da área total das imagens (Figura 16B). Provavelmente, refere-se a áreas onde ocorreram processos de lesão do tecido.

Sendo assim, apesar das diferenças nas taxas de mortalidade por malária, infantes e adultos exibem mudanças significativas/expressivas no repertório imune do baço durante a infecção pelo protozoário *Plasmodium*, motivando novos questionamentos acerca do aspecto que de fato compromete a resposta dos infantes frente ao desafio imposto pela doença da malária.

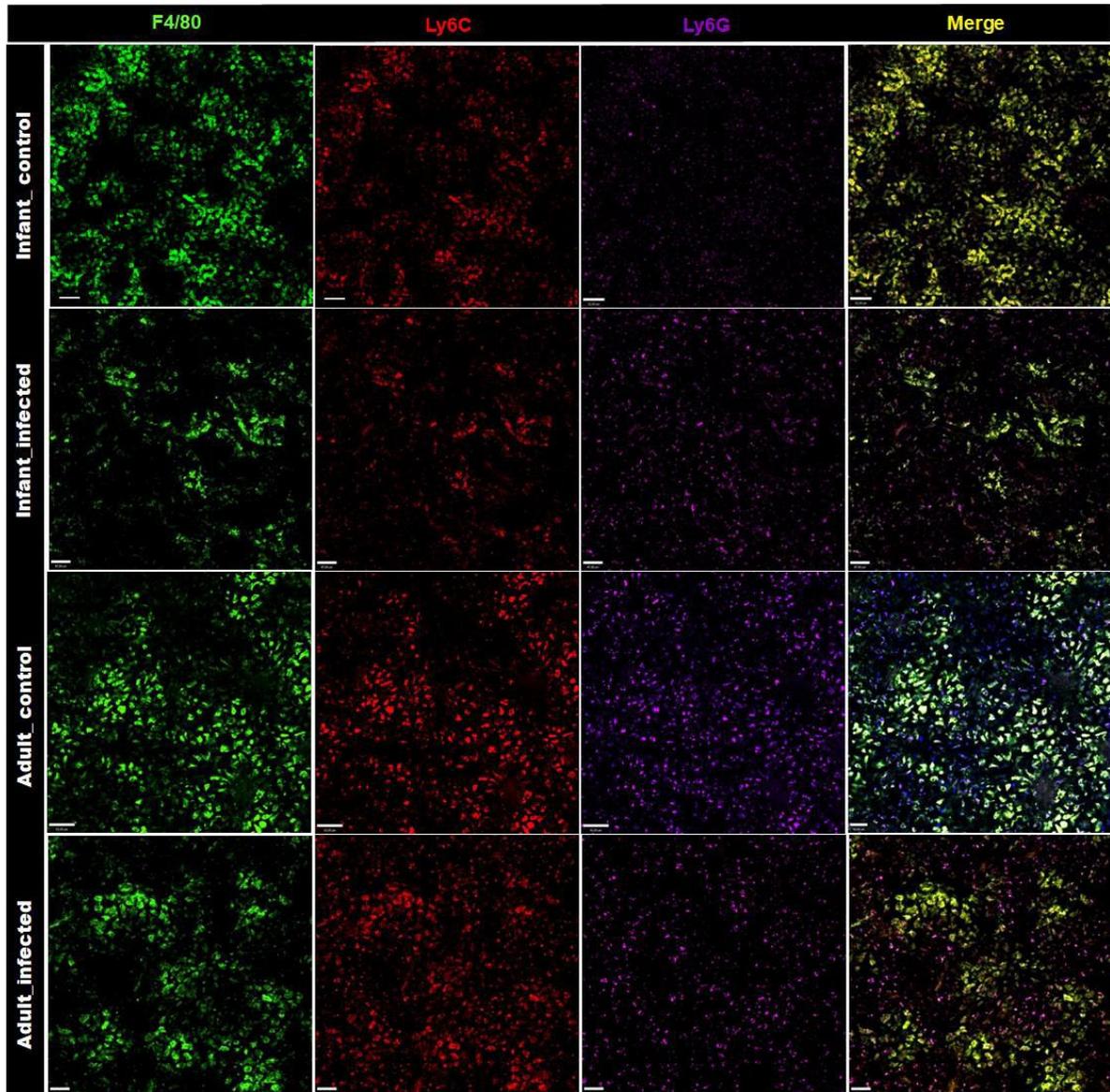


Figura 12. Perturbações no perfil celular mieloide do baço em decorrência do quadro infeccioso. Painel de células mieloides de camundongos dos grupos controle e infectado, nas idades de 3 e 8 semanas. Células F4/80⁺ (verde), Ly6C⁺ (vermelho), Ly6G⁺ (roxo) e duplo-positivas (amarelo), no aumento de 20x. A barra de escala representa 60µm.

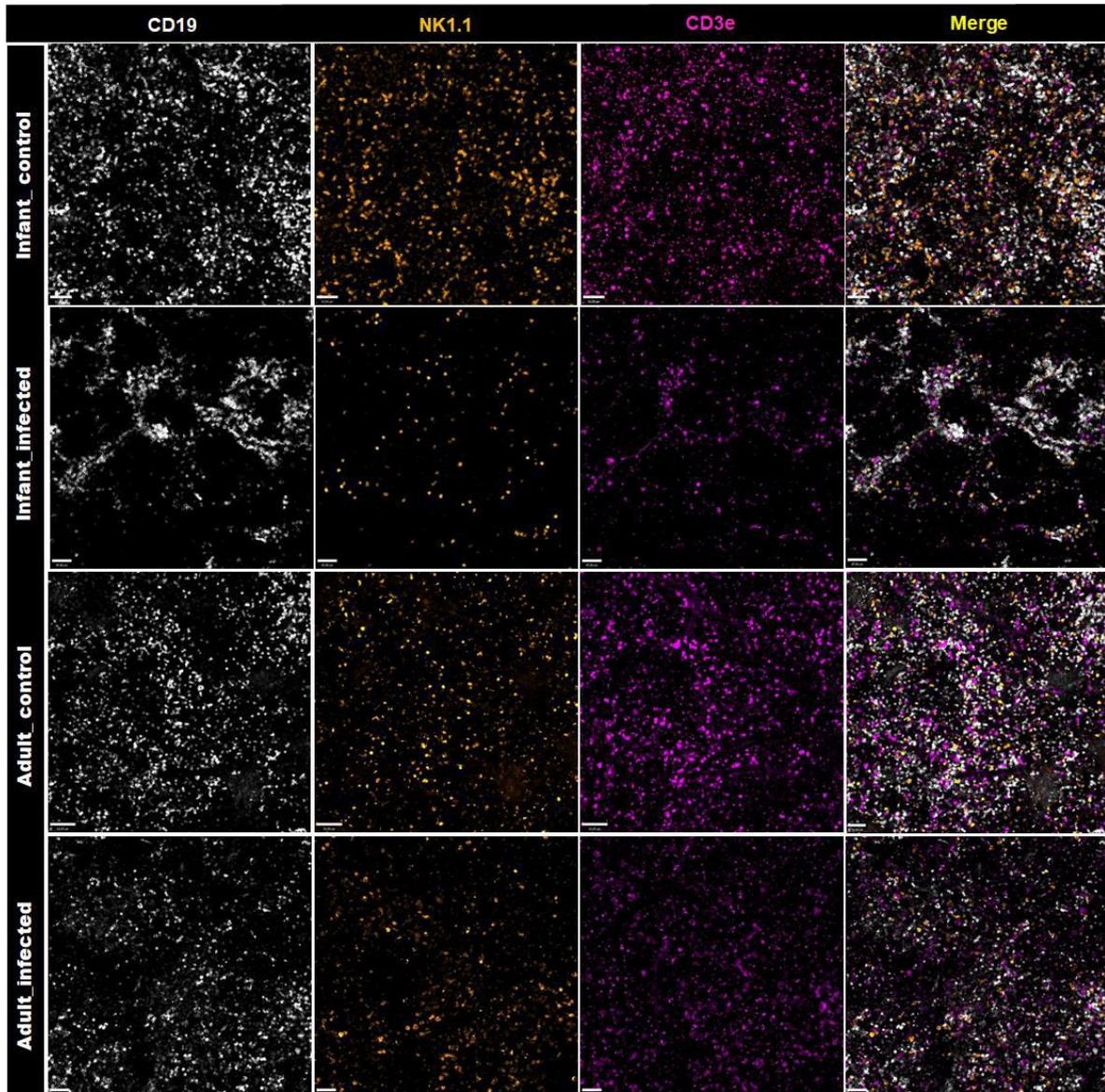


Figura 13. Perturbações no compartimento celular linfóide do baço em decorrência da infecção parasitária. Painel de células linfóides de camundongos dos grupos controle e infectado, em ambas as idades estudadas. Linfócitos CD19⁺ (branco), NK1.1⁺ (laranja) e CD3e⁺ (magenta), no aumento de 20x. A barra de escala representa 60µm.

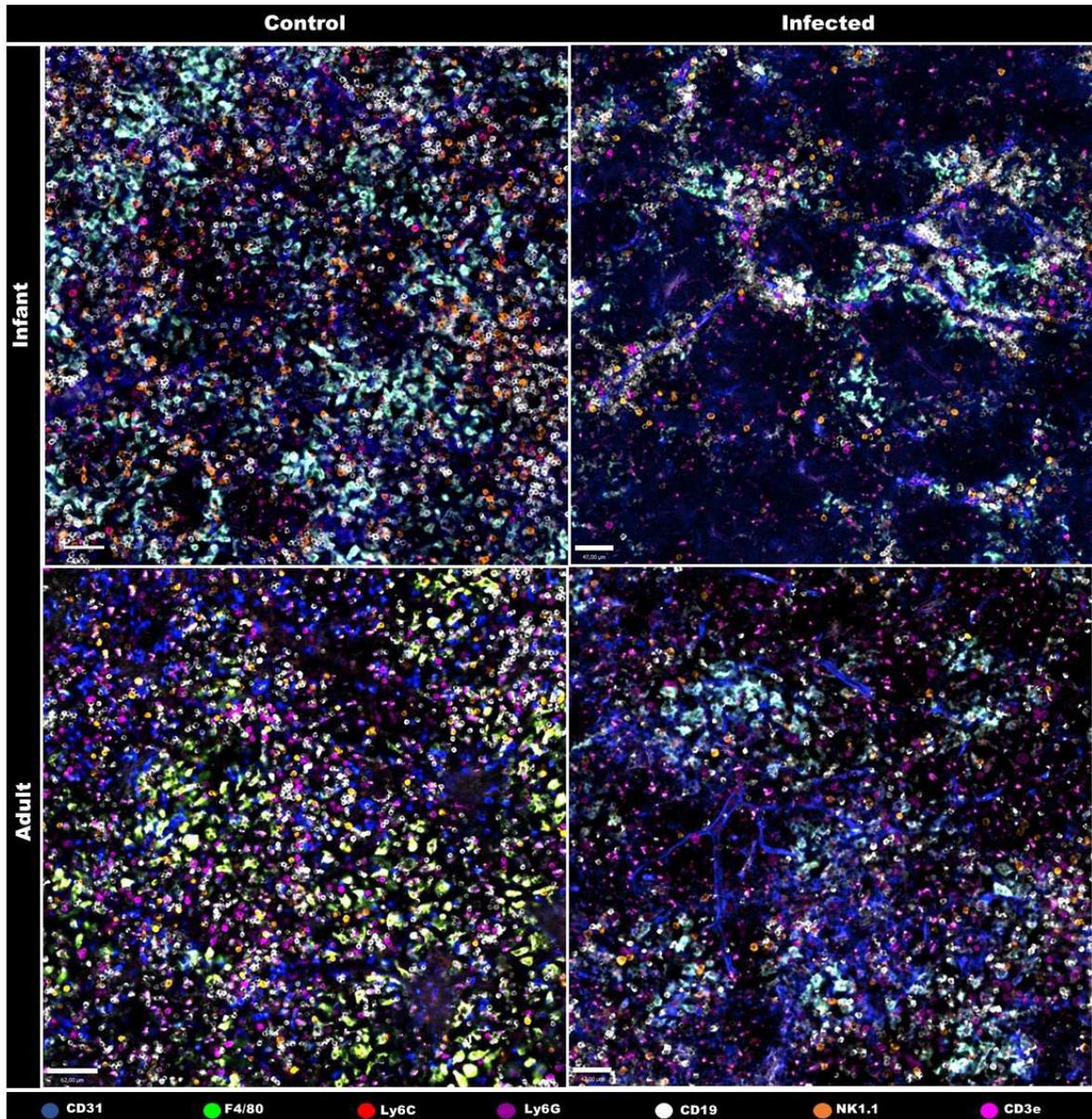


Figura 14. Comparação do perfil celular do baço em decorrência da infecção parasitária. Imagens de todos os canais mesclados mostrando as diferentes populações de células imunes no baço. Camundongos WT de todos os grupos receberam i.v. anti-CD31 (em azul), anti-F4-80 (em verde), anti-Ly6C (em vermelho), anti-Ly6G (em roxo), anti-CD19 (em branco), anti-NK1.1 (em laranja) e anti-CD3e (em magenta). A barra de escala representa 60μm.

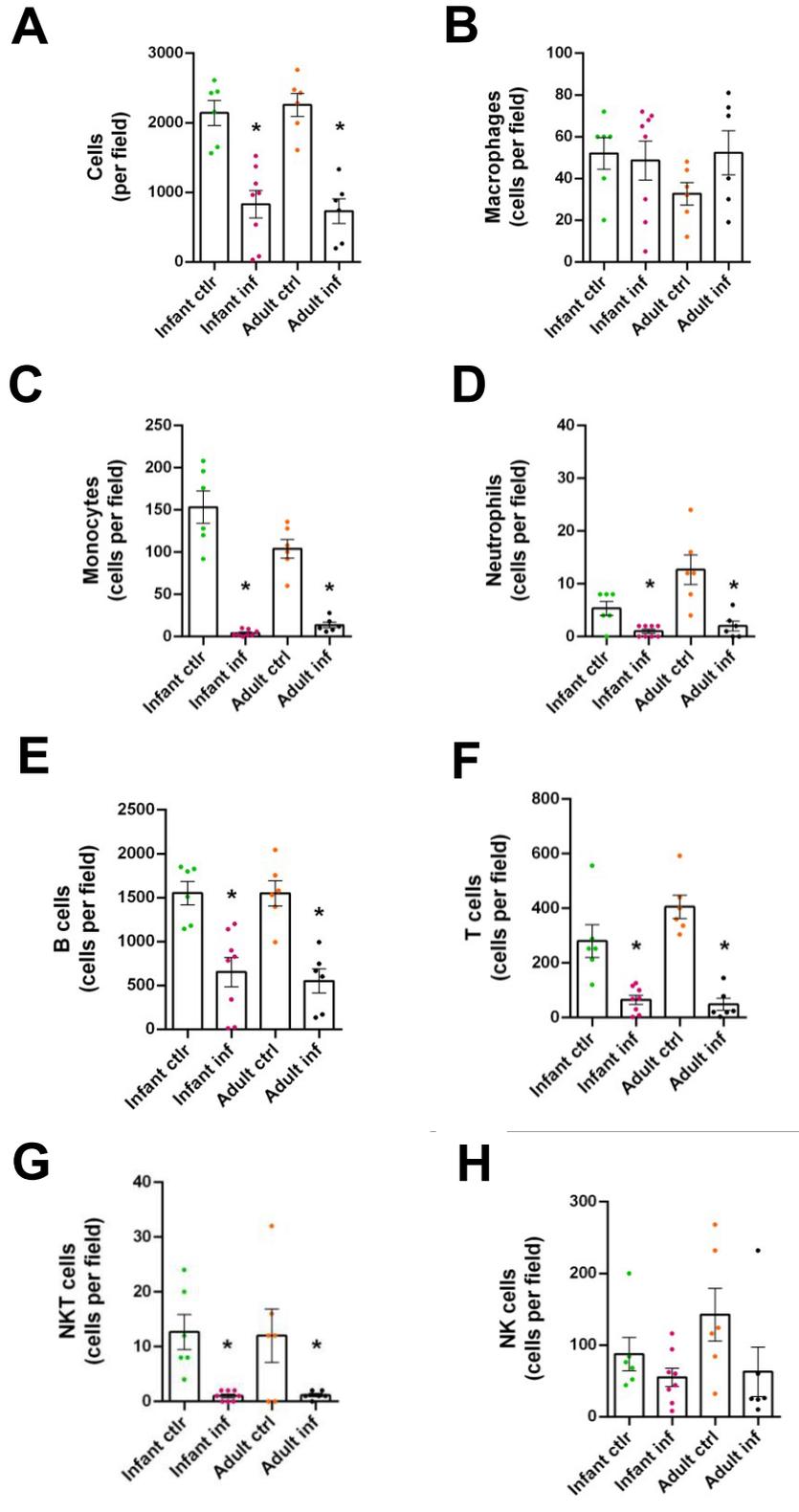


Figura 15. Modificações nas populações de leucócitos induzidas pela malária. (A-H) Quantificação das células. (A) Células totais. (B) Macrófagos. (C) Monócitos. (D) Neutrófilos. (E) Células B. (F) Células T. (G) Células NK (H) Células NKT. Número

de animais por grupo = 6. * Indica significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

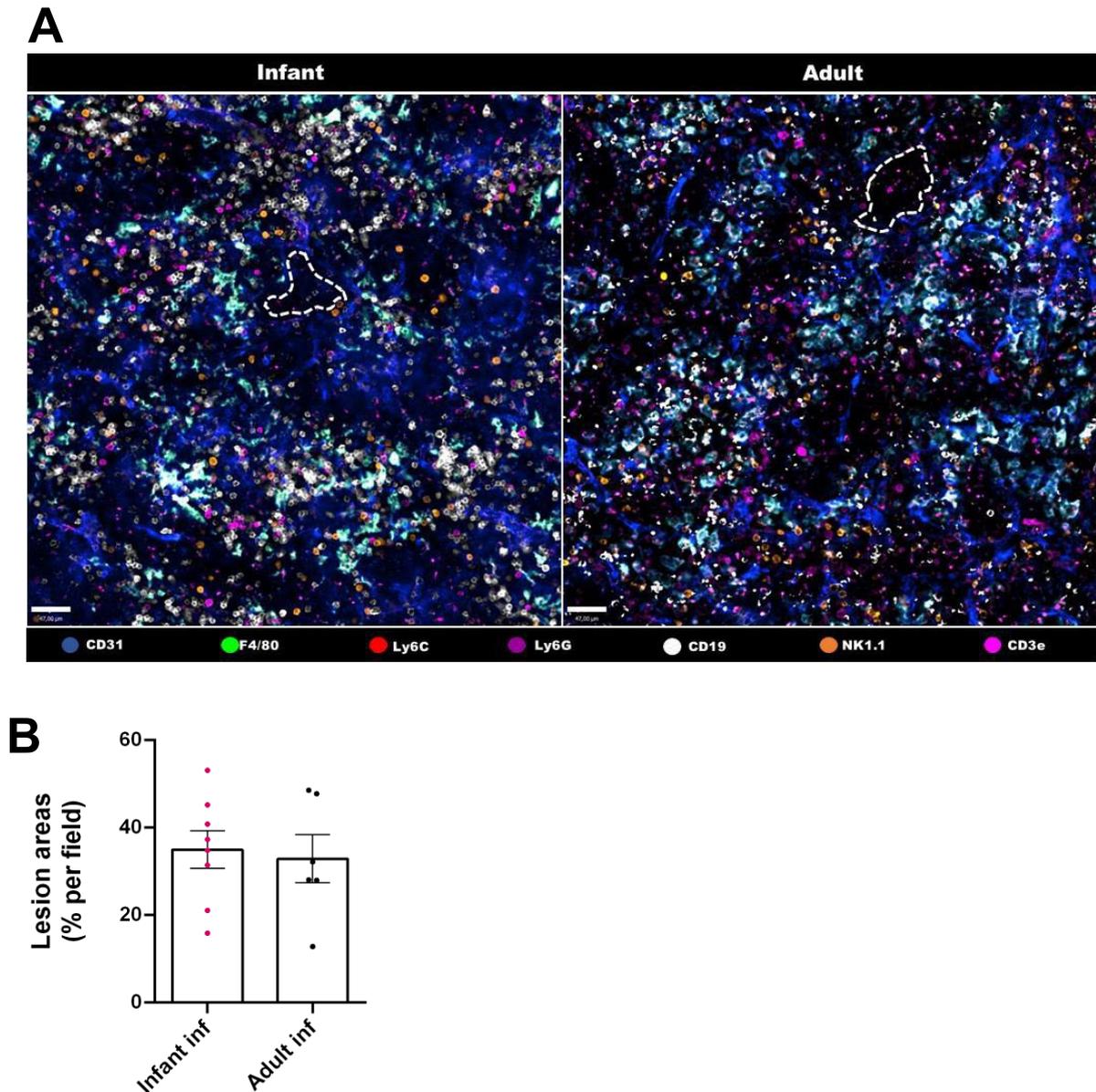


Figura 16. Áreas lesionadas do baço de camundongos infectados. (A) Microscopia mostrando as sete marcações simultâneas e as regiões acelulares, provavelmente indicando lesão tecidual, demarcadas pela linha pontilhada. Células CD31⁺ (azul), F4/80⁺ (verde), Ly6C⁺ (vermelho), Ly6G⁺ (roxo), CD19⁺ (branco), NK1.1⁺ (laranja) e CD3e⁺ (magenta), no aumento de 20x. Barra de escala: 60µm. **(B)** Quantificação das áreas lesionadas, apresentada em porcentagem, em relação a área total do campo.

5. DISCUSSÃO

Sendo o baço um órgão linfóide secundário singular e um tanto complexo, responsável pela remoção de patógenos e de células senescentes, e local onde as imunidades inata e adaptativa se combinam de forma organizada, entre outras funções, se faz necessária uma melhor compreensão deste órgão antes de rejeitar sua importância. O desenvolvimento embrionário esplênico é conhecido e bem caracterizado. No entanto, as mudanças decorrentes do processo de desenvolvimento do indivíduo, e suas particularidades, foram pouco estudadas no contexto esplênico até os dias atuais. Assim, buscamos, por meio deste trabalho, caracterizar o baço de camundongos em diferentes idades pós-nascimento. E, nossos dados demonstraram que existe uma grande diferença morfológica, tanto quanto imunológica do baço do neonato em comparação ao baço do indivíduo adulto.

Novas sondas, especialmente aquelas baseadas em polímeros (isto é, os corantes da família dos BVs - Brilliant Violet), são mais estáveis e permitem tempos de exposição mais longos para a elaboração de filmes e arquivos de mídia (Chattopadhyay *et al.*, 2012). Também, por possuírem uma maior eficiência de brilho, tecidos mais profundos podem ser visualizados e estruturas que não eram visíveis usando fluoróforos convencionais podem agora ser reveladas em alta definição. Dessa forma, utilizar um novo painel de corantes fluorescentes conjugados a uma lista selecionada de anticorpos, nos permitiu uma visualização sem precedentes do sistema imunológico *in vivo*, revelando novas características do desenvolvimento do sistema imunológico no período pós-natal e durante infecções parasitárias agudas.

Com a criação de um novo protocolo de imunofenotipagem por meio da técnica de microscopia confocal intravital (Figuras 1), fomos capazes de visualizar sete diferentes tipos celulares do baço, *in vivo* (Figura 2). Enquanto o baço do camundongo adulto (8 semanas) é um órgão bastante populoso e preenchido, apresentando um certo zoneamento, isto é, uma organização das células por região, o baço do camundongo neonato apresenta uma natureza bastante diferente (Figura 3). Vemos uma baixa frequência celular, muitos espaços “vazios”, células mais distantes umas das outras, e os agregados (“clusters”) celulares são bem raros. Assim, a arquitetura do baço nos neonatos é bem distinta, impossibilitando, inclusive, a distinção entre polpa vermelha e polpa branca. Em acordo com dados na literatura, vemos que este processo de compartimentalização, na verdade, ocorre ao longo das primeiras três

semanas de vida. Inclusive, os mencionados espaços “vazios” podem representar nichos para alguns dos tipos celulares imunes que ainda chegarão ao tecido. Ao avançar os estudos em camundongos infantis (3 semanas), já conseguimos perceber uma maior similaridade com o órgão adulto, tanto em relação a quantidade de células quanto à organização do tecido. Mais um dado que corrobora o fato de que o baço passa por uma sucessão de eventos importantíssimos durante as três primeiras semanas de vida do indivíduo, até enfim completar seu desenvolvimento e apresentar uma estrutura que permita a realização de todas as suas funções de forma eficiente. Durante o processo de envelhecimento, também foi demonstrado que o baço passa por mudanças estruturais, revelando algumas disrupções no padrão de organização das células no órgão (Aw *et al.*, 2016; Turner and Mabbott, 2017). Quadros patológicos, como infecções bacterianas, e desafios antigênicos também promovem tais desconfigurações (Lewis, Williams and Eisenbarth, 2019). Portanto, fica evidente que o baço é um órgão bastante “maleável”, e que parece estar em constante mudança e remodelamento, seja por questões intrínsecas (aspectos fisiológicos) ou por fatores extrínsecos (agentes infecciosos).

Em conjunto com o compartimento celular imune, alterações da vasculatura esplênica acompanham toda a sucessão de eventos que compreendem o desenvolvimento do baço (Figura 4). Assim, uma estrutura ramificada, assemelhando-se a uma colméia, dá lugar a um sistema complexo, que possui uma parte da circulação sanguínea ocorrendo em sistema fechado, e outra em sistema aberto. Provavelmente, essa modificação também ocorra de forma a dar mais espaço para que as futuras populações imunes residentes consigam se estabelecer, facilitando o povoamento do órgão. Uma possível alteração no padrão de expressão do receptor CD31 (PECAM-1) pelas células endoteliais, ao longo do tempo, também é uma hipótese que deve ser considerada, devido ao maior grau de dificuldade para distinguir os vasos em animais adultos. Entretanto, ensaios para avaliar níveis de expressão gênica não foram realizados no presente trabalho, e a literatura ainda não dispõe de dados que tenham constatado mudanças na expressão deste receptor nas células que revestem as estruturas vasculares do baço.

O baço é um órgão que apresenta uma enorme quantidade de leucócitos, com uma ampla diversidade de populações e subtipos celulares imunes (Den Haan and Kraal, 2012; Bronte and Pittet, 2013). A posição estratégica de cada tipo celular, a compartimentalização do órgão em zonas distintas, além de seu característico sistema

circulatório contribuem para o cumprimento das funções esplênicas. Na primeira semana de vida já conseguimos visualizar diferentes células das linhagens mieloide (Figura 5) e linfoide (Figura 6), apesar de apresentarem uma distribuição um tanto quanto aleatória, e em arranjo bem diferente do padrão apresentado em fases mais tardias. Nesta idade, as células linfoides já são o tipo celular predominante no órgão, com os linfócitos B compondo a principal e maior população imune (Figura 7). Com o passar do tempo, o volume celular total observado aumenta significativamente. Camundongos infantis (3 semanas) já apresentam uma composição e organização celular mais semelhantes às dos camundongos adultos. Os macrófagos já podem ser mais bem distinguidos na polpa vermelha e os linfócitos B e T se encontram agrupados em algumas regiões. Inclusive, em alguns campos retratados pelas imagens, conseguimos identificar a bainha de tecido linfoide (PALS) ao redor de pequenos vasos. As células B permanecem como a maior população celular esplênica em todas as idades, enquanto as demais populações estudadas (macrófagos, monócitos, neutrófilos, linfócitos T, NK e NKT) sofrem algumas flutuações, às vezes modestas, outras mais expressivas. Portanto, o microambiente esplênico se mostra bastante distinto nos neonatos, em comparação aos infantis e adultos (Figura 8). Uma análise com foco nas linhagens celulares nos permite, ainda, evidenciar uma dinâmica semelhante entre as células de origem mieloide ao longo do desenvolvimento, assim como entre as células de origem linfoide, exceto pelos linfócitos T (Figura 9).

Feita a imunofenotipagem de forma manual por meio das imagens de microscopia confocal intravital, decidimos realizar a técnica de citometria de fluxo visando obter um panorama mais global da composição do baço (Figura 10). Obtemos números próximos aos dados presentes na literatura para os camundongos adultos (Nolte *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2013; Hey, Tan and O'Neill, 2016), assim como uma certa correspondência com as proporções obtidas pela microscopia. Em relação aos neonatos e animais de 3 semanas, por sua vez, há uma escassez literária, e vemos uma maior disparidade entre os dados obtidos por cada um dos métodos. Apesar de caracterizarem-se como metodologias de propósitos distintos, tal diferença pode ser decorrente de diversos fatores. O primeiro deles, é o fato de a microscopia trabalhar com um campo visual de área restrita, ou seja, apenas algumas partes do órgão são retratadas e consideradas no estudo, enquanto na citometria o órgão inteiro é utilizado para análise. Para microscopia, os anticorpos são injetados por via endovenosa e circulam sistemicamente, o que pode interferir na marcação celular obtida no órgão

de estudo, pois alguns tecidos podem reter uma quantidade maior ou menor destes anticorpos. Na citometria, em contrapartida, todos os anticorpos são misturados diretamente em um tubo contendo somente as células isoladas do órgão estudado, o que pode contribuir para uma marcação mais eficaz e assertiva. Um terceiro e último fator se deve ao protocolo utilizado no presente trabalho: os camundongos não foram perfundidos previamente à retirada do baço para a realização da citometria. E, como o baço é um órgão altamente irrigado, muitas das células contabilizadas podem, na verdade, ser células circulantes, não residentes do microambiente esplênico. Os níveis variados de expressão dos marcadores celulares também constituem um certo desafio para a imunofenotipagem por microscopia. Os monócitos, por exemplo, por expressarem níveis baixos a intermediários de Ly6C no baço de organismos saudáveis (Hey, Tan and O'Neill, 2016), constituem uma população mais difícil de ser analisada, uma vez que a sensibilidade da técnica para tal identificação é baixa. Tal empecilho faz com que a identificação dos tipos celulares também tenha de se basear em outro aspecto retratado nas imagens: a morfologia das células. Sendo assim, pelo emprego da citometria, vemos uma maior proporção de células mieloides nos neonatos (~40%), apesar do constante predomínio das células linfoides. Ao longo das semanas, no entanto, macrófagos, monócitos e neutrófilos sofrem uma depleção e passam a constituir uma ínfima parcela das células imunes no baço (~10,5% e ~6% nos infantes e adultos, respectivamente). Vemos, então, um perfil contrário ao representado pela microscopia para as células da linhagem mieloide. Considerando o compartimento linfoide, apesar de resultados numéricos divergentes, a dinâmica retratada pela microscopia foi de encontro com os dados da citometria de fluxo, exceto para as células B.

Diante disto, apesar das limitações de cada técnica e divergências entre elas, a microscopia confocal e a citometria de fluxo são metodologias muito bem estabelecidas na área científica, sendo amplamente empregadas. Inclusive, elas podem se complementar, gerando dados mais precisos e densamente informativos que podem ser explorados de diversas formas. Porém, obter uma correspondência exata entre os resultados obtidos por cada uma ainda representa um desafio, principalmente se tratando de análises experimentais *in vivo*. Dessa maneira, a realização de uma espécie de citometria utilizando a técnica de microscopia confocal é possível e já foi realizada com cortes seriados de linfonodos, recebendo a denominação de histo-citometria (Gerner *et al.*, 2012). No entanto, o trabalho baseou-

se em análises *ex vivo* e que envolveram uma série de manipulações nos parâmetros das imagens, além da criação de um algoritmo para compensação das interferências no padrão de emissão dos fluoróforos utilizados, mostrando-se uma estratégia trabalhosa e mais dispendiosa. Logo, apesar de promissora, juntando informações quantitativas e qualitativas, muitos estudos ainda se fazem necessários para o refinamento e aplicação em larga escala de tal ferramenta.

Uma vez caracterizadas e registradas as mudanças no microambiente esplênico pós-natal, resolvemos testar a viabilidade do novo protocolo de microscopia em um quadro de infecção. Dentre as doenças infecciosas que ainda causam grandes prejuízos humanos e financeiros em todo o mundo, a malária infelizmente continua sendo protagonista (Murray *et al.*, 2012; Varo, Chaccour and Bassat, 2020). Registros evidenciam taxas de morbidade e mortalidade substanciais pela doença em áreas do globo onde os recursos são mais limitados e escassos. Além do mais, o quadro clínico pode evoluir rapidamente para uma doença grave que pode ser fatal, e crianças menores de 5 anos representam o grupo mais vulnerável (Crompton *et al.*, 2014). Levando em consideração o contexto apresentado acerca da doença e o papel do baço – objeto de estudo do presente trabalho – durante a infecção pelo protozoário, optamos por utilizar o agente etiológico da malária. Conseguimos, assim, padronizar o modelo de infecção murina pelo *Plasmodium chabaudi* e reproduzir a susceptibilidade e letalidade dos infantes à doença (Figura 11).

Por meio das imagens, foi possível observar as drásticas alterações esplênicas em decorrência da infecção comparando os grupos controles e respectivos grupos infectados (Figuras 12-14). Além da perceptível redução celular em ambas as idades investigadas, vimos, também, que os vasos se tornam mais bem delineados e marcados, possivelmente pelo aumento na expressão de CD31 – uma molécula de adesão celular –, pelas células endoteliais devido a uma maior translocação de células imunes para o baço e do baço para outros órgãos envolvidos na resposta inflamatória. Realizando a contagem manual, confirmamos a significativa redução do número de células totais, assim como da maioria das populações celulares. Apenas os macrófagos têm quantidades aumentadas, e as células NK, quantidades relativamente similares (Figura 15). O aumento dos macrófagos pode ser explicado por uma maior demanda desse tipo celular para realizar a fagocitose dos eritrócitos infectados e/ou danificados, como descrito na literatura (Ghosh and Stumhofer, 2021). As células NK, por sua vez, por não participarem ativamente das respostas

inflamatórias a agentes parasitários, permanecem com sua população relativamente intacta. Por fim, áreas mais escuras e com baixa celularidade, ou até mesmo ausência de células, foram detectadas e avaliadas nos infantes e nos adultos (Figura 16). Estas áreas, possivelmente indicativas de lesão tecidual, constituíam uma porção representativa da área total das imagens (~40%). Logo, apesar de lidarem com a infecção pelo *Plasmodium* de formas diferentes, com os infantes sendo mais susceptíveis e sensíveis à malária em relação aos adultos, pelo modelo murino obtivemos panoramas um tanto quanto similares em relação as alterações na composição e organização do baço durante o processo infeccioso. Assim, pode ser que o aspecto que contribui para a maior susceptibilidade dos infantes não esteja relacionado diretamente com o baço. Evidências na literatura científica, no entanto, sugerem que crianças infectadas pelo agente da malária podem sofrer de hipoesplenismo funcional, isto é, o próprio *Plasmodium* seria capaz de gerar prejuízos e enfraquecer a resposta imune esplênica (Gómez-Pérez *et al.*, 2014). Para confirmar ou rejeitar tal hipótese estudos mais aprofundados ainda são necessários, utilizando metodologias que consigam avaliar a ação e as interações do protozoário no baço. A utilização deste protocolo de microscopia com um patógeno que apresente fluorescência, por meio da manipulação gênica de inserção da proteína fluorescente GFP, pode, inclusive, ser uma estratégia promissora.

A reunião dos nossos dados sugere, então, que grandes mudanças na composição e organização celular ocorrem no baço de um neonato até ele se torne o órgão conhecido no adulto, uma vez que se mostram como ambientes substancialmente diferentes. Tais dados corroboram com um estudo prévio do nosso grupo sobre o desenvolvimento do fígado (Nakagaki *et al.*, 2018). Nele, mostramos que há uma mudança completa no perfil do sistema imunológico no fígado durante o período neonatal. Fígados de recém-nascidos (camundongos de 0 a 14 dias de idade) apresentavam grandes ilhas de células imunes, que também eram cercadas por sinusóides com formas muito diferentes. De forma mais detalhada, os fígados destes camundongos eram dominados por células mielóides, abrigando uma enorme população de granulócitos, mostrando um perfil contrário ao órgão adulto. Somente durante o período de desmame (entre a 2ª e a 4ª semana de vida), as células imunes do fígado - e o metabolismo - atingiram características de órgão maduro, evidenciando o impacto das três primeiras semanas de vida no desenvolvimento do indivíduo. Observamos um padrão semelhante com o baço, independentemente do perfil

imunológico distinto ao longo do desenvolvimento.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, de forma inédita, descrevemos uma nova combinação de anticorpos e fluoróforos selecionados para obter imagens *in vivo* do ambiente imunológico do baço durante todas as fases de desenvolvimento. Por meio dessa metodologia, identificamos arquiteturas bem diferentes entre o baço na primeira e oitava semanas de vida, mostrando que até a terceira semana o ambiente esplênico passa por um remodelamento intenso, além de uma transformação em sua composição celular imune. Além disso, revelamos como a malária pode alterar o perfil imune do baço em infantes e adultos, o que pode auxiliar no entendimento dos diferentes graus de gravidade da infecção. Nossas novas soluções de imagem podem, assim, ser extremamente úteis para diferentes grupos em todas as áreas de investigação biológica, abrindo caminho para novas abordagens e avanços no campo dos estudos intravitalis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A-Gonzalez, N. *et al.* (2013) 'The nuclear receptor LXR α controls the functional specialization of splenic macrophages', *Nature Immunology*, 14(8), pp. 831–839. doi: 10.1038/ni.2622.
- A-Gonzalez, N. and Castrillo, A. (2018) 'Origin and specialization of splenic macrophages', *Cellular Immunology*, 330(May), pp. 151–158. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.05.005.
- Asami, M. *et al.* (1992) 'A comparative study of the kinetic changes of hemopoietic stem cells in mice infected with lethal and non-lethal malaria', *International Journal for Parasitology*, 22(1), pp. 43–47. doi: 10.1016/0020-7519(92)90078-Y.
- Aw, D. *et al.* (2016) 'Disorganization of the splenic microanatomy in ageing mice', *Immunology*, 148(1), pp. 92–101. doi: 10.1111/imm.12590.
- Beck, F. *et al.* (2007) *Advances in anatomy embryology and cell biology, Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology*. doi: 10.1007/978-3-540-32948-0_1.
- Belyaev, N. N. *et al.* (2010) 'Induction of an IL7-R⁺ c-Kit^{hi} myelolymphoid progenitor critically dependent on IFN- γ signaling during acute malaria', *Nature Immunology*, 11(6), pp. 477–485. doi: 10.1038/ni.1869.
- Belyaev, N. N. *et al.* (2013) 'Extramedullary Myelopoiesis in Malaria Depends on Mobilization of Myeloid-Restricted Progenitors by IFN- γ Induced Chemokines', *PLoS Pathogens*, 9(6). doi: 10.1371/journal.ppat.1003406.
- Bertrand, J. Y. *et al.* (2006) 'Fetal spleen stroma drives macrophage commitment', *Development*, 133(18), pp. 3619–3628. doi: 10.1242/dev.02510.
- Borges Da Silva, H. *et al.* (2015) 'Splenic macrophage subsets and their function during blood-borne infections', *Frontiers in Immunology*, 6(SEP). doi: 10.3389/fimmu.2015.00480.
- Brendolan, A. *et al.* (2007) 'Development and function of the mammalian spleen', *BioEssays*, 29(2), pp. 166–177. doi: 10.1002/bies.20528.

- Bronte, V. and Pittet, M. J. (2013) 'The spleen in local and systemic regulation of immunity', *Immunity*, 39(5), pp. 806–818. doi: 10.1016/j.immuni.2013.10.010.
- Buffet, P. A. *et al.* (2011) 'The pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria in humans: Insights from splenic physiology', *Blood*, 117(2), pp. 381–392. doi: 10.1182/blood-2010-04-202911.
- Chang, K. H. and Stevenson, M. M. (2004) 'Malarial anaemia: Mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria', *International Journal for Parasitology*, 34(13–14), pp. 1501–1516. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.10.008.
- Chattopadhyay, P. K. *et al.* (2012) 'Brilliant violet fluorophores: A new class of ultrabright fluorescent compounds for immunofluorescence experiments', *Cytometry Part A*, 81 A(6), pp. 456–466. doi: 10.1002/cyto.a.22043.
- Christensen, J. L. *et al.* (2004) 'Circulation and chemotaxis of fetal hematopoietic stem cells', *PLoS Biology*, 2(3), pp. 368–377. doi: 10.1371/journal.pbio.0020075.
- Connell, N. T., Shurin, S. B. and Schiffman, F. (2018) 'The Spleen and Its Disorders', *Hematology: Basic Principles and Practice*, pp. 2313–2327. doi: 10.1016/B978-0-323-35762-3.00160-8.
- Craig, A. G. *et al.* (2012) 'The role of animal models for research on severe malaria', *PLoS Pathogens*, 8(2). doi: 10.1371/journal.ppat.1002401.
- Cranston, H. A. *et al.* (2016) 'American Association for the Advancement of Science', 223(4634), pp. 400–403.
- Crompton, P. D. *et al.* (2014) 'Malaria immunity in man and mosquito: Insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease', *Annual Review of Immunology*, 32, pp. 157–187. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120220.
- Davies, L. C. *et al.* (2013) 'Tissue-resident macrophages', *Nature Immunology*, 14(10), pp. 986–995. doi: 10.1038/ni.2705.
- Desanti, G. E. *et al.* (2007) 'Fetal Spleen Development, the Ride toward Multiple Functions', *Functional Development and Embryology*, (September 2018), pp. 78–87. Available at:

[http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/0706/FDE_1\(1\)/FDE_1\(1\)78-90o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/0706/FDE_1(1)/FDE_1(1)78-90o.pdf).

Dockrell, H. M., de Souza, J. B. and Playfair, J. H. (1980) 'The role of the liver in immunity to blood-stage murine malaria.', *Immunology*, 41(2), pp. 421–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7439934><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1458189>.

Epelman, S., Lavine, K. J. and Randolph, G. J. (2014) 'Origin and Functions of Tissue Macrophages', *Immunity*, 41(1), pp. 21–35. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.013.

Escalante, A. A. and Pacheco, M. A. (2019) 'Malaria Molecular Epidemiology: An Evolutionary Genetics Perspective', *Microbiology Spectrum*, 7(4), pp. 1–18. doi: 10.1128/microbiolspec.ame-0010-2019.

Fernández-García, V. *et al.* (2020) 'Contribution of Extramedullary Hematopoiesis to Atherosclerosis. The Spleen as a Neglected Hub of Inflammatory Cells', *Frontiers in Immunology*, 11(October), pp. 1–12. doi: 10.3389/fimmu.2020.586527.

Ferrer, M. *et al.* (2014) 'Imaging of the spleen in malaria', *Parasitology International*, 63(1), pp. 195–205. doi: 10.1016/j.parint.2013.08.014.

Gerner, M. Y. *et al.* (2012) 'Histo-cytometry: A method for highly multiplex quantitative tissue imaging analysis applied to dendritic cell subset microanatomy in lymph nodes', *Immunity*, 37(2), pp. 364–376. doi: 10.1016/j.immuni.2012.07.011.

Ghosh, D. and Stumhofer, J. S. (2021) 'The spleen: "epicenter" in malaria infection and immunity', *Journal of Leukocyte Biology*, 110(4), pp. 753–769. doi: 10.1002/JLB.4RI1020-713R.

Golub, R. *et al.* (2018) 'Origin and Immunological Functions of Spleen Stromal Cells', *Trends in Immunology*, 39(6), pp. 503–514. doi: 10.1016/j.it.2018.02.007.

Gómez-Pérez, G. P. *et al.* (2014) 'Plasmodium falciparum malaria and invasive bacterial co-infection in young African children: The dysfunctional spleen hypothesis', *Malaria Journal*, 13(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/1475-2875-13-335.

Gordon, S. and Taylor, P. R. (2005) 'Monocyte and macrophage heterogeneity', *Nature*

- Reviews Immunology*, 5(12), pp. 953–964. doi: 10.1038/nri1733.
- Den Haan, J. M. M. and Kraal, G. (2012) 'Innate immune functions of macrophage subpopulations in the spleen', *Journal of Innate Immunity*, 4(5–6), pp. 437–445. doi: 10.1159/000335216.
- Hey, Y. Y., Tan, J. K. H. and O'Neill, H. C. (2016) 'Redefining myeloid cell subsets in murine spleen', *Frontiers in Immunology*, 6(JAN), pp. 1–12. doi: 10.3389/fimmu.2015.00652.
- Kraal, G. and Mebius, R. (2006) 'New Insights into the Cell Biology of the Marginal Zone of the Spleen', *International Review of Cytology*, 250(January), pp. 175–215. doi: 10.1016/S0074-7696(06)50005-1.
- Kristiansen, M. *et al.* (2001) 'Identification of the haemoglobin scavenger receptor', *Nature*, 409(6817), pp. 198–201. doi: 10.1038/35051594.
- Kurotaki, D., Uede, T. and Tamura, T. (2015) 'Functions and development of red pulp macrophages', *Microbiology and Immunology*, 59(2), pp. 55–62. doi: 10.1111/1348-0421.12228.
- Landreth, K. S. (2002) 'Critical windows in development of the rodent immune system', *Human and Experimental Toxicology*, 21(9–10), pp. 493–498. doi: 10.1191/0960327102ht287oa.
- Lewis, S. M., Williams, A. and Eisenbarth, S. C. (2019) 'Structure and function of the immune system in the spleen', *Science Immunology*, 4(33). doi: 10.1126/sciimmunol.aau6085.
- Mccarthy, D. D. *et al.* (2006) 'The Lymphotoxin Pathway', *Immunologic Research*, pp. 41–53.
- Mebius, R. E. and Kraal, G. (2005) 'Structure and function of the spleen', *Nature Reviews Immunology*, 5(8), pp. 606–616. doi: 10.1038/nri1669.
- Mota Maria M. *et al.* (2001) 'Migration of Plasmodium Sporozoites Through Cells Before Infection.', *Science*, 291(5501), pp. 141–144.

- Murray, C. J. L. *et al.* (2012) 'Global malaria mortality between 1980 and 2010: A systematic analysis', *The Lancet*, 379(9814), pp. 413–431. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60034-8.
- Nakagaki, B. N. *et al.* (2018) 'Immune and metabolic shifts during neonatal development reprogram liver identity and function', *Journal of Hepatology*, 69(6), pp. 1294–1307. doi: 10.1016/j.jhep.2018.08.018.
- Nolte, M. A. *et al.* (2000) 'Isolation of the intact white pulp. Quantitative and qualitative analysis of the cellular composition of the splenic compartments', *European Journal of Immunology*, 30(2), pp. 626–634. doi: 10.1002/1521-4141(200002)30:2<626::AID-IMMU626>3.0.CO;2-H.
- Nyboer, B. *et al.* (2018) 'The Plasmodium liver-stage parasitophorous vacuole: A front-line of communication between parasite and host', *International Journal of Medical Microbiology*, 308(1), pp. 107–117. doi: 10.1016/j.ijmm.2017.09.008.
- del Portillo, H. A. *et al.* (2012) 'The role of the spleen in malaria', *Cellular Microbiology*, 14(3), pp. 343–355. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01741.x.
- Quinn, T. C. and Wyler, D. J. (1979) 'Intravascular clearance of parasitized erythrocytes in rodent malaria', *Journal of Clinical Investigation*, 63(6), pp. 1187–1194. doi: 10.1172/JCI109413.
- Rosado, M. M. *et al.* (2009) 'From the fetal liver to spleen and gut: The highway to natural antibody', *Mucosal Immunology*, 2(4), pp. 351–361. doi: 10.1038/mi.2009.15.
- Secklehner, J., Celso, C. Lo and Carlin, L. M. (2017) 'Intravital microscopy in historic and contemporary immunology', *Immunology and Cell Biology*, 95(6), pp. 506–513. doi: 10.1038/icb.2017.25.
- Shimomura, O. (1979) 'Structure of the chromophore of Aequorea green fluorescent protein', *FEBS Letters*, 104(2), pp. 220–222. doi: 10.1016/0014-5793(79)80818-2.
- Smith, C. L. (2011) 'Basic confocal microscopy', *Current Protocols in Neuroscience*, (SUPPL. 56), pp. 1–18. doi: 10.1002/0471142301.ns0202s56.
- Steiniger, B. S. (2015) 'Human spleen microanatomy: Why mice do not suffice',

Immunology, 145(3), pp. 334–346. doi: 10.1111/imm.12469.

Stevenson, M. M. and Kraal, G. (1989) 'Histological changes in the spleen and liver of C57BL 6 and A J mice during *Plasmodium chabaudi* AS infection', *Experimental and Molecular Pathology*, 51(1), pp. 80–95. doi: 10.1016/0014-4800(89)90009-9.

Stoltzfus, C. R. *et al.* (2020) 'CytoMAP: A Spatial Analysis Toolbox Reveals Features of Myeloid Cell Organization in Lymphoid Tissues', *Cell Reports*, 31(3). doi: 10.1016/j.celrep.2020.107523.

Sturm, A. *et al.* (2016) 'Fifteen years of Plasmodium vivax: A review of its biology, epidemiology, and clinical management', *PLoS Pathogens*, 12(12), pp. 1–15. doi: 10.1371/journal.ppat.1005111.

Swirski, F. K. *et al.* (2009) 'Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites', *Science*, 325(5940), pp. 612–616. doi: 10.1126/science.1175202.

Tsien, R. Y., Ernst, L. and Waggoner, A. (2006) 'Fluorophores for confocal microscopy: Photophysics and photochemistry', *Handbook of Biological Confocal Microscopy: Third Edition*, pp. 338–352. doi: 10.1007/978-0-387-45524-2_16.

Tumanov, A. V. *et al.* (2002) 'Distinct role of surface lymphotoxin expressed by B cells in the organization of secondary lymphoid tissues', *Immunity*, 17(3), pp. 239–250. doi: 10.1016/S1074-7613(02)00397-7.

Turner, V. M. and Mabbott, N. A. (2017) 'Influence of ageing on the microarchitecture of the spleen and lymph nodes', *Biogerontology*, 18(5), pp. 723–738. doi: 10.1007/s10522-017-9707-7.

Urban, B. C. *et al.* (2005) 'Fatal *Plasmodium falciparum* malaria causes specific patterns of splenic architectural disorganization', *Infection and Immunity*, 73(4), pp. 1986–1994. doi: 10.1128/IAI.73.4.1986-1994.2005.

Varo, R., Chaccour, C. and Bassat, Q. (2020) 'Update on malaria', *Medicina Clínica (English Edition)*, 155(9), pp. 395–402. doi: 10.1016/j.medcle.2020.05.024.

VILLEVAL, J.-L. *et al.* (1990) 'Changes in Hemopoietic and Regulator Levels in Mice during or Nonfatal Malarial Infections Fatal Populations Anemia plays an important role in the morbidity and mortality of human (Abdalla during murine malaria (Clark and Chaudhri cell production associ', 374, pp. 364–374.

Vondenhoff, M. F. R. *et al.* (2008) 'Separation of splenic red and white pulp occurs before birth in a LT α β -independent manner', *Journal of Leukocyte Biology*, pp. 152–161. doi: 10.1189/jlb.0907659.

Wei, Y. *et al.* (2022) 'Brain-spleen axis in health and diseases: A review and future perspective', *Brain Research Bulletin*, 182, pp. 130–140. doi: 10.1016/j.brainresbull.2022.02.008.

Weiss, L. (1991) 'Barrier cells in the spleen', *Immunology Today*, 12(1), pp. 24–29. doi: 10.1016/0167-5699(91)90108-6.

Weiss, L., Geduldig, U. and Weidanz, W. (1986) 'Mechanisms of splenic control of murine malaria: Reticular cell activation and the development of a blood-spleen barrier', *American Journal of Anatomy*, 176(3), pp. 251–285. doi: 10.1002/aja.1001760303.

WHO (2021) *World Malaria Report 2021*, *World Malaria report Geneva: World Health Organization*. (2021). Licence: CC.

Yang, M. *et al.* (2013) 'Morphology and quantitative composition of hematopoietic cells in murine bone marrow and spleen of healthy subjects', *Annals of Hematology*, 92(5), pp. 587–594. doi: 10.1007/s00277-012-1653-5.

Yap, G. S. and Stevenson, M. M. (1992) 'Plasmodium chabaudi AS: Erythropoietic responses during infection in resistant and susceptible mice', *Experimental Parasitology*, 75(3), pp. 340–352. doi: 10.1016/0014-4894(92)90219-Z.

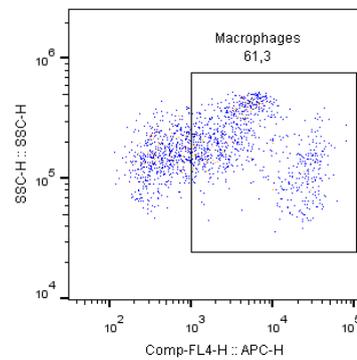
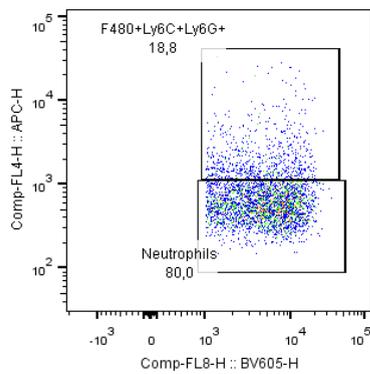
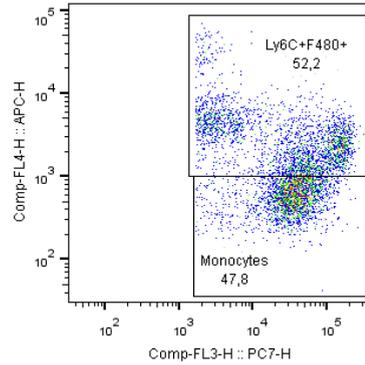
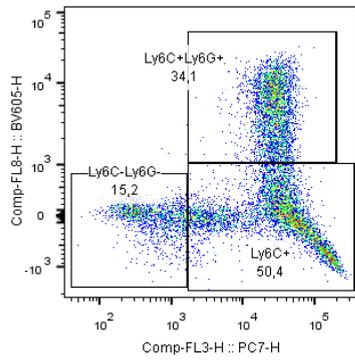
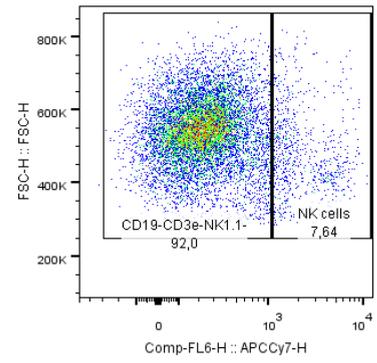
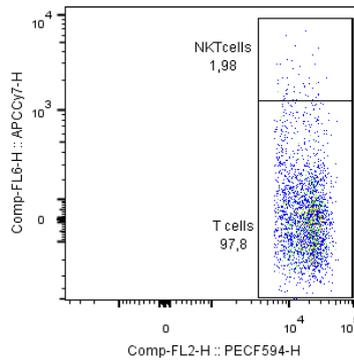
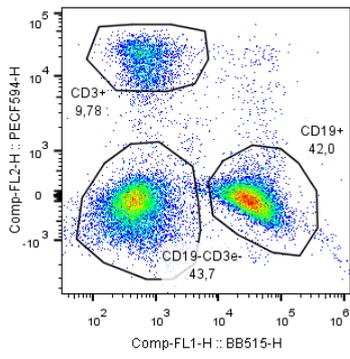
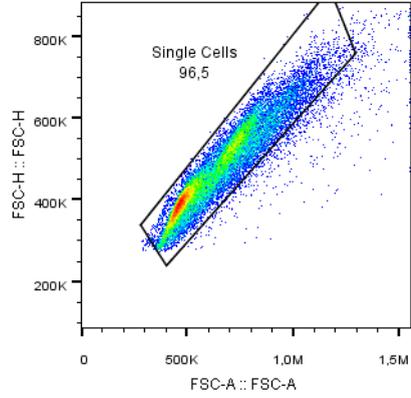
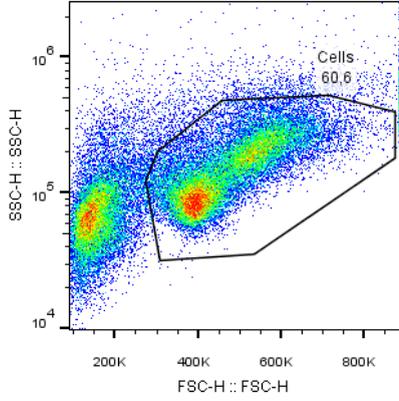
Zhao, L. *et al.* (2015) 'Regulation of adaptive immune responses by guiding cell movements in the spleen', *Frontiers in Microbiology*, 6(JUN), pp. 1–6. doi: 10.3389/fmicb.2015.00645.

ANEXO I

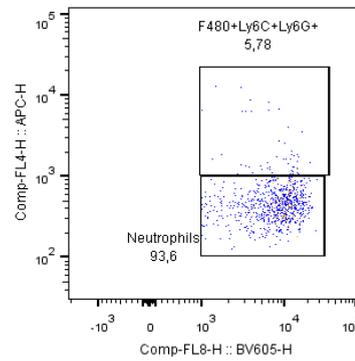
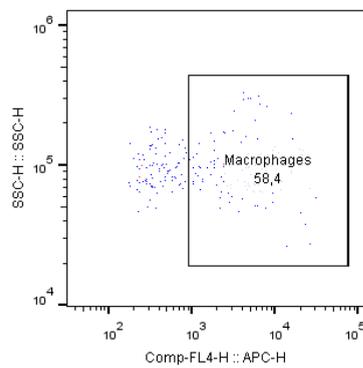
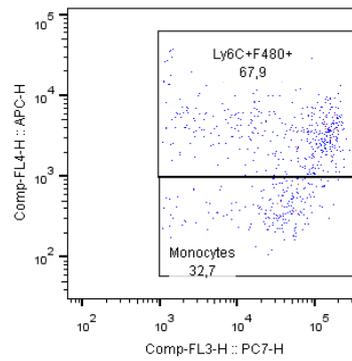
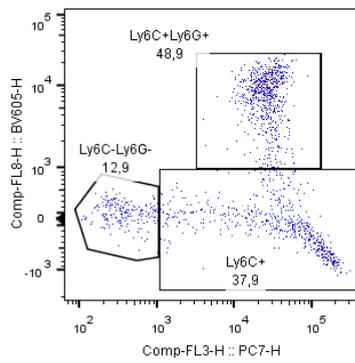
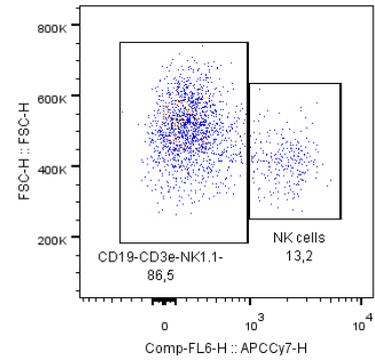
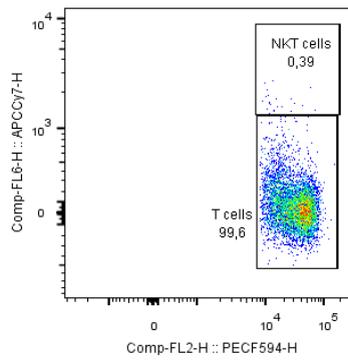
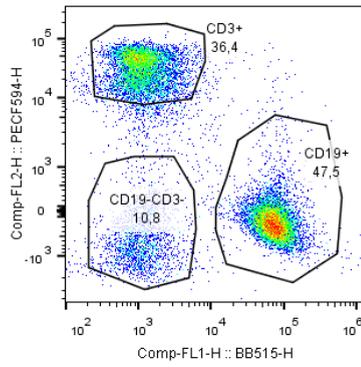
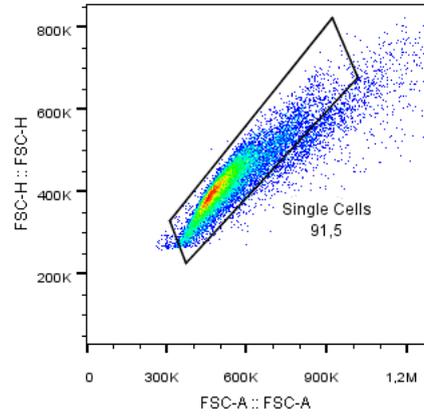
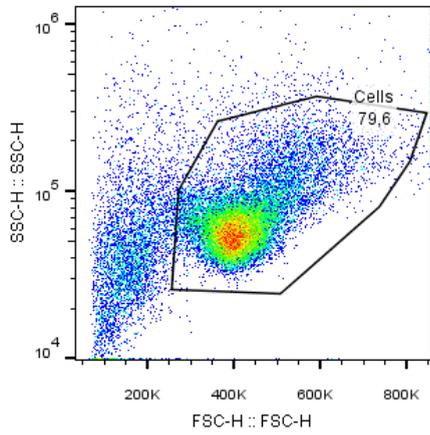
MICROSCOPIA			
ANTICORPO	FLUORÓFORO CONJUGADO	CLONE	ISOTIPO
Rat anti-mouse CD31	BV421	390	IgG2a κ
Rat anti-mouse F480	BV480	T45-2342	IgG2a κ
Rat anti-mouse Ly-6C	BV605	AL-21	IgM
Rat anti-mouse Ly-6G	BV711	1A8	IgG2a κ
Rat anti-mouse CD19	BB515	1D3	IgG2a κ
Mouse anti-mouse NK-1.1	PE	PK136	IgG2a κ
Hamster anti-mouse CD3e	APC	145-2C11	IgG1a κ
CITOMETRIA			
ANTICORPO	FLUORÓFORO CONJUGADO	CLONE	
CD45	AF700	30-F11	
F4/80	APC	T45-2342	
Ly6C	PE-Cy7	AL-21	
Ly6G	BV605	1A8	
CD19	BB515	1D3	
NK1.1	APC-Cy7	PK136	
CD3e	PE-CF594	145-2C11	

ANEXO II

1 semana



3 semanas



8 semanas

