

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Caracterização do papel da integrina CD11d/CD18 na injúria pulmonar aguda na
malária experimental murina**

Isa Claudia Gomes de Azevedo

Orientadores: Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto

Prof^ª. Dra. Adriana Vieira de Abreu

Rio de Janeiro
2012

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

A994

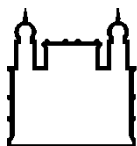
Azevedo, Isaclaudia Gomes de

Caracterização do papel da integrina CD11d/CD18 na injúria pulmonar aguda durante a malária experimental / Isaclaudia Gomes de Azevedo. – Rio de Janeiro, 2012.
xviii, 89f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2012.
Bibliografia: f. 67-89

1. Inflamação pulmonar. 2. Integrina. 3. Malária. I. Título.

CDD 616.9362



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ISACLAUDIA GOMES DE AZEVEDO

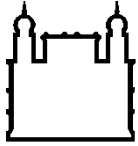
**Caracterização do papel da integrina CD11d/CD18 na injúria pulmonar aguda na
malária experimental murina**

**Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para a obtenção do título
de Mestre em Biologia Celular e Molecular**

Orientadores: Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto

Prof^ª. Dra. Adriana Vieira de Abreu

Rio de Janeiro
2012



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Isaclaudia Gomes de Azevedo

Caracterização do papel da integrina CD11d/CD18 na injúria pulmonar aguda na malária experimental murina

Orientadores: Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto

Prof^a. Dra. Adriana Vieira de Abreu

Aprovada em: 30 / 10 / 2012

EXAMINADORES:

Prof^a. Dra. Patricia Machado Rodrigues e Silva Martins – Presidente – IOC

Prof^a. Dra. Juliana de Meis – IOC

Prof. Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda – FMT-AM

Prof^a. Dra. Dalma Maria Banic – Revisora – IOC

Prof. Dr. Valber da Silva Frutuoso – IOC

Rio de Janeiro

2012

iii

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Dr Hugo Caire Castro Faria Neto e a Dr. Adriana Vieira de Abreu. Ao Dr Hugo Caire por me dar a chance de trabalhar com seu grupo, por me ouvir todas as vezes que bati em sua porta, mesmo quando não queria ser incomodado, por todo aprendizado que me proporcionou. Agradecer a Dra Adriana Vieira de Abreu por tudo seria o mais certo, mas em especial quero agradecer por sempre estar disposta a me ajudar (independente do fuso), por me ouvir, tirar minhas dúvidas, discutir resultados, por todo o carinho. Aproveito também o espaço para responder a uma pergunta feita a mim no meu primeiro dia no laboratório, sim eu aguento trabalhar com você, e posso dizer que esta tem sido uma experiência incrível de aprendizagem em todas as áreas da minha vida.

À Dra Patricia Bozza pelo exemplo de trabalho, dinamismo e todo incentivo. E ao Dr Valber Frutuoso por estar sempre me apoiando, disposto a ajudar e por tão prontamente aceitar participar da minha banca.

Ao meu irmão(zão) científico ao Ms André Costa Ferreira, por todas as cinéticas intermináveis que ele esteve ao meu lado, por todas as caminhadas pela FIOCRUZ no sol de 40° do verão do Rio de Janeiro, por sempre estar disposto a embarcar em meus desenhos experimentais de dia inteiro. Enfim, por estar ao meu lado me apoiando.

Agradeço especialmente também a Dra Danielle de Oliveira Nascimento, a Msa Alessandra Mendonça e ao Diego Mendes Silva, pelo apoio nos experimentos, mesmo quando parecia que não ia acabar nunca, ou que a tarefa era aterrorizante demais, por sempre estarem ao meu lado na bancada e nas discussões.

À Msc Isabel Matos (MMM...) por todas as caronas, pelas conversas até o experimento acabar, por sempre me apoiar quando eu “inventava” de acrescentar algo mais no meu projeto. Ao Msc Edson Assis que foi alguém muito importante nos meus momentos de sensibilidade extrema, que me ajudou a ficar calma e seguir em frente. Vocês dois foram muito importantes para realização deste trabalho e para o meu crescimento pessoal.

À Dra Andrea Surrage, minha grande mãe de “TOC”, me inspirando a sempre organizar tudo. À Dra Rachel Novaes, minha mãe emprestada 2, que tanto ajudou para realização desta dissertação. À Dra Patrícia Reis, por sua solicitude, boas conversas tanto as intelectuais como as triviais. À Dra Adriana Ribeiro, por ter me levado para o laboratório e sempre estar disposta a esclarecer as minhas dúvidas e acalmar meus desesperos. À Dra Mônica Farah por pedir os meus animais e pelas conversas engraçadas. À Dra Kelly Magalhães que me ensinou a fazer o temido PCR, sempre com muita paciência, entusiasmo e bom humor.

À Msc Flora Magno (minha querida irmã emprestada 2), ao Msc Diogo Dibo, a Juliana (irmã “olho junto”), a Natália Costa, a Msc Carla Freitas, a Msc Natalia Roque e a todos os demais do grupo do laboratório de IMUNOFARMACOLOGIA a que não citei por falta de espaço, senão os meus agradecimento seriam maiores que a tese, (Oh laboratório gigante!!!), mas que ajudaram direta ou indiretamente nas discussões, nos resultados, ou na simples troca de experiência, meu muito obrigada a todos vocês.

À secretária Rose Branco que mantém as engrenagens do laboratório rodando, sempre disposta a resolver nossos problemas, seja de compra, importação, exportação (a lista só cresce), mas também pelo bom humor e boas risadas nos almoços.

A todos os companheiros dos outros laboratórios de nosso prédio. A Dra Patricia Martins por ter aceito o convite para ser da minha banca, e por sempre deixar as portas abertas de seu laboratório para nós. Também aos amigos e companheiros de trabalho dos laboratórios de Toxinologia e Investigação Cardio-Vascular por sempre estarem dispostos a ajudar e a emprestar reagentes.

À Dra Dalma Maria Banic, à Dra Juliana de Meis e ao Dr Marcus Lacerda, por terem aceitado tão prontamente participar da minha banca.

À equipe do apoio laboratorial Andréia e Tatiana, sempre resolvendo nossos problemas. Ao pessoal do biotério por realizar seu trabalho com solicitude e bom humor. À equipe da limpeza e aos seguranças pelo “Bom dia” toda manhã, pela preocupação com o nosso bem estar e pelas notícias sobre o mundo lá fora.

As agências de fomento, CNPq, FAPERJ e CAPES por todo o suporte financeiro.

A minha família e ao meu namorado que sempre me apoiaram e incentivaram a estudar, por me amparar sempre que necessário e por acreditar em mim. Agradeço também aos meus amigos de todos os lugares (né, Clarissinha!!!), que sempre acreditaram em mim. E a Deus por estar sempre ao meu lado, me dando forças para continuar.

ÍNDICE

| | |
|--|-------------|
| LISTA DE FIGURAS..... | ix |
| LISTA DE TABELAS..... | xi |
| RESUMO..... | xii |
| ABSTRACT..... | xiii |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | xiv |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1. Malária: Definição e breve histórico..... | 1 |
| 1.1.1. Epidemiologia e controle da malária..... | 2 |
| 1.1.2. Ciclo do parasito..... | 6 |
| 1.1.3. Modelos experimentais..... | 10 |
| 1.1.4. Fisiopatologia..... | 12 |
| 1.1.4.1. Malária pulmonar..... | 18 |
| 1.2. Integrinas..... | 20 |
| 1.2.1. Leuointegrinas (CD18/β_2)..... | 22 |
| 1.2.1.1. Leuointegrina CD11d/CD18 ($\alpha_D\beta_2$)..... | 27 |
| 2. OBJETIVOS..... | 29 |

| | |
|---|-----------|
| 2.1. Objetivo geral..... | 29 |
| 2.2. Objetivos específicos..... | 29 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 30 |
| 3.1. Animais..... | 30 |
| 3.2. Manutenção e infecção com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA (PbA) | 30 |
| 3.3 Obtenção de tecidos..... | 31 |
| 3.4. Extração de RNA..... | 31 |
| 3.5 Transcrição reversa do RNA (RT) | 32 |
| 3.6 Reação em cadeia de polimerase quantitativo (PCR em tempo real) | 32 |
| 3.7 Lavado broncoalveolar (LBA) | 32 |
| 3.8 Contagem total e diferencial das células da medula óssea e do LBA..... | 33 |
| 3.9 Dosagem de proteínas pelo método do BCA (Pierce) | 33 |
| 3.10 Dosagem de citocinas através do ensaio imunossorvente ligado à enzima (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> , ELISA) | 34 |
| 3.11 Permeabilidade vascular..... | 35 |
| 3.12 Análises histológicas..... | 35 |
| 3.13 Citometria de fluxo..... | 35 |
| 3.14 Imunohistoquímica..... | 36 |
| 3.15 Avaliação da responsividade brônquica..... | 37 |
| 3.16 Análises estatísticas..... | 37 |
| 4. RESULTADOS..... | 38 |
| 4.1 Ausência da subunidade CD11d não interfere na parasitemia..... | 38 |
| 4.2 Caracterização da expressão da subunidade CD11d em tecido | |

| | |
|--|-----------|
| pulmonar..... | 39 |
| 4.3 Ausência da subunidade CD11d modula o perfil de citocinas e quimiocinas liberadas durante a infecção com PbA..... | 40 |
| 4.4 A ausência subunidade CD11d influencia na formação do edema pulmonar durante a infecção com PbA..... | 42 |
| 4.5 A ausência da subunidade CD11d interfere na permeabilidade da barreira alvéolo-capilar..... | 44 |
| 4.6 A ausência da subunidade CD11d diminui infiltrado leucocitário no tecido pulmonar durante a infecção..... | 45 |
| 4.7 A ausência da subunidade CD11d não interfere na migração celular no Lavado Brônquio Alveolar..... | 47 |
| 4.8 A ausência da subunidade CD11d interfere no número de células CD14⁺ no sangue periférico durante a infecção com PbA..... | 49 |
| 4.9 A ausência da subunidade CD11d interfere na saída de células da medula óssea durante a infecção com PbA..... | 50 |
| 4.10 A ausência da subunidade CD11d não interfere na expressão da molécula VCAM-1..... | 52 |
| 4.11 Animais CD11d^{-/-} demonstram menor comprometimento da função respiratória..... | 54 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 56 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 66 |
| 7. PERSPECTIVAS..... | 66 |
| 8. REFERÊNCIAS..... | 67 |

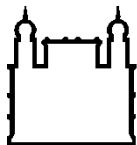
LISTA DE FIGURAS

| | | |
|----------------|---|----|
| Figura 1.1.1.1 | Áreas com ocorrência de Malária no mundo..... | 3 |
| Figura 1.1.1.2 | Áreas com ocorrência de Malária no Brasil..... | 4 |
| Figura 1.1.2.1 | Ciclo do Plasmodium sp..... | 8 |
| Figura 1.1.4.1 | Esquema da citoaderência..... | 16 |
| Figura 1.2.1 | Esquema das subfamílias de integrinas..... | 21 |
| Figura 1.2.1.1 | Esquema demonstrando as subunidades α e β | 23 |
| Figura 1.2.1.2 | Caracterização da infecção com PbA em animais deficientes para integrina CD11d..... | 26 |
| Figura 4.1.1 | A ausência da integrina CD11d não interfere na parasitemia periférica após a infecção com PbA..... | 38 |
| Figura 4.2.1 | Aumento da expressão da subunidade CD11d em tecido pulmonar de animais infectados com PbA..... | 39 |
| Figura 4.3.1 | O homogenato do tecido pulmonar dos animais CD11d ^{-/-} apresentou menor nível de liberação de citocinas e quimiocinas quando comparado com animais CD11d ^{+/+} após a infecção com PbA..... | 41 |
| Figura 4.4.1 | Pulmão de animais CD11d ^{-/-} tem menor formação de edema quando comparado com CD11d ^{+/+} , após a infecção com PbA..... | 43 |
| Figura 4.5.1 | Redução da formação do edema pulmonar em camundongos CD11d ^{-/-} após a infecção com PbA quando comparado com os CD11d ^{+/+} | 44 |
| Figura 4.6.1 | Análises histológicas de pulmão de animais CD11d ^{-/-} demonstraram menos áreas hemorrágicas, edema e infiltrado celular quando comparados com dos animais CD11d ^{+/+} , após a infecção com PbA..... | 46 |
| Figura 4.7.1 | LBA dos animais CD11d ^{-/-} e CD11d ^{+/+} não apresentaram diferenças no perfil de recrutamento celular, após a infecção com PbA..... | 48 |
| Figura 4.8.1 | Sangue periférico de animais CD11d ^{-/-} apresentou menos células CD14 ⁺ quando comparado com animais CD11d ^{+/+} , após a infecção PbA..... | 49 |

| | | |
|---------------|--|----|
| Figura 4.9.1 | Medula de animais CD11d^{-/-} tem mais células retidas quando comparado com a dos animais CD11d^{+/+}, após a infecção com PbA..... | 51 |
| Figura 4.10.1 | A deleção da subunidade CD11d não altera a expressão da molécula VCAM-1 após a infecção com PbA..... | 53 |
| Figura 4.11.1 | Animais CD11d^{-/-} demonstraram menor responsividade bronquica a metacolina quando comparado aos CD11d^{+/+}, após a infecção com PbA..... | 55 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------------|---|----|
| Tabela 1.1.3.1 | Infecções por plasmódios murinos em diversas linhagens de camundongos..... | 12 |
| Tabela 3.10.1 | Anticorpos usados para ensaios de ELISA..... | 34 |



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

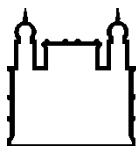
Caracterização do papel da integrina CD11d/CD18 na injúria pulmonar aguda durante a malária experimental murina

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Isaclusia Gomes de Azevedo

A malária é uma doença parasitária causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium* e é um grande problema de saúde pública. Por volta de 40% da população mundial está em área de risco de malária. A malária cerebral é a principal complicação, mas o edema pulmonar e a injúria pulmonar (ARDS) podem ser desencadeadas pela infecção com *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. knowlesi*, e ocorrem frequentemente durante ou após o início do tratamento antimalárico. Os mecanismos moleculares e celulares de indução de injúria pulmonar, como da malária cerebral permanecem indefinidos. Previamente, nós encontramos que a deleção genética da integrina CD11d/CD18, que é expressa em leucócitos mielóides, desencadeia uma maior sobrevivência no animais infectados com *Plasmodium berghei* Anka (PbA), que é uma modelo de malária grave. Tal resultado sugere que a molécula CD11d/CD18 tenha um papel determinante na imunopatogênese da malária. Perguntamos se CD11d/CD18 determina eventos fisiopatológicos na ARDS desencadeadas por infecção PbA. Realizamos análises da expressão da subunidade CD11d e de parâmetros inflamatórios, como da permeabilidade da barreira vascular por exclusão do corante azul de Evans, e citocinas por ELISA. Proteínas e leucócitos foram mensurados no lavado broncoalveolar (LAB). A migração celular foi medida pela contagem de células ao microscópio e por citometria de fluxo. Também foi avaliada a expressão do ligante de CD11d, VCAM-1 e a função respiratória dos animais. A Análise da expressão do mRNA da subunidade CD11d sugere um acúmulo de leucócitos e/ou que a expressão da subunidade CD11d é aumentada em macrófagos pulmonares e/ou em outras células mielóides pulmonares após a infecção. Nós também observamos um acúmulo de leucócitos, hemácias e fluido nos pulmões de CD11d^{+/+} mice. A inflamação e a hemorragia foram menos intensas nos pulmões dos animais CD11d^{-/-}. Em paralelo, a integridade da barreira vascular foi prejudicada nos animais CD11d^{+/+}, enquanto os animais CD11d^{-/-} tinham menor extravazamento de azul de Evans no tecido pulmonar e níveis mais baixos de proteína no LAB em comparação com CD11d^{+/+}, apesar de o número total de leucócitos no LAB ter sido semelhante. Observamos níveis mais baixos de citocinas inflamatórias que estavam associadas com a malária experimental e clínica, em amostras de animais CD11d^{-/-} quando comparados com os animais CD11d^{+/+}. A maior parte dos leucócitos dos camundongos CD11d^{-/-} ficavam retidos na medula óssea e também havia menos células CD14⁺ no sangue periférico, quando comparado com os camundongos CD11d^{+/+}. Os nossos resultados demonstram que a ausência da subunidade CD11d não interfere na expressão de VCAM-I e acarreta uma melhor função respiratória após a infecção. Podemos observar que a integrina CD11d/CD18 influencia nos principais eventos fisiopatológicos na ARDS desencadeada pela malária experimental, incluindo ruptura da barreira vascular pulmonar, inflamação e hemorragia.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Characterization of the role of integrin $\alpha_D\beta_2$ (CD11d/CD18) in acute lung injury during murine experimental malaria

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Isa Claudia Gomes de Azevedo

Malaria is a parasitic disease caused by protozoa of the genus *Plasmodium* and is a major public health problem. 40% or more of the global population is at risk for malaria. Cerebral malaria is the most feared complication, but pulmonary edema and lung injury (ARDS) are also triggered by the infection with *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium knowlesi*, and often occur during or after the begin of anti-malarial therapy. The molecular and cellular mechanisms of pulmonary injury, like those of CM, remain incompletely defined. Previously, we found that genetic deletion of integrin CD11d/CD18, which is expressed on myeloid leukocytes, improves survival in mice infected with *P. berghei* Anka (PbA), a model of severe malarial infection. Thus, CD11d/CD18 may be a critical determinant in injurious innate immune responses to malarial parasites. We asked if CD11d/CD18 is involved in pathophysiologic events in ARDS triggered by PbA infection. We measured CD11d subunit expression, vascular barrier function by Evans blue dye (EBD) exclusion, and cytokines by ELISA. Protein and leukocytes were measured in bronchoalveolar lavage (BAL) samples. Cell migration was measured by microscope counting and flow cytometry. We also analyzed the expression of the ligand to CD11d, VCAM-1, and respiratory function of animals. Analysis of CD11d mRNA suggested that CD11d subunit expressing leukocytes accumulate and/or that CD11d subunit expression is increased in lung macrophages or other pulmonary myeloid cells early after infection. We showed a dramatic accumulation of leukocytes, red blood cells, and fluid in the lungs of CD11d^{+/+} mice. Inflammation and hemorrhage were reduced in the lungs of CD11d^{-/-} animals. In parallel, vascular barrier integrity was impaired in CD11d^{+/+} animals; once CD11d^{-/-} animals had less accumulation of EBD in extravascular lung tissue and lower levels of BAL protein compared to CD11d^{+/+}, although the total number of BAL leukocytes was similar. Compared to CD11d^{+/+}, there were lower levels of inflammatory cytokines that are associated with experimental and clinical malaria in samples from CD11d^{-/-} mice. Most of the leukocytes in CD11d^{-/-} mice are retained in the bone marrow and also there is less CD14⁺ in the peripheral blood when compared to CD11d^{+/+} mice. Our findings demonstrate that the absence of CD11d integrin does not interfere in VCAM-I expression and correlates with a better respiratory function in infected CD11d^{-/-} when compared to CD11d^{+/+} mice. We observed that CD11d/CD18 influences key pathophysiologic events in ARDS in experimental malaria, including pulmonary vascular barrier disruption, inflammation, and hemorrhage.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------|---|
| ACT | -Terapia combinada com artemisinina (<i>artemisinin-based combination therapies</i>) |
| AGM | -Anemia grave da malária |
| ARDS | -Síndrome da angústia respiratória aguda (<i>Acute respiratory distress syndrome</i>) |
| BCA | - Ácido bicinconínico (<i>Bicinchoninic acid</i>) |
| BSA | -Albumina sérica bovina (<i>Bovine serum albumin</i>) |
| CCL-2/MCP-1 | -Proteína quimioatraente de monócitos 1 (monocyte chemotactic protein-1) |
| CCL-5/RANTES | -Regulada pela ativação, expressas e secretadas pelos linfócitos T normais/quimioatraentes de linfócitos T ativados e eosinófilos (<i>Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secrete</i>) |
| CD | - Grupo de diferenciação (<i>Cluster of differentiation</i>) |
| CEUA | -Comitê de Ética e Uso Animal |
| CS | - Proteína circunsporozoíta (<i>Circumsporozoite protein</i>) |
| CSA | - Sulfato de crondoitina A (<i>Chondroitin sulfate A</i>) |
| CXCL-1/KC | - Quimiocina derivada de queratinócitos (<i>Keratinocyte-derived chemokine</i>) |
| CXCL-8/IL-8 | -Inlerleucina 8 (Interleucin 8) |

| | |
|-------------|--|
| DDT | - Dicloro-difenil-tricloroetano (<i>dichlorodiphenyltrichloroethane</i>) |
| DEPC | - Dietilpirocarbonato (<i>Diethylpyrocarbonate</i>) |
| DNA | - Ácido desoxirribonucléico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>) |
| ELISA | -Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>) |
| EMP | - Proteína de membrana eritrocitária (<i>Erythrocyte membrane protein</i>) |
| E-Selectina | - Selectina E (<i>E-Selectin</i>) |
| GAG | -Glicosaminoglicanos (<i>glycosaminoglycans</i>) |
| GPI | - Glicofosfatidilinositol (<i>Glycosylphosphatidylinositol</i>) |
| GM-CSF | -Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>) |
| HCl | - Ácido clorídrico |
| HNP | - Hemácia não parasitada |
| HP | - Hemácia parasitada |
| HUVEC | Células endoteliais de cordão umbilical humano (<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>) |
| HZ | - Hemozoína (<i>Haemozoin</i>) |

| | |
|-----------------|---|
| ICAM-1 | - Molécula de adesão intercelular 1 (<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>) |
| IFN- γ | -Interferon- γ (<i>interferon-gamma</i>) |
| KDa | - Kilodalton |
| LAD I, II e III | -Deficiência na Adesão Leucocitária (<i>Leukocyte Adhesion Deficiency</i>) |
| LBA | -Lavado Broncoalveolar |
| LFA-1 | - Antígeno associado a função de linfócitos-1 (lymphocyte function-associated antigen-1) |
| LPS | - Lipopolisacarídeo (<i>Lipopolysaccharide</i>) |
| MAC-1 | - Complexo de ativação de membrana-1 (membrane-activated complex-1) |
| MC | - Malária cerebral |
| MCE | -Malária Cerebral Experimental |
| MEC | -Matriz Extra Celular |
| MHC | -Complexo principal de Histocompatibilidade (<i>Major histocompatibility complex</i>) |
| MIP-1 α | - Proteínas inflamatórias de macrófagos 1 α (<i>Macrophage inflammatory proteins</i>) |
| MyD88 | - Proteína adaptadora de diferenciação mielóide 88 (<i>Myeloid differentiation primary-response protein-88</i>) |

| | |
|--------------|--|
| OMS | - Organização Mundial de Saúde (<i>World Health Organization</i>) |
| NO | - Óxido Nítrico (<i>Nitric oxide</i>) |
| PAMP | - Padrões moleculares associados a patógenos (<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>) |
| PbA | - <i>Plasmodium berguei</i> Anka |
| PBMC | - Células mononucleares do sangue periférico (<i>peripheral blood monuclear cell</i>) |
| PDTIS | - Programa de desenvolvimento tecnológico em insumos para saúde |
| PECAM-1 | - Molécula de adesão celular plaqueta-endotélio-1 (<i>platelet/endothelial cell adhesion molecule 1</i>) |
| PNCM | - Programa Nacional de Controle da Malária |
| PPR | - Receptores de reconhecimento padrão (<i>Pattern recognition receptors</i>) |
| RNA | - Ácido ribonucléico (<i>Ribonucleic acid</i>) |
| SIVEP | - Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica |
| TGF- β | - Fator de crescimento- β (<i>Transforming growth factor beta</i>) |
| TLR | - Receptores semelhantes ao Toll (<i>Toll-like receptors</i>) |
| TNF | - Fator de Necrose Tumoral (<i>Tumor necrosis factor</i>) |

| | |
|--------|---|
| TRAP | - Proteína adesiva relacionada à trombospondina (<i>Trombospondin-related adhesive protein</i>) |
| TSP | -Trombospondina (<i>Thrombospondin</i>) |
| VCAM-1 | - Proteína de adesão de células vasculares 1 (<i>Vascular cell adhesion protein 1</i>) |
| VLA-4 | - Antígeno muito tardio 4 (<i>Very late antigen-4</i>) |

1. INTRODUÇÃO

1.1. MALÁRIA: DEFINIÇÃO E BREVE HISTÓRICO

A malária é uma doença infecciosa grave, causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*, sendo transmitido através do repasto sanguíneo de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles* (Baker, 2010). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a malária continua sendo um grande problema de saúde pública ocorrendo até 1 milhão de mortes por ano (OMS, 2011b).

A origem da malária é muito controversa, acredita-se que surgiu provavelmente na África de onde disseminou para as áreas tropicais e subtropicais do mundo. Escritos chineses que datam de 5000 anos e textos hindus de 3500 anos descrevem febre, esplenomegalia e outros sintomas que indicam episódios de malária. Os relatos de sintomas que remetem a malária continuam a surgir em escritos egípcios e sumerianos, estes últimos são os primeiros a relatar febres mortais o que indica o surgimento de infecções por *Plasmodium falciparum*. Em 323 a.C. Alexandre o Grande, faleceu na rota entre a Mesopotâmia e a Índia, provavelmente de malária (Carter e cols., 2002).

Diversos médicos gregos e romanos deixaram várias referências sobre a doença, que ocorria em epidemias na Grécia. Hipócrates relata em seu livro sobre febres terçã benigna (*Plasmodium vivax*), terçã maligna (*P. falciparum*), e quartã (*Plasmodium malariae*) e suas relações com os pântanos. Com o fim do Império Romano, ocorre à epidemia de malária, na Itália e em diversas partes da Europa, onde era conhecida como “febre romana” (Cunha e cols., 2008). No final do século XVI com a chegada dos europeus e africanos ao Novo Mundo, trazem também a malária, para as Américas. Já no século XVII ocorreu a observação por padres jesuítas da utilização, por populações indígenas da América do Sul, de cascas de uma árvore nativa para o tratamento de alguns tipos de febre. Seu uso se espalhou rapidamente pela Europa e passou a ser conhecido como “pó dos jesuítas”. Em 1820 os químicos franceses Pierre Joseph Pelletier e Joseph Bienaime Caventou identificaram o alcalóide quinina como o ingrediente ativo da casca da cinchona (França e cols., 2008).

No século XVIII a doença recebeu o nome italiano de “mal aire”, que significa “mau ar” ou ar insalubre, na época ainda acreditava-se que era causada pelas emanções provenientes dos pântanos. Em 1880, o cirurgião do exército francês Charles Louis Alfonse Laveran foi o primeiro a encontrar o parasito da malária no interior de glóbulos vermelhos humanos e em 1897 o médico britânico Ronald Ross observa o parasito da malária no interior do mosquito, o qual havia se alimentado com sangue de um doente, descobrindo assim a forma de transmissão da doença (Cox, 2010). O quadro completo do ciclo de

desenvolvimento do parasito da malária, no homem e na fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*, e no domicilio humano foi descoberto posteriormente pelos pesquisadores italianos Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli, Batista Grassi e pelo brasileiro Carlos Chagas em estudos realizados entre 1898 e 1906 (Lacerda e cols., 2011; Majori, 2012).

As dificuldades no fornecimento do quinina durante a Primeira Guerra Mundial estimularam pesquisadores alemães para a obtenção de antimaláricos sintéticos, culminando com o desenvolvimento da cloroquina em 1934 (Krafts e cols., 2012). Paralelamente, foram desenvolvidos estudos para a síntese de substâncias com ação inseticida, que apresentaram seu ápice em 1942, com a obtenção por Paul Muller do composto dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), que apresentava grande atividade inseticida, grande poder residual e baixo custo (D'Amato e cols., 2002).

Atualmente a cloroquina ainda é utilizada como antimalárico entre outros medicamentos, tais como: primaquina (John e cols., 2012), mefloquina e principalmente os derivados de artemisinina em combinação com outros antimaláricos (OMS, 2011b; White, 2008). O uso de inseticidas, em mosquiteiros ou nas paredes internas das casas ainda é método mais eficiente de controle do vetor, porém em 1970 o DDT foi banido em vários lugares do mundo (D'Amato e cols., 2002). No Brasil, o DDT já não era usado desde a década de oitenta sendo abolido em 2009, pelo seu efeito cancerígeno em humanos dentre outros efeitos sobre a vida animal.

1.1.1. EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE DA MALÁRIA

Segundo o relatório da OMS de 2011, a malária continua sendo a maior doença parasitária humana gerando em torno de 300 milhões de casos por ano, desencadeando até 1 milhão de mortes. O mesmo relatório descreve que a mortalidade mundial por malária teve uma redução de mais de 25%, porém muitas crianças continuam morrendo em regiões africanas (OMS, 2011b).

A malária é uma emergência global que afeta principalmente mulheres e crianças pobres, perpetuando o ciclo vicioso de pobreza em países em desenvolvimento. Como já citado anteriormente, encontra-se relatos de malária desde a antiguidade. A malária já foi considerada uma epidemia mundial, tendo diminuído sua área de ocorrência com o passar dos anos e com as campanhas de erradicação. Sendo assim observamos na figura 1.1.1.1 que a maior incidência de casos de malária, hoje, ocorre na África, Ásia e Américas Central e do Sul. Dentre estas áreas tropicais, a maior parte dos casos ocorre na África subsaariana.

Segundo dados da OMS, a maior parte da morbidade e da mortalidade continua sendo atribuída a infecções pelo *P. falciparum* (OMS, 2011b).

Nas Américas a malária ocorre em 21 países, desses 17 tem a malária sob controle. Argentina, El Salvador, México e Paraguai encontram-se em fase de pré-eliminação da malária. Entre os anos de 2000 e 2009 o número de casos reportados caiu mais de 43%, sendo o principal agente de malária nesta região o *P. vivax*. O Brasil sozinho é responsável por 50-60% dos casos de malária na região das Américas (OMS, 2011b).

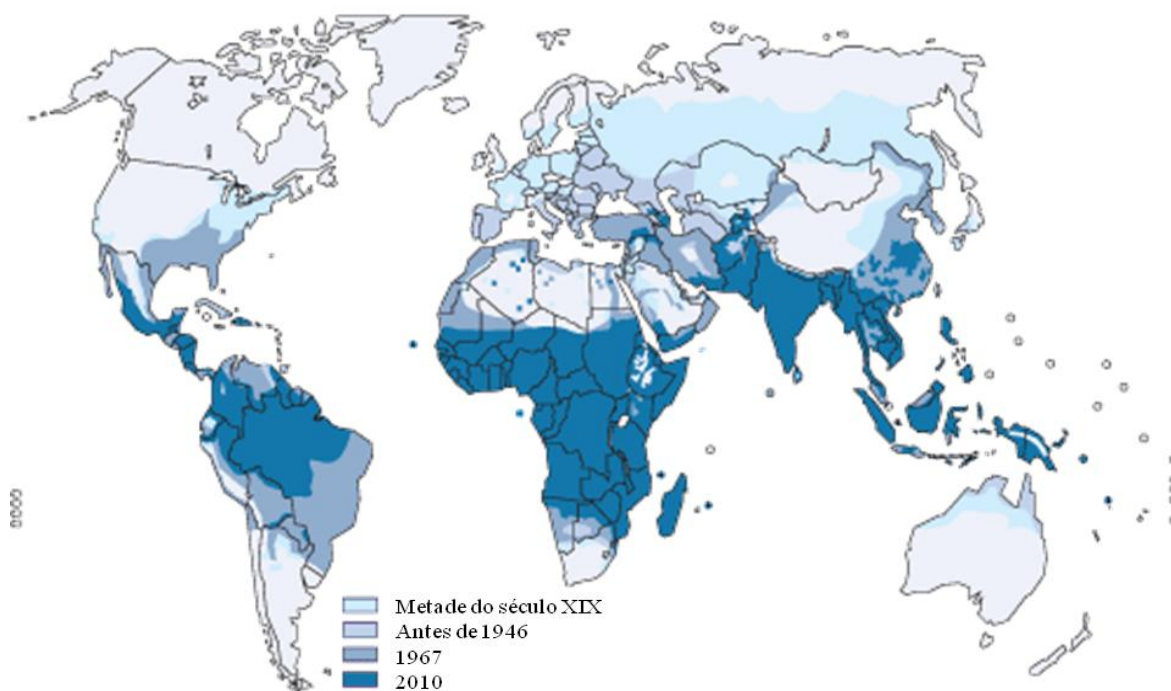


Figura 1.1.1.1: Áreas com ocorrência de Malária no mundo. Distribuição dos casos de malária ao redor do mundo desde a metade do século XIX até 2010. Adaptado da OMS, 2011

A malária continua a ser um grave problema no Brasil, principalmente na região da Amazônia Legal, que compreende os estados do Acre, Amapá, Amazonas, parte do Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, e é responsável por volta de 99,5% dos casos do país (SIVEP, 2011), a alta incidência, dificulta o turismo e os efeitos debilitantes da doença reduzem a capacidade produtiva da população e da região como um todo. No Brasil, existem três espécies de Plasmodia causadores da malária: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*. No final da década de 80 o número de casos de malária vivax suplantou os casos de malária falciparum e desde então tem sido a forma predominante no país (SIVEP, 2011).

No ano de 2010, foram 330.000 casos confirmados de malárias, com cinco mil hospitalizações e setenta e dois casos de óbitos. As condições precárias de saneamento básico e educação sanitária geram um maior número de casos em áreas rurais, mas também há

registros em áreas urbanas, principalmente nos estados que fazem parte da Amazônia Legal (SIVEP, 2011). No Brasil, as áreas de transmissão são classificadas de acordo com o seu Índice Parasitário Anual (IPA), sendo classificado como de alto risco de transmissão aqueles municípios com $IPA \geq 50$ casos/1000 habitantes, de médio risco com IPA entre 10 e 50 casos/1000 habitantes, de baixo risco aqueles que possuem menos de 10 casos/1000 habitante e sem risco são as áreas com IPA menor de 1 caso/1000 habitantes. Como observamos na figura I.1.1.2, ainda são muitos os municípios no Brasil classificados como de alto e médio risco de transmissão.

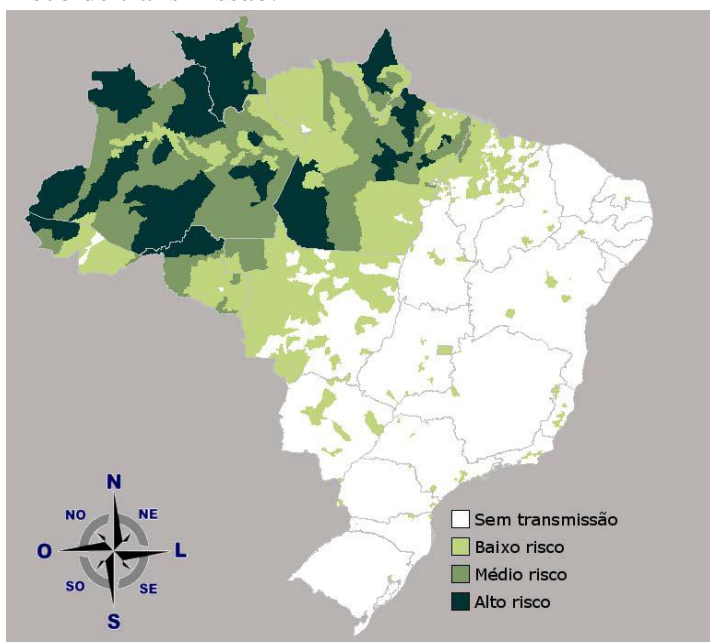


Figura 1.1.1.2: Áreas com ocorrência de Malária no Brasil. No Brasil os municípios são classificados de acordo com o índice parasitário anual em alto risco ≥ 50 casos/1000 habitantes, de médio risco entre 10 e 50 casos/1000 habitantes, de baixo risco < 10 casos/1000 habitante e sem risco < 1 caso/1000 habitantes. SIVEP, 2011

A luta pela erradicação e/ou controle da malária data de muito tempo. Desde os tempos de Hipócrates já se recomendava a drenagem dos pântanos (Cunha e cols., 2008). A OMS há muito tem feito campanhas de erradicação mundial visando controlar a epidemia. As estratégias de controle têm levado em consideração as características de cada região, mas de uma maneira geral são baseadas em três pilares: o diagnóstico precoce, o tratamento imediato e o controle do vetor.

O diagnóstico precoce da malária é muito importante por ajudar a evitar a disseminação da doença pela comunidade. O método ideal para uso de rotina deve ser uma técnica sensível, fácil de realizar e interpretar, de baixo custo e que se adaptem às condições das áreas endêmicas. A gota espessa é amplamente utilizada na detecção de *Plasmodium* sp. em hemácias, uma vez que a grande concentração do sangue por campo microscópico favorece o encontro do parasito (Saúde, 2009). O teste microscópico é de extrema eficácia, porém requer habilidade técnica, que não é sempre encontrado em lugares endêmicos. Testes rápidos de diagnóstico, que utilizam anticorpos monoclonais para proteínas do parasito (Check-Pf®, Malar-Check®-específico para *P. falciparum* e ICT-PfPv®, Optimal®-diferencia *P.*

falciparum de outras espécies) têm sido muito utilizado pela rapidez e facilidade de manuseio. Uma terceira forma de análise e diagnóstico que tem sido aplicada consiste na identificação do DNA do parasito através da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase do tipo nested (PCR nested), esta metodologia tem muito valor em estudos epidemiológicos (OMS, 2010; Saúde, 2009).

Em relação ao tratamento da malária, quanto mais imediato, maior a probabilidade de redução dos efeitos da doença e prevenção de mortes. O esquema recomendado para o tratamento de malária nos casos de infecções por *P. falciparum*, desde 2006, tem sido os combinados de artemisinina (ACT), considerando a grande resistência do parasito a cloroquina, sulfadoxina-piremetamina, amodiaquina, mefloquina e quinina. Porém em casos de malária gerados por *P. vivax* ou *Plasmodium ovale* é necessário o uso de primaquina, que é importante na eliminação das formas hipnozoítas do fígado. Pesquisas têm sido realizadas visando novos medicamentos ou combinações (Ravi Chandra e cols., 2004; Whegang Youdom e cols., 2012) e vacinas (Hill, 2011). O principal alvo destas pesquisas tem sido mutações que geram resistência a infecção como: as hemoglobinopatias (Taylor e cols., 2012), ou a interação com o fator Duffy (Mercereau-Puijalon e cols., 2010).

A prevenção da malária tem como chave o controle do vetor para redução da transmissão. Para o controle do vetor são utilizados dois métodos principais o uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas, e a aplicação de inseticidas nas paredes internas das residências. O dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) foi muito importante na eliminação da malária em diversos lugares do mundo inclusive em alguns estados brasileiros, porém o seu uso gera um grande problema ambiental. Atualmente os organoclorados também têm sido utilizados em algumas regiões, porém os inseticidas sintéticos derivados de piretrinas os piretróides são os mais usados. Dependendo do inseticida usado e do tipo de superfície que ele é aplicado, sua efetividade pode variar de 3 a 12 meses (OMS, 2011a).

No Brasil desde 2003, em concordância com os programas da OMS de erradicação da malária, foi criado o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM), que se baseia no diagnóstico precoce, tratamento imediato e controle do vetor. Desde a implementação do programa, diminuiu-se o número de casos de infecções, de mortes e de municípios considerados de alto risco de transmissão. O programa preocupa-se também com a vigilância em áreas não endêmicas, em estados como Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo dentre outros, onde têm ocorrido surtos nos últimos anos (Saúde, 2003).

1.1.2. CICLO DO PARASITO

A malária é transmitida para hospedeiros vertebrados, como camundongos, macacos e humanos através da picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*, quando infectadas pelo protozoário do gênero *Plasmodium*. O gênero *Plasmodium* pertence ao filo Apicomplexa, da classe Aconoidasida, ordem Haemosporida e família *Plasmodiidae* (Antinori e cols., 2012; Collins, 2012). Os representantes deste filo caracterizam-se pela presença do complexo apical, que é um conjunto de estruturas e proteínas importante na invasão celular (Gaur e cols., 2011).

Todas as espécies da ordem Haemosporidae são parasitos intracelulares obrigatórios e possuem dois hospedeiros: um vertebrado, no qual ocorre a reprodução assexuada, e outro invertebrado, no qual ocorre a reprodução sexuada por fertilização. No hospedeiro vertebrado a simples inoculação dos esporozoítos não causa patologia, a manifestação da doença só ocorrerá após o parasito passar pelos hepatócitos (Rey, 2008).

Os mosquitos injetam os esporozoítos, durante o repasto sanguíneo, no tecido subcutâneo (ou na corrente sanguínea de maneira muito menos frequente). Estima-se que os esporozoítos podem levar até uma hora para penetrarem nos vasos sanguíneos e/ou vasos linfáticos (Amino e cols., 2006; Gueirard e cols., 2010). Tanto os esporozoítas que ficam na derme, quanto os que seguem pelos vasos linfáticos e atingem os linfonodos, podem se desenvolver em merozoítos infectantes, sendo liberados através de merossomos (estrutura vesicular) (Gueirard e cols., 2010). Os esporozoítos que seguem para os linfonodos são importantes para geração da resposta imune do hospedeiro, através da apresentação de antígenos por células dendríticas, às células T CD8⁺ (Chakravarty e cols., 2007). Os esporozoítos que ficam na derme também podem migrar para os folículos pilosos, sítio de privilégio imunológico (Meyer e cols., 2008), onde permanecem dormentes ou em crescimento lento. Sugerindo que essas formas possam atuar como um reservatório de merozoítos infectantes, e/ou atuem como fontes de antígenos para os linfonodos drenantes (Gueirard e cols., 2010).

Na corrente sanguínea os esporozoítos migram passivamente aos sinusoides hepáticos. Os esporozoítas ativamente atravessam a barreira sinusóide para ganhar acesso aos hepatócitos. Alguns trabalhos, utilizando o modelo murinho, demonstram uma íntima relação entre as células de Kupffer e a entrada dos esporozoítos no hepatócitos, uma vez que a morte das células de Kupffer vão formar uma porta de entrada para o fígado, e evitam a fagocitose do esporozoítos (Lindner e cols., 2011; Menard e cols., 2008).

O processo de entrada no hepatócitos requer a ação de moléculas de adesão, que permitem o processo de endocitose do parasito. Ainda não está claro qual o estímulo necessário para que os esporozoítos deixem de migrar e invadam os hepatócitos, acredita-se que seja o encontro com os proteoglicanos expressos nos hepatócitos, que inicie o processo. Sabe-se que o domínio de trombospondina (TSP) da proteína circunsporozoíta (CS) e as proteínas adesivas relacionadas a trombospondina (TRAP), encontradas no esporozoíto, ligam-se aos proteoglicanos de heparan sulfato expresso na superfície dos hepatócitos e nas células de Kupffer (Miller e cols., 2002; Schofield e cols., 2005). Esta fase do ciclo malária desenvolvido nos hepatócitos é conhecida como fase pré-eritrocítica.

Uma vez os parasitos dentro dos hepatócitos, estes formam um tipo de vacúolo parasitóforo. A membrana do vacúolo parasitóforo constitui a principal interface entre o parasito e o hospedeiro, sendo derivada da membrana citoplasmática do hospedeiro, mas com adições de proteína e possivelmente lipídeos de origem parasitária. A membrana do vacúolo parasitóforo está envolvida, portanto, nas interações entre o parasito e o hospedeiro, como na captação de nutrientes ou em outras formas de manipulação da célula do hospedeiro (Lindner e cols., 2011). Dentro do vacúolo parasitóforo os parasitos ganham um formato arredondado e perdem o aparelho apical, sendo denominado de criptozoítas iniciando o ciclo de reprodução assexuada, conhecido como ciclo pré-eritrocítico ou esquizogonia pré-eritrocítica. Os parasitos neste estágio são chamados de esquizontes, e multiplicam-se excessivamente levando ao rompimento da célula parasitada, e à liberação dos novos merozoítas, para circulação sanguínea por meio de merossomos, como vemos na figura 1.1.2.1 (Lindner e cols., 2012; Rey, 2008). Os merossomos são formados a partir da membrana plasmática da célula onde está ocorrendo a multiplicação do parasito, dificultando o reconhecimento pelo sistema imunológico do hospedeiro (Sturm e cols., 2006).

Quando a malária é ocasionada pela infecção do *P. vivax* ou *P. ovale*, ainda no fígado, alguns esporozoítos, não se multiplicam, permanecendo quiescentes, sendo chamados de hipnozoíta. Dessa forma, por mecanismos ainda não esclarecidos, passando algum tempo, pode iniciar um novo ciclo sanguíneo sendo responsável, portanto, pelas recaídas da doença (Markus, 2010). O ciclo hepático, dependendo do agente, tem a duração média de 14 dias, sendo este o tempo de incubação da doença.

O ciclo intraeritrocítico começa com o rompimento do merossomo, e a invasão de hemácias do hospedeiro pelos merozoítos. Os merozoítos se desenvolvem após um período de 24 horas em trofozoítos maduros, que sofreram divisão celular formando o esquizonte sanguíneo. O rompimento do esquizonte sanguíneo pode se dar em ciclos de 48 horas (*P.*

falciparum, *P. vivax* e *P. ovale*) ou de 72 horas (*P. malariae*), e libera merozoítos que infectarão outros eritrócitos, desencadeando o pico febril e a resposta imune (Figura I.1.2.1).

A entrada nas hemácias pelos merozoítos e nos hepatócitos pelos esporozoítos é mediada pelos receptores encontrados nas organelas do complexo apical do parasito (roptrias, micronemas e grânulos densos), que definem o filo Apicomplexa e se ligam a células do hospedeiro. As proteínas dos hospedeiros já conhecidas por ser alvo de ligação dos parasitos, para entrada destes nas hemácias, são: proteínas do sistema sanguíneo Duffy, glicoforina A, B e C, banda 3, CD36 (glicoproteína IV de plaqueta, GP-IV), ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1), sulfato de condroitina A (CSA) dentre vários outros (Gaur e cols., 2011; Miller e cols., 2002).

Alguns trofozoítas se desenvolvem ainda, em formas que não possuem mais a capacidade de divisão celular, os gametócitos. Não se sabe muito bem, qual o mecanismo para formação dos gametócitos, porém na malária vivax, eles já estão presentes na circulação periférica a partir do segundo dia de manifestação clínica. Já na malária falciparum, em média só é possível encontrar os gametócitos após sete dias de infecção. Os gametócitos presentes na circulação periférica podem ser ingeridos por outro anofelino que venha alimentar-se do sangue do hospedeiro, iniciando assim o ciclo sexuado do parasito no hospedeiro invertebrado (figura I.1.2.1 ciclo esporogônico). No estômago do mosquito ocorre o encontro dos gametas e a formação do zigoto, que sob a forma oocineto penetra no epitélio, e transforma-se em oocisto que se desenvolve em esporozoíto e migra até a glândula salivar, sendo passado para o hospedeiro vertebrado, no próximo repasto sanguíneo (Schofield e cols., 2005).

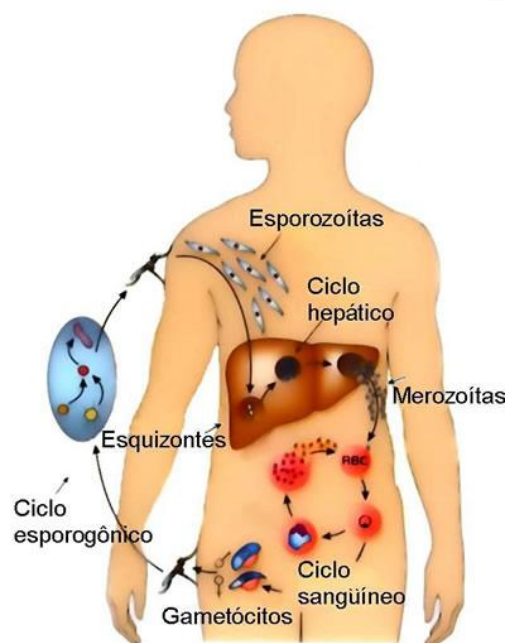


Figura I.1.2.1: Ciclo do Plasmodium sp. Diferenciando fase sexuada (ciclo esporogônico que ocorre no hospedeiro invertebrado) da fase assexuada (ciclo hepático e ciclo sanguíneo que ocorrem no hospedeiro vertebrado). Figura adaptada a partir de Richie & Saul, 2002

Atualmente cinco espécies de parasitos do gênero *Plasmodium*, são consideradas capazes de infectar humanos: *P. ovale*, *P. malariae*, *P. vivax*, *P. falciparum* e *Plasmodium Knowlesi* (Antinori e cols., 2012).

- *P. ovale* foi descoberto em 1922 por Stephens, e é encontrado no Continente Africano. Esta espécie causa uma infecção, conhecida como febre terçã benigna que se caracteriza por acessos febris a cada 48 horas. Afeta principalmente reticulócitos, que pouco aumentam de tamanho e adquirem aspecto ovalado, e apresentam Grânulos Schuffner. Não é conhecido casos de malária grave em decorrência da infecção por esta espécie, porém ela pode gerar recaída por apresentar a forma hipnozoíta em seu ciclo de desenvolvimento (Antinori e cols., 2012).

- *P. malariae* foi identificado em 1886 por Camillo Golgi, e é também frequentemente silencioso, porém pode determinar a formação de complexo imune em decorrência da infecção, levando a uma inflamação nos néfrons podendo causar infecção crônica. Esta espécie é conhecida por causar febre quartã, que é caracterizada por acessos febris a cada 72 horas. Apesar de raramente ser fatal, recorrências de malária *malariae* são comuns e podem ser longas, durando em alguns casos até 30 anos após a primeira infecção. A infecção afeta principalmente hemácias maduras, que não aumentam de tamanho. Uma característica comum desta espécie é o fato do trofozoíta maduro apresentar-se como uma “banda” ou “faixa” equatorial sobre a hemácia (Antinori e cols., 2012).

- O *P. vivax* também foi identificado 1886 por Camillo Golgi, e é comumente caracterizado como febre terçã benigna, por ter um ciclo de acessos febris de 48 horas. A infecção por *P. vivax* desencadeia febre aguda e anemia, especialmente na Ásia, América do Sul e Oceania. Tem sido descrito cada vez mais casos de malária grave em decorrência desta espécie (Lacerda e cols., 2012b). Afeta principalmente reticulócitos, que aumentam de tamanho, e apresentam Grânulos Schuffner. Pode gerar recaída por apresentar a forma hipnozoíta em seu ciclo de desenvolvimento (Antinori e cols., 2012).

- *P. falciparum* é responsável pela maioria dos casos de infecções graves e mortes, descoberto em 1880 por Charles Alphonse Laveran. O *P. falciparum* é endêmico na África subsaariana e em toda região tropical. Esta espécie causa a febre terçã maligna com acessos febris a intervalos de 36 a 48 horas, sendo o responsável pela ocorrência de malária cerebral que é a principal “causa mortis” entre pessoas acometidas pela malária. Afeta todos os tipos de hemácias, de jovens a senescentes, e estas não sofrem alteração de tamanho, mas apresentam irregularidades na superfície (Antinori e cols., 2012).

- *P. Knowlesi* provavelmente foi descrito pela primeira vez pelo italiano Giuseppe Franchini na circulação de *Macaca fascicularis*, sendo identificada a primeira vez no homem

por Knowles e Das Gupta em 1932. O *P. Knowlesi* foi o mais recentemente descrito como causador de malária em humanos (Collins, 2012), e é encontrado principalmente na Malásia. A infecção é caracterizada por acessos febris a cada 24 horas. Afeta todos os tipos de hemácias, de jovens a senescentes. Casos de malária grave em decorrência da infecção por esta espécie já foram documentados (Antinori e cols., 2012; Cox-Singh e cols., 2010; Fatih e cols., 2012).

Quando os agentes maláricos são transmitidos ao hospedeiro vertebrado muitas vezes causam infecções silenciosas, devido a capacidade do sistema imune inato de prevenir a doença. Entretanto, a resposta imune de alguns indivíduos não consegue deter a proliferação do patógeno, o que gera uma infecção crônica, que pode se desenvolver em um único órgão, ou em múltiplos órgãos. Em áreas de alta transmissão é comum principalmente em recém-nascidos e crianças. As manifestações clínicas da doença são acidose metabólica (principalmente estresse respiratório), malária cerebral (MC) e anemia grave da malária (AGM) (Schofield e cols., 2005). Contudo, nas áreas de baixa transmissão é comum ocorrerem distúrbios adicionais como falência renal, edema pulmonar, choque e icterícia. A malária placentária também é uma complicação séria, que ocasiona insuficiência placentária com baixo ganho de peso e pode levar a perda do feto.

1.1.3. MODELOS EXPERIMENTAIS

Protozoários do gênero *Plasmodium* podem infectar tanto humanos, quanto símios, galináceos ou roedores. Diante do amplo espectro de hospedeiros vertebrados capazes de serem infectados, a utilização de modelos animais para entender a fisiopatologia da malária humana é muito disseminado. O uso do modelo animal tem vantagens e desvantagens, porém tem sido essencial no esclarecimento dos mecanismos fisiopatogênicos, do desencadeamento da resposta imunitária dos hospedeiros e dos mecanismos genéticos de resistência a infecção.

O modelo murino, é o mais amplamente utilizado na pesquisa, para tanto são utilizados: *Plasmodium yoelii*, *Plasmodium chabaudi*, *Plasmodium vinckei* e *Plasmodium berghei* (Tabela 1.1.3.1). O modelo murino é utilizado para estudos de malária cerebral experimental (MCE) por estar associado ao sequestro de hemácias parasitadas, em estudos para o desenvolvimento de vacinas, e também para compreensão dos mecanismos imunes como a imunoregulação por citocinas (Caillard e cols., 1992; LaCrue e cols., 2011; Li e cols., 2001; Stevenson e cols., 2004).

A infecção com *Plasmodium berghei* da cepa Anka (PbA) é um bom modelo para o estudo da fisiopatologia gerada pela malária. A infecção com PbA tem sido utilizada

principalmente para estudos de: MCE (Engwerda e cols., 2005; Randall e cols., 2008), malária placentária (Marinho e cols., 2009) e injúria pulmonar (Lovegrove e cols., 2008; Van den Steen e cols., 2010). Em muitos estudos reporta-se que a infecção por PbA gera acúmulo de leucócitos e sequestro de plaquetas (Combes e cols., 2006; Martins e cols., 2009), porém Franke-Fayard (2010) demonstrou elegantemente que hemácias parasitadas por PbA são capazes de aderir ao endotélio capilar dos tecidos pulmonares, adiposo e esplênico de camundongos infectados, sendo o CD36 o principal receptor envolvido nesta resposta adesiva (Franke-Fayard e cols., 2010; Franke-Fayard e cols., 2005).

Contudo, há diferenças entre a malária humana e murina. Dentre as principais diferenças podemos ressaltar, que na malária murina o nível de parasitemia é muito maior. O sequestro de hemácias parasitadas em órgãos como o fígado, pulmão, tecido adiposo e cérebro são pouco reportados na malária murina, porém ocorre intensa adesão de leucócitos, de maneira inversa a doença humana (Combes e cols., 2006). Além disso, a infecção do animal é realizada, em sua grande maioria, por via intraperitoneal ou intravenosa, não ocorrendo a fase exoeritrocítica da infecção. Entretanto, cabe ressaltar que nenhuma manifestação patológica é atribuída a essa fase no hospedeiro vertebrado (Garcia, 2010; Li e cols., 2011).

Tabela 1.1.3.1: Infecções por plasmódios murinos em diversas linhagens de camundongos.

| Parasito | Cepa | Linhagem do Camundongo | Letalidade | Análise Experimental |
|-----------------------------|-------|--|------------|--|
| <i>P. chabaudi chabaudi</i> | AS | CBA C57BL/6 BALB/c | Não Letal | Mecanismo imune Sinais Clínicos Sequestro |
| | | 129sv A/J DBA/2 | Letal | Patogênese Quimioterapia Resistência e Suscetibilidade Mecanismo imune |
| | CB | CBA C57BL/6 | Letal | Mecanismos Imune |
| <i>P. chabaudi adami</i> | | BALB/c C57BL/6 | Não Letal | Mecanismos Imune |
| <i>P. yoelli</i> | 17XL | CBA BALB/c C57BL/6 DBA Suízo | Letal | Mecanismo Imune Patogênese Sequestro Malária Cerebral Experimental (MCE) |
| | YM | CBA BALB/c C57BL/6 DBA | Letal | Vacina Patogênese Hipoglicemia |
| | 17XNL | CBA BALB/c C57BL/6 DBA | Não Letal | Resposta Imune Patogenese Vacina |
| <i>P. vinckei vinckei</i> | | BALB/c | Letal | Quimioterapia Mecanismo imune Patogênese Sinais Clínicos Sequestro |
| <i>P. vinckei petteri</i> | CR | C57BL/6 BALB/c | Não Letal | Mecanismos Imune |
| <i>P. berghei</i> | ANKA | BALB/c C57BL/6 CBA | Letal | Patogênese MCE Sequestro |
| | K173 | BALB/c CBA DBA C57BL/6 | Letal | Controle para MCE Patogênese |

Adaptado de Li e cols., 2001; Combes e col 2005 & Li Jian e cols., 2011

1.1.4. FISIOPATOLOGIA

A fisiopatologia da malária é caracterizada pela ação direta do parasito sobre as células vermelhas do sangue do hospedeiro vertebrado, através de sua invasão e crescimento, levando à destruição das hemácias e conseqüentemente à anemia. Além disso, a relação do parasito

com o sistema imune inicia uma rápida e robusta resposta inflamatória na tentativa de controlar a infecção. No entanto, é importante ressaltar que esta rápida e potente resposta do sistema imune inato está relacionada ao desenvolvimento da malária grave, tanto de maneira direta ou por amplificar os efeitos da resposta imune adaptativa (Schofield, 2007; Stevenson e cols., 2004).

Para o início da resposta imune inata é necessário que o patógeno seja reconhecido através de seu epítotope imunogênico (Padrão Molecular Associado ao Patógeno PAMPs) pelos receptores de reconhecimento padrão (RRP) presentes na célula hospedeira. Estudos indicam que o principal PAMP dos parasitos do gênero *Plasmodium* é o Glicosilfosfatidilinositol (GPI). Estudos demonstraram que a administração de GPI purificado em camundongos CBA/Ca, foi capaz de modular a expressão de citocinas inflamatórias envolvidas na patogênese da malária, como fator de necrose tumoral (TNF) e interleucinas (IL-1 e IL-2) gerando uma resposta inflamatória muito semelhante a uma infecção por malária na fase aguda (Schofield e cols., 1993). Observou-se em estudos “in vitro” utilizando macrófagos peritoneais murinos provenientes de animais pré-estimulados com tioglicolato, macrófagos da linhagem J774A.1, macrófagos da linhagem RAW264.7, células dendríticas murinas e células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) estimulados com GPI purificado de *P. falciparum*, a liberação de TNF, IL-12 e a síntese de óxido nítrico (NO) (de Souza e cols., 2010; Kumar e cols., 2012; Naik e cols., 2000; Schofield e cols., 1993; Tachado e cols., 1996; Vijaykumar e cols., 2001). Aumento da expressão moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e molécula de adesão de célula endotélio vascular 1 (VCAM-1) foi observado em células HUVEC estimuladas com GPI purificado de *P. falciparum* (Schofield e cols., 1996). Estudos clínicos com populações do oeste do Quênia sugerem que a falta de anticorpos anti-GPI, esteja relacionado ao agravamento do quadro de malária (Naik e cols., 2000).

Outro possível PAMP associado a malária é a hemozoína (Bonifacio e cols., 2008; Ropert e cols., 2008), formado pela cristalização da molécula de heme, deixando assim de ser tóxico para o parasito. A hemozoína chama atenção por ter bioatividade contraditória, como por exemplo, tanto induzir (Coban e cols., 2005) como inibir (Skorokhod e cols., 2004) a maturação de células dendríticas, por modular a liberação de citocinas de células do tipo Th1 e Th2 (Anyona e cols., 2012; Coban e cols., 2005; Sherry e cols., 1995) e também tem efeito sobre a resposta de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de humanos, diminuindo a sua capacidade fagocítica, a liberação de citocinas e induzindo a peroxidação lipídica (Barrera e cols., 2011; Deshpande e cols., 2004; Schwarzer e cols., 1992). Além disso, ao analisar macrófagos peritoneais obtidos de animais BALB/c infectados com *P. chabaudi chabaudi*, e macrófagos peritoneais estimulados com hemozoína de *P. chabaudi*

chabaudi e hemozoína sintética, estas células apresentaram deficiências na apresentação de antígenos a células T de hibridoma 1E5.11 sugerindo que a fagocitose da hemozoína poderia estar afetando ambos o processamento e a apresentação de antígeno (Scorza e cols., 1999). As variações na resposta imune gerada pela hemozoína podem ter relação com a metodologia escolhida, pois estas preparações de hemozoína sintética são heterogêneas, e contém vários bioativos ainda não caracterizados (Schofield, 2007).

O reconhecimento do parasito pelo hospedeiro ou de seus produtos bioativos se dá por vários membros da família de receptores semelhantes ao Toll (TLR) (Esposito e cols., 2012; Wiley e cols., 2011; Zhu e cols., 2012). O receptor TLR-4 desempenha um papel importante no reconhecimento do *P. falciparum* por interagir com GPI e heme e assim desencadear a expressão de mediadores inflamatórios tanto em PBMCs quanto em macrófagos peritoneais provenientes de animais C57BL/6 (Figueiredo e cols., 2007; Krishnegowda e cols., 2005). Em um estudo de caso realizado em Uganda, que comparou crianças apresentando malária cerebral, e crianças com malária não complicada, demonstrou que polimorfismos no receptor TLR-2, estariam levando a uma resposta inflamatória menos intensa e a uma maior proteção (Greene e cols., 2012). Trabalhos demonstram que ao estimular com GPI macrófagos derivados de células de medula óssea provenientes de animais C57BL/6 deficientes para TLR-2 (TLR2^{-/-}) e PBMCs tratadas com anti-TLR-2, uma menor produção de citocinas como TNF. Esses trabalhos demonstram ainda que a proteína intracelular adaptadora codificada pelo gene 88 responsável pela primeira diferenciação mielóide (MyD88) (Coban e cols., 2007; Krishnegowda e cols., 2005; Kumar e cols., 2012; Langhorne e cols., 2008) é uma importante proteína adaptadora de TLR, em processos infecciosos desencadeados pelo *Plasmodium* sp.

A proteína MyD88 também foi demonstrada ser importante para o reconhecimento da hemozoína, pelo TLR-9, e na resposta imune gerada pela infecção por *P. yoelli* (Fu e cols., 2012). Estudos “in vivo” com injeção de hemozoína proveniente de *P. falciparum* e de hemozoína sintética em animais TLR2^{-/-} e em animais deficientes para MyD88 (MyD88^{-/-}) demonstraram menor liberação de citocinas inflamatórias no plasma. Adicionalmente estudos “in vitro” utilizando culturas de esplenócitos e células dendríticas murinas, estimuladas com hemozoína de *P. falciparum* demonstraram menor liberação de citocinas inflamatórias, no sobrenadante das culturas (Coban e cols., 2005). Animais MyD88^{-/-} demonstraram ainda, uma menor produção de citocinas como TNF e IFN- γ , tendo os sintomas da doença gerada pela infecção com *P. chabaudi chabaudi* (AS) atenuados (Franklin e cols., 2007), e quando infectados com *P. berghei* NK65 apresentaram uma menor injúria hepática, desencadeada por uma menor liberação de IL-12 (Adachi e cols., 2001). A ausência da proteína MyD88 foi

capaz de gerar maior sobrevivência em animais infectados com *P. berghei* Anka, enquanto os animais selvagens morreram de malária cerebral experimental (Coban e cols., 2007).

Após o reconhecimento do parasito pelo sistema imunológico inicia-se uma resposta imuno-inflamatória no hospedeiro buscando neutralizar os efeitos gerados pela infecção. O parasito da malária por ser um organismo intracelular obrigatório de hemácias, seria destruído com a passagem da hemácia parasitada (HP) pelo baço, o que torna o sequestro de HPs em sítios distantes um mecanismo importante de sobrevivência (Schofield, 2007). O sequestro se dá através da adesão da HPs nas células endoteliais dos capilares ou nas vênulas pós capilar de vários órgãos. O sequestro de HPs pode levar à obstrução mecânica da microvasculatura, contribuindo para uma patologia local ou órgão específico (Baruch, 1999; Miller e cols., 2002; Schofield e cols., 2005).

A presença do parasito na hemácia leva a formação de protusões em sua membrana, que são importantes para a adesividade dessas. Em infecções por *P. falciparum*, a proteína presente na superfície das hemácias recebe o nome de proteína de membrana eritrocítica 1 (PfEMP-1), que é codificada por uma grande e diversificada família de genes *var* que esta envolvida na variação antigênica clonal, como podemos ver nos seis domínios adesivos representados na figura 1.1.4.1, que variam a cada nova multiplicação. Cada parasito codifica aproximadamente 50 cópias de genes *var* que variam entre as cepas, resultando numa grande diversidade entre as famílias de parasitos (Baruch, 1999; Claessens e cols., 2012; Miller e cols., 2002).

Os domínios adesivos dos parasitos presentes na membrana das hemácias se ligam a vários receptores de membrana das células do hospedeiro. Na figura 1.1.4.1 podemos observar que na malária cerebral, moléculas como ICAM-1, VCAM-1 e principalmente o CD36 têm papel fundamental no sequestro de hemácias nos vasos sanguíneos (Janes e cols., 2011; Mo e cols., 2008; Wu e cols., 2011). No caso das complicações placentárias, sabe-se que há uma preferência pela ligação dessas moléculas com o sulfato de condroitina A (CSA). Porém, outras moléculas de adesão como: a molécula de adesão celular plaqueta-endotélio-1 (PECAM-1;CD31), integrinas CD18, trombospondina (TSP), E selectina (E-selectina; CD62-E) e o ácido hialurônico presente em células endoteliais vasculares, são importantes no processo de remoção das hemácias da circulação, gerando uma concentração HPs em órgãos alvos que possuem mais receptores ligantes, ocasionando maiores efeitos patológicos (Baruch, 1999; Faille e cols., 2009; Hughes e cols., 2010; Miller e cols., 2002; Schofield e cols., 2005; Wu e cols., 2011).

Na figura 1.1.4.1 também observamos que além de ligar-se ao endotélio as HPs também ligam-se a Hemácias não parasitadas (HNP) num processo conhecido como formação

de rosetas. Este processo é mediado, na maioria das vezes, por CR1 (CD35), pela ligação ao grupo de antígenos sanguíneos ABO, por imunoglobulinas e pelos glicosaminoglicanos (GAG) (Cserti-Gazdewich e cols., 2012; Urban e cols., 2002; Vigan-Womas e cols., 2012). Casos de MC, anemia grave da malária (AGM) e em casos de malária não grave, também já foi observado acúmulo de plaquetas nos vasos formando agregados com HP através de CD36 e também de micropartículas plaquetárias aderidas através de CD36 e CD31 (Combes e cols., 2006; Cserti-Gazdewich e cols., 2012; Faille e cols., 2009; Hunt e cols., 2003). Já a ligação de HP aos leucócitos de maneira direta ou indireta se dá via CD36 e CD51 (subunidade α_v dos heterodímeros $\alpha_v\beta_3$ ou $\alpha_v\beta_5$), podendo inibir as funções de células dendríticas (Urban e cols., 2002). O acúmulo de leucócitos e a liberação de fatores de coagulação são importantes no desenvolvimento da malária cerebral assim como em outras síndromes graves associadas a malária por gerar a formação de agregados e obstrução dos vasos sanguíneos (Grau e cols., 2003; Ryg-Cornejo e cols., 2012; Schofield e cols., 2005).

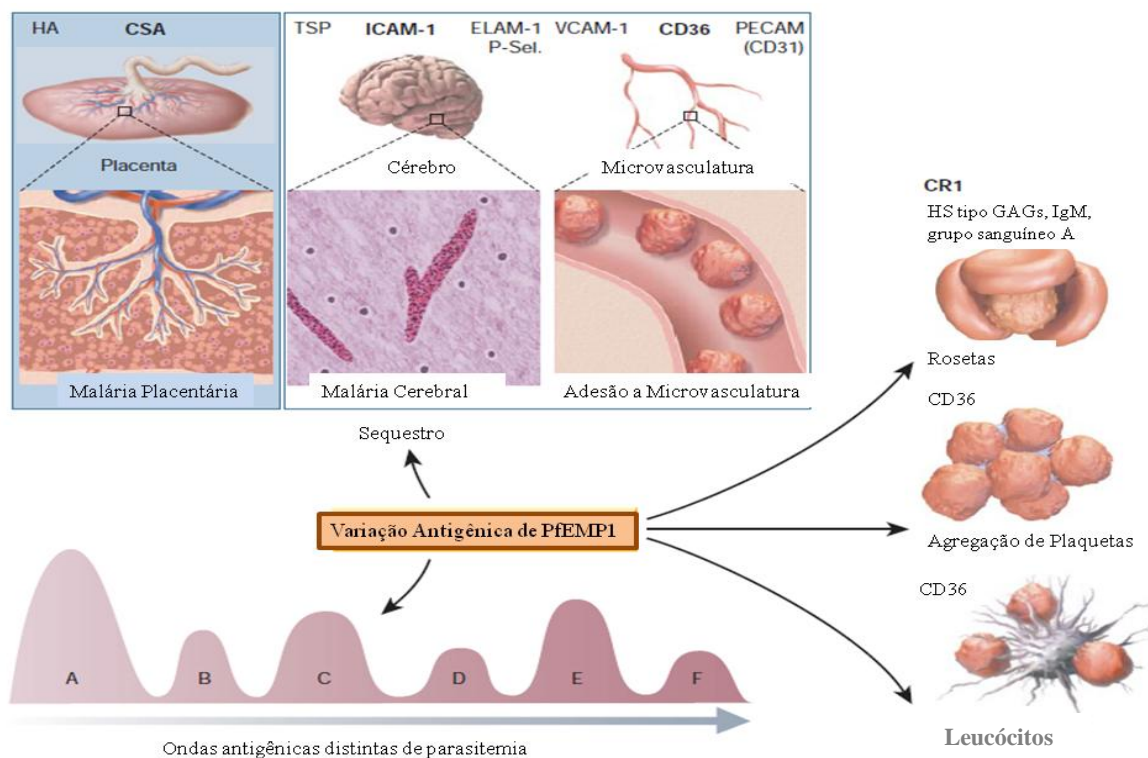


Figura 1.1.4.1 : Esquema da citoaderência. Citoaderência de Hemácias parasitadas (HP) e não parasitadas (HNP) a órgãos alvos, através da ligação da PfEMP1 a receptores das células do hospedeiro. Abreviaturas: HA, ácido hialurônico; TSP, trombospondina; ELAM-1, molécula de adesão endotélio/leucócito1; P-Sel., Pselectina; VCAM-1, molécula de adesão célula vasculatura 1; PECAM (CD31), molécula de adesão célula plaqueta 1; CR1, receptor do complemento 1; HS-tipo GAGs, glicosaminoglicanos semelhantes a heparan sulfato; IgM, imunoglobulina M. Adaptada de Miller, 2002

O sequestro das HPs, e a liberação de toxinas que ocorre com rompimento das hemácias, dão início a uma resposta de fase aguda local, que envolve a ativação do endotélio e a produção local de citocinas e quimiocinas, resultando em uma super-regulação da expressão de moléculas de adesão das células endoteliais (Schofield, 2007). A liberação sistêmica das citocinas e quimiocinas amplifica a infiltração celular, o sequestro de HP e a liberação de micropartículas, assim como fatores de coagulação e até de fator tecidual (Schofield e cols., 2005; Stevenson e cols., 2004). Com a repetição deste ciclo também células T CD8⁺ e T $\gamma\delta$ podem envolver-se liberando mais citocinas e quimiocinas local ou sistemicamente, levando por fim ao dano endotelial (Hansen e cols., 2007).

Muitos estudos demonstram associação entre a gravidade da doença e o aumento da liberação de citocinas imunomodulatórias, incluindo fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 1 β (IL-1 β), IL-6, CXCL-8/IL-8, IL-10, IL-12 (p70) e interferon gama (IFN- γ) (Lyke e cols., 2004), bem como das quimiocinas CCL-3 (MIP-1 α) e CCL-4 (MIP-1 β) (Ochiel e cols., 2005). O balanço na regulação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias pode ser crucial na extensão da patologia gerada, tanto em humanos como em modelos experimentais (Niikura e cols., 2011).

Dentre as citocinas, o papel do TNF tem sido o mais extensivamente abordado. O TNF tem um papel importante tanto na MC quanto nas outras síndromes desencadeadas pela infecção plasmodial (Randall e cols., 2010). O papel do TNF na malária é muito discutido, sabe-se que ele exerce uma função protetora contra o parasito (plasmodicida) (Clark e cols., 1990; Muniz-Junqueira e cols., 2001), em oposição existe a correlação entre altas concentrações desta citocina no soro e a gravidade da doença, e até mesmo uma relação entre a taxa de polimorfismo da região promotora do gene do TNF diminuindo a morbidade por malária (McGuire e cols., 1994).

O IFN- γ também desempenha um papel contraditório na malária, sendo caracterizado como um mediador central de proteção em resposta aos estágios sanguíneos da malária e na hematopoiese (Belyaev e cols., 2010; Bostrom e cols., 2012; Luty e cols., 1999; Torre e cols., 2002). Porém, diversos estudos demonstram correlação entre o aumento da liberação de IFN- γ por células CD3⁺ e a incidência de malária (Day e cols., 1999; Quelhas e cols., 2012). A produção de IFN- γ tem sido intimamente relacionada a produção de outra citocina muito importante no desenvolvimento da malária, a IL-12. Acredita-se que a produção de IL-12, estimule a diferenciação e expansão de linfócitos e consequentemente a produção de citocinas Th1, principalmente IFN- γ (Diouf e cols., 2007; Hensmann e cols., 2001) que podem controlar a infecção levando à diminuição da parasitemia (Keller e cols., 2006; Perkins e

cols., 2000), ou desencadear uma maior migração de monócitos e de células CD4⁺ e CD8⁺ para órgãos alvos como cérebro e pulmão, e a retenção destas através da interação com as moléculas de adesão também estimuladas pela liberação de citocinas (Belnoue e cols., 2008; Metenou e cols., 2012).

Diversos estudos demonstram a relação entre elevados níveis de citocinas e quimiocinas e a gravidade da malária. Crianças com malária grave apresentam altos níveis de IL-6, IL-1 β e CCL-2/MCP-1 (Bostrom e cols., 2012; Rovira-Vallbona e cols., 2012). A quimiocina CCL-2/MCP-1 além de associada a malária grave em crianças, também tem sido associada a malária placentária, sendo comum elevados níveis desta em mulheres de primeira gestação (Bouyou-Akotet e cols., 2004). A anemia grave e a síndrome respiratória desencadeada pela malária têm sido associadas a baixos níveis de IL-10 (Awandare e cols., 2006; Kurtzhals e cols., 1998). Trabalhos “in vitro” utilizando PBMC de doadores saudáveis demonstram que a fagocitose de hemozoína, seja a natural ou a sintética, leva a liberação de citocinas como TNF, IL-1 β , IL-10, MIP-1, CCL-2/MCP-1, dentre outras (Barrera e cols., 2011; Giribaldi e cols., 2010; Keller e cols., 2006; Nti e cols., 2005; Polimeni e cols., 2012). O estudo do perfil de citocinas liberadas durante a malária continua sendo muito importante, como possível alvo terapêutico, buscando diminuir a migração de leucócitos e a ativação dos receptores correspondentes em células responsivas, desencadeando assim uma menor quimiotaxia de células imunes para o sítio da infecção.

A fisiopatologia em decorrência da infecção por *P. falciparum*, tem recebido maior atenção, por ser a espécie de maior importância em saúde pública em virtude das altas taxas de morbidade, mortalidade e multirresistência. Contudo muitos trabalhos têm mostrado que a infecção por *P. vivax*, também causa manifestações graves. O *P. vivax* possui a família de genes *vir* semelhantes aos genes *var* de *P. falciparum*, que é envolvida na variação antigênica entre os ciclos replicativos (del Portillo e cols., 2001). Trabalhos recentes demonstram que hemácias parasitadas por *P. vivax* são capazes de citoaderir ligando-se aos receptores do hospedeiro como ICAM-1, CD36 e VCAM-1 (Carvalho e cols., 2010). Além da capacidade de aderir ao endotélio, a concentração plasmática de citocinas em pacientes infectados com *P. vivax* é muito mais elevada do que pacientes infectados com *P. falciparum* (Yeo e cols., 2010).

1.1.4.1. MALÁRIA PULMONAR

As complicações associadas à malária são caracterizadas pelo comprometimento de vários órgãos. O dano tecidual pulmonar desencadeado pela malária é reportado há mais de

200 anos, porém o nosso conhecimento sobre a patologia e a melhor forma de tratamento ainda é limitada. As manifestações pulmonares associadas à malária podem gerar a síndrome da angústia respiratória aguda (do inglês acute respiratory distress syndrome-ARDS). As complicações pulmonares são comuns em infecções causadas por *P. falciparum* e *P. vivax* (Tan e cols., 2008), porém podem ocorrer em decorrência de *P. ovale* (Haydoura e cols., 2010) e *P. malarie* (Lozano e cols., 1983). A ARDS associada à malária pode ainda ocorrer simultaneamente a outras síndromes como MC (Blanloeil e cols., 1980; Taylor e cols., 2006; Taylor e cols., 2002), ou isoladamente, sendo mais comum em indivíduos adultos não imunes, como por exemplo viajantes que retornam de países endêmicos (Gerardin e cols., 2007; Mohan e cols., 2008).

A principal complicação da malária pulmonar é a formação do edema pulmonar. O edema pulmonar é desencadeado pelo aumento da permeabilidade da membrana alvéolo-capilar, levando à perda de fluido intravascular (Taylor e cols., 2006; Taylor e cols., 2002), com acúmulo de macrófagos pulmonares seguida de resposta inflamatória intravascular. A resposta imune gerada no pulmão também pode levar a obstrução das vias aéreas, com diminuição da ventilação, das trocas gasosas e aumento de células com atividade fagocítica (Anstey e cols., 2002; Taylor e cols., 2006).

Os sintomas do comprometimento pulmonar podem ocorrer junto aos outros sinais clínicos da infecção, ou o mais comum é ocorrer após o início do tratamento, quando o paciente apresenta uma melhora dos sinais clínicos. Sugere-se que a patogênese de ARDS em malária falciparum seja devido ao sequestro de parasitos periféricos, de maneira secundária a expressão de moléculas de adesão que facilitam a citoaderência das HPs às células endoteliais (Anstey e cols., 2007). A adesão das HPs leva a uma obstrução da microcirculação, desencadeando uma resposta inflamatória sistêmica associada a um grande número de células inflamatórias que migram para o parênquima pulmonar e levam à produção de altos níveis de citocinas. Citocinas como TNF, IL-1 liberadas por monócitos e macrófagos, regulam a expressão de IL-6 e CXCL-8/IL-8, por exemplo, e aumentam a expressão de moléculas de adesão endoteliais e a ativação de macrófagos (MacPherson e cols., 1985; Mohan e cols., 2008; Taylor e cols., 2002).

O sequestro de hemácias parasitadas na microvasculatura pulmonar não ocorre em infecções desencadeadas por *P. ovale*. Trabalhos recentes demonstraram que em infecções desencadeadas por *P. vivax* as HPs são capazes de aderir ao endotélio, porém de maneira bem menos intensa quando comparado com *P. falciparum* (Carvalho e cols., 2010). Sendo assim, a teoria da obstrução da micovasculatura não é suficiente para explicar a ocorrência de ARDS na malária ovale e na malária vivax. Lacerda e cols (2012) demonstraram que a injúria

pulmonar foi a principal causa das mortes ocasionadas pela infecção com *P.vivax*, com uma massiva infiltração no espaço intersticial e formação de edema alveolar, confirmando a literatura existente (Anstey e cols., 2007; Lacerda e cols., 2012a). Portanto, a infiltração celular, e a ação destas no foco inflamatório, parecem ter um papel importante nos fenômenos observados na injúria pulmonar desencadeada por outros agentes da malária.

O quadro clínico do paciente pode progredir rapidamente para falência respiratória. Os sinais clínicos de comprometimento pulmonar, desencadeados pela malária, são de difícil diagnóstico por serem confundidos com pneumonia. Uma vez que os pacientes com ARDS associada à malária apresentam intensa falta de ar, tosse, dispneia, expectoração e dor no peito (Rajput e cols., 2000). O tratamento destes pacientes consiste em uso do esquema terapêutico de acordo com a espécie infectante e em alguns casos faz necessário o uso da ventilação mecânica não invasiva (Agarwal e cols., 2007).

A injúria pulmonar decorrente da malária, comumente desenvolve-se após o início do tratamento antimalárico (Kumar e cols., 2007; Price e cols., 2007; Sarkar e cols., 2010) e é predominantemente devido a resposta inflamatória exacerbada. A liberação de citocinas pode ocasionar, diretamente, dano tecidual e/ou aumentar a expressão de moléculas de adesão, possibilitando um maior sequestro de HPs resultando em injúria pulmonar (Agarwal e cols., 2007; Taylor e cols., 2002).

Ainda não está claro qual o papel da resposta imune gerada pelo hospedeiro, tanto em resposta à infecção como ao tratamento antimalárico, no desenvolvimento das complicações pulmonares observadas na malária. No entanto, já foi observado que camundongos CD36^{-/-} infectados com PbA, possuem um menor grau de HP no tecido pulmonar (Lovegrove e cols., 2008). Além disso, trabalhos “in vitro” com células endoteliais pulmonares humanas, demonstraram a adesão de HP por *P. vivax* ao sulfato de condroitina A e à ICAM-1 (Carvalho e cols., 2010). Estes dados demonstram a importância de mais pesquisas envolvendo o papel de moléculas de adesão na injúria pulmonar durante a malária.

1.2. INTEGRINAS

As integrinas são proteínas heterodiméricas transmembranares, compostas pela associação não covalente entre as subunidades α e β . Até hoje, já foram descritas 18 subunidades α e 8 subunidades β , que resultam em 24 receptores distintos em mamíferos (figura 1.2.1) (Hynes, 2002; Margadant e cols., 2011; Zhang e cols., 2012b). Em geral, as integrinas se ligam a motivos específicos da matriz extracelular. Há integrinas que se ligam à fibronectina (representado em azul na figura 1.2.1), integrinas que se ligam ao colágeno

(representado em laranja na figura 1.2.1), e integrinas que se ligam à laminina (representadas em verde na figura 1.2.1). Entretanto, existem as integrinas que são importantes no recrutamento e na adesão de leucócitos ao endotélio, as integrinas α_4 , e os membros da subfamília β_2 (CD18) também conhecidos como leucointegrinas (representadas em vermelho na figura 1.2.1) (Huttenlocher e cols., 2011; Margadant e cols., 2011; Ye e cols., 2012).

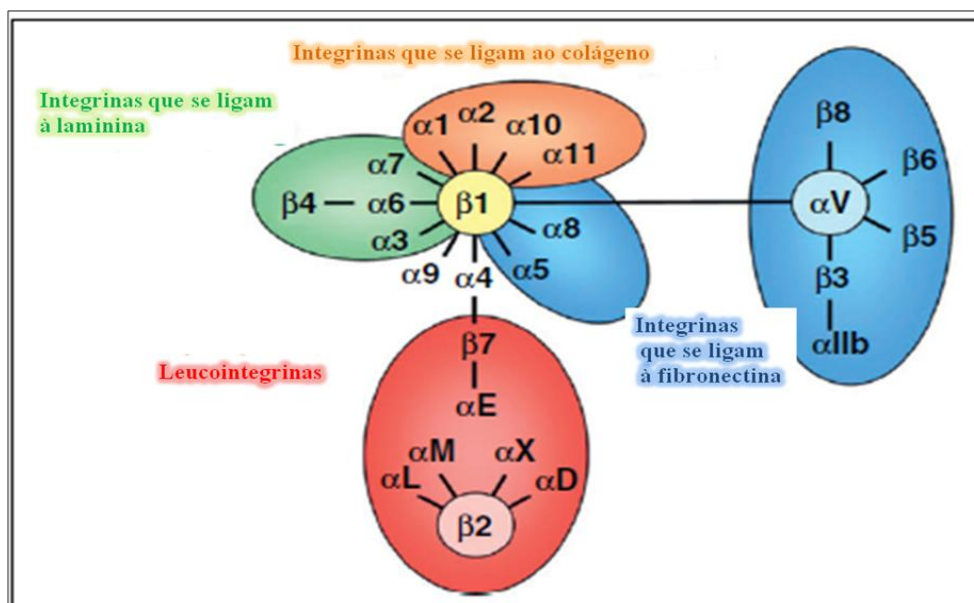


Figura 1.2.1: **Esquema das subfamílias de integrinas.** Esquema demonstrando as 18 subunidades α e 8 β , formando os 24 diferentes heterodímeros conhecidos. Evidenciando em azul as integrinas que se ligam à fibronectina, em laranja integrinas que se ligam ao colágeno, em verde as integrinas que se ligam à laminina e em vermelho as integrinas envolvidas no recrutamento e adesão de leucócitos ao endotélio. Adaptado Margadant e col, 2011

As integrinas compõem o grupo das moléculas de adesão celular, juntamente com as selectinas, as caderinas e os membros da superfamília das imunoglobulinas. A função das moléculas de adesão, em especial das integrinas, é mediar as interações entre as células ou entre as células e a matriz extracelular (MEC) formando uma ponte ao citoesqueleto celular (Hynes, 2002; Zhang e cols., 2012b). As integrinas modulam muitos aspectos celulares como: proliferação, apoptose, formato celular, polaridade, motilidade, ativação, expressão gênica e diferenciação (Hynes, 2002; Shi e cols., 2004).

As integrinas são muito importantes no tráfego de leucócitos através de diferentes tecidos e órgãos, assim como em suas interações com outras células do sistema imunológico, sendo essenciais para o desenvolvimento da resposta imune. Os leucócitos circulantes mantêm suas integrinas em uma conformação inativa (com a cauda citoplasmática da integrina dobrada e próxima a face citoplasmática da membrana plasmática) para evitar contatos inespecíficos e somente no sítio inflamatório ocorre uma rápida ativação (a cauda citoplasmática da integrina estende e ocorre o afastamento significativo das faces

citoplasmática das cadeias α e β) dessas moléculas (Cairo e cols., 2006; Hu e cols., 2010; Hynes, 2002).

A interação de integrinas com seus ligantes específicos aumenta o recrutamento de outras integrinas (microagrupamentos), propiciando maior adesividade dos leucócitos. Os compartimentos celulares que estocam as integrinas são comumente chamados de “adessomos”, e fundem-se com a membrana plasmática e liberam as integrinas na superfície celular. A adesão gerada pelas integrinas proporciona mudanças na plasticidade do citoesqueleto e motilidade celular (Cairo e cols., 2006; McKillop e cols., 2009; Sanchez-Madrid e cols., 1999; Stewart e cols., 1998).

As integrinas são de extrema importância para o funcionamento do sistema imune uma vez que análises de mutações genéticas que levam a não expressão ou ao mau funcionamento destas, desencadearam doenças graves (Bunting e cols., 2002; Harris e cols., 2000). Foram descritas três tipos de deficiências de adesão leucocitária (LAD): LAD I, LAD II e LAD III. Sendo essas caracterizadas pela incapacidade de eliminação de patógenos, infecções recorrentes com diminuição da expectativa de vida e deficiência na cicatrização de feridas (Bunting e cols., 2002).

A forma mais comum de deficiência é a LAD I que é causada por mutações no gene codificante das cadeias beta 2 (β_2) que é comum a todas as integrinas β_2 , estas por sua vez não são expressas na superfície celular levando a defeitos na adesão dos leucócitos ao endotélio (Hanna e cols., 2012). Na forma LAD II, a expressão das β integrinas é normal, o defeito ocorre no metabolismo da fucose levando a ausência do sialyl Lewis X (sLeX), que é o ligante a selectinas, expresso em leucócitos, desencadeando defeitos no rolamento dessas células (Gazit e cols., 2010). A LAD III (também conhecida como variante da LAD I) é caracterizada por mutações no gene que codifica a proteína Kindlin-3 que ajuda a estabilizar a conformação ativada das integrinas, causando então defeito na ativação dos leucócitos mediada pelas integrinas β_1 , β_2 e β_3 apesar da expressão normal destas integrinas (Hanna e cols., 2012).

1.2.1. LEUCOINTEGRINAS (CD18/ β_2)

A subfamília de leucointegrina CD18 é composta por quatro membros (Harris e cols., 2000): CD11a/CD18 ($\alpha_L\beta_2$; antígeno associado a função de linfócitos-1/LFA-1), CD11b/CD18 ($\alpha_M\beta_2$; complexo de ativação de membrana-1/MAC-1; CR3), CD11c/CD18 ($\alpha_X\beta_2$) e CD11d/CD18 ($\alpha_D\beta_2$). Sendo a CD11a/CD18 expressa predominantemente na

superfície de linfócitos, granulócitos e monócitos/macrófagos, a CD11b/CD18 é expressa predominantemente na superfície de células mielóides e de células NK, e a CD11c/CD18 expressa na superfície de células mielóides (Elangbam e cols., 1997). A CD11d/CD18 foi a última a ser descrita e é expressa em monócitos/macrófagos e eosinófilos (Danilenko e cols., 1995; Grayson e cols., 1998). Sabe-se que a ativação celular leva a translocação dos heterodímeros CD11/CD18 dos grânulos para superfície da membrana plasmática (Harris e cols., 2000).

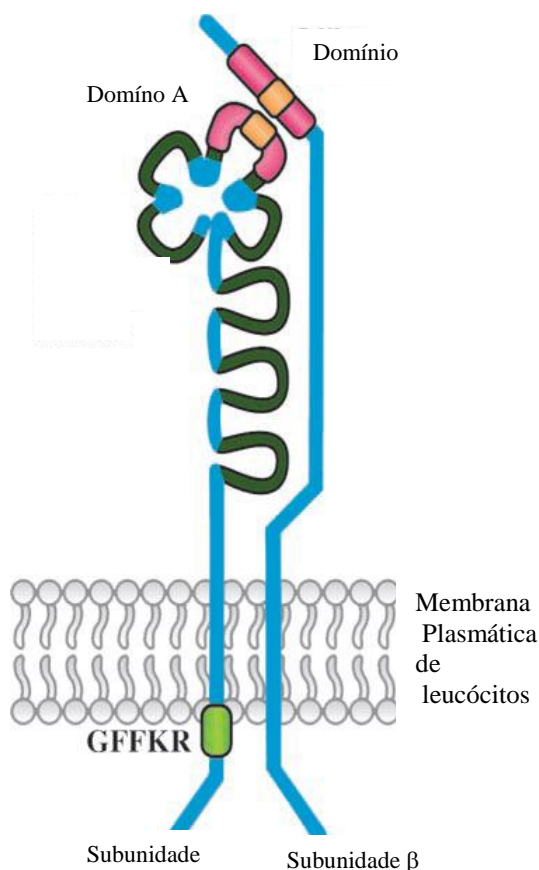


Figura 1.2.1.1: Esquema demonstrando as subunidades α e β . Esquema demonstrando as faces extracelular e intracelular das subunidades alfa e beta e os seus domínios conservados, importantes para o reconhecimento do ligante e para ativação celular desencadeada por integrinas. Esquema adaptado da Adaptado Harris et col., 2000.

O gene que codifica a cadeia CD18 está localizado no cromossomo humano 21, codificando a proteína transmembranar, que tem em sua porção citoplasmática sequências importantes no processo de sinalização e associação a proteínas do citoesqueleto. Acredita-se que como os 56 resíduos de cisteína na cadeia CD18 são conservados também nas cadeias das integrinas $\beta 1$, e $\beta 3$, eles sejam importantes para manter a estrutura terciária desta. A porção extracelular contém 241 aminoácidos do domínio I próximo ao N-terminal (Figura 1.2.1.1) que também é altamente conservado em outras subunidades β e é importante para reconhecimento de ligação (Gahmberg e cols., 1998; Harris e cols., 2000).

Sabe-se que os genes humanos que codificam as subunidades CD11a, CD11b, CD11c, CD11d estão localizados no cromossomo humano 16. A sequência de aminoácidos das proteínas que codificam a subunidade CD11b, CD11c e CD11d apresentam entre si de 60-66% de identidade, enquanto que apresentam somente 35% de identidade com a subunidade CD11a (Harris e cols., 2000; Wong e cols., 1996). A cadeia CD11 das integrinas CD11/CD18 apresentam um domínio extracelular A de aproximadamente 200 aminoácidos que é importante para interação com o ligante (Lee e cols., 1995b) (Figura 1.2.1.1) e está presente em outras integrinas que possuem a subunidade α , mas não fazem parte da

subfamília CD18 como: $\alpha 1$, $\alpha 2$ e αE . A face citoplasmática da cadeia é constitutivamente fosforilada em algumas subpopulações de leucócitos, mas não se sabe a importância deste fenômeno para o funcionamento celular (Harris e cols., 2000). As leucointegrinas apresentam ainda na face citoplasmática um motivo de peptídeos GFFKR (Figura 1.2.1.1) comum para todas as integrinas com subunidade α que serve para manter a ligação heterodimérica numa conformação de baixa afinidade na ausência de sinalização (Gahmberg e cols., 1998).

Cada uma das integrinas CD18 reconhece um ou mais membros da superfamília de imunoglobulinas envolvidas na adesão intercelular (ICAM-1---ICAM-3). As integrinas CD11b/CD18, CD11c/CD18 e CD11d/CD18 também reconhecem proteínas de outras classes e no caso de CD11b e CD11c reconhecem também polissacarídeos (Gahmberg e cols., 1998; Harris e cols., 2000; Sadhu e cols., 2007; Takada e cols., 2007).

A estrutura cristalográfica do domínio A de CD11b e CD11a foi estudada buscando melhor entender o papel deste domínio para as interações das integrinas. Os estudos cristalográficos descobriram o sítio de adesão dependente de íons como Mg^{2+} e Mn^{2+} , onde mutações nesta região alteraram ou aboliram as interações com os ligantes e também com a subunidade CD18 (Hynes, 2002; Ye e cols., 2012). Assim como, modificações na estrutura terciária no domínio A (Lee e cols., 1995a; Li e cols., 1998) e quartenárias (Harris e cols., 2000; Loftus e cols., 1997) nos domínio I das integrinas CD18 podem ser importantes para ativação e inativação.

A ativação de leucócitos por agonistas que se ligam a diversas classes de receptores desencadeando uma ativação das integrinas da subfamília CD18 é conhecido como “sinalização de dentro para fora” (Harris e cols., 2000; Hu e cols., 2012; Shen e cols., 2012). Uma rápida regulação dessa ação é importante para os leucócitos, pois eles circulam pelos tecidos em um estado não adesivo antes de serem atraídos para o sítio inflamatório. O mecanismo pelo qual este fenômeno é gerado tem sido estudado extensivamente, porém o mais provável é que ocorra a interação entre várias vias.

As integrinas também podem interagir diretamente com seus ligantes, com anticorpos ativadores ou cátions divalentes podendo transmitir dessa forma sinais para dentro da célula e desencadear cascatas de transdução de sinais intracelular, e em adição adesão. Esse processo de sinalização mediado pela ativação direta da integrina por um ligante recebe o nome de “sinalização de fora para dentro” e regula eventos como crescimento celular, diferenciação e apoptose (Hu e cols., 2012; Shen e cols., 2012; Wang e cols., 2010). A ligação de leucointegrinas com anticorpos específicos para a subunidades de CD18 ou específicos para subunidade CD11, compromete a ligação do heterodímero CD11/CD18 com seus ligantes (Harris e cols., 2000). O tipo de sinalização externa específica para leucointegrinas CD18

diferem entre as várias subpopulações de leucócitos (Pardi e cols., 1989), sendo muitas vias de sinalização intracelular desencadeadas pela ligação ativação das integrinas CD18. Em relação a integrina CD11a/CD18, vários trabalhos têm demonstrado que a manipulação de sua cadeia extracelular usando cátions divalentes e anticorpos de inibição, induziram uma rápida e dinâmica mudança no reconhecimento de ICAM-1 e de outros ligantes (Harris e cols., 2000; Petruzzelli e cols., 1998). Estudos então sugerem que esta passagem do estado não-adesivo para adesivo, envolva sinais que alteram as interações no citoesqueleto e permitam que a integrina forme grupos ou placas adesivas (Kucik e cols., 1996). Estudos já demonstram o papel da integrina CD11a/CD18 na formação de “clusters” de timócitos e células T ativadas murinas conferindo adesão a ICAM-1 (Krauss e cols., 1999).

Sabe-se que as beta integrinas desempenham um papel importante na resposta imune à infecções e no extravasamento dos leucócitos, bem como em patofisiologias de doenças inflamatórias e autoimunes (Chavakis, 2012). Na malária, existem dados que sugerem que as integrinas podem mediar a citoadesão, e assim contribuir para oclusão da microvasculatura de diversos tecidos. A adesão de plaquetas ao endotélio cerebral e pulmonar é um processo que pode desencadear aumento da apoptose das células endoteliais, levando ao aumento da permeabilidade tanto da barreira hemato-encefálica como alvéolo-capilar (Lou e cols., 2001). No modelo de malária experimental, desencadeada por PbA, a injeção de anti-CD41(α IIb) e anti-CD61 (β 3), no início da infecção, aumentou a sobrevivência dos animais (van der Heyde e cols., 2005). Também experimentos “in vitro” utilizando hemácias parasitadas com *P. falciparum*, demonstraram a importância da integrina α v β 3, no processo de citoadesão do parasito em células endoteliais humanas (Siano e cols., 1998). O bloqueio da integrina CD11a/CD18 expressa em plaquetas também aboliu o sequestro de plaquetas na microvasculatura cerebral (Grau e cols., 1993).

As leuointegrinas, também parecem ter um papel importante na fisiopatologia da malária. Estudos “in vitro” têm demonstrado que a fagocitose de hemozoína, pigmento malárico, por células dendríticas (DC) leva à diminuição de moléculas importantes na apresentação de antígenos à células T, e tais como MHC II, CD54 e CD11c (Schwarzer e cols., 1998), tornando a resposta imune deficitária. Entretanto, estudos mostraram que a interação pré-fagocítica de hemozoína ou de β -hematina (hemozoína sintética) com fibrinogênio leva ao reconhecimento desse complexo pelo receptor TLR-4 e pela integrina CD11b/CD18 de PBMCs levando a um aumento da resposta imune com maior liberação de TNF e CCL-2/MCP-1 podendo desencadear um aumento na resposta inflamatória na malária (Barrera e cols., 2011).

As leucointegrinas são comumente expressas em células monocíticas, que são muito importantes no desenvolvimento da malária tanto no modelo murino como na malária humana (Jenkins e cols., 2006a; Schofield, 2007; Schofield e cols., 2005). Trabalhos relatam que em modelos murinos há aumento da migração de células CD11b⁺ para o sítio inflamatório e periferia sendo importante na eliminação de parasitos (Sponaas e cols., 2009; Zhang e cols., 2012a). Outros trabalhos demonstram que a liberação de TNF, citocina importante no aumento das propriedades adesivas do endotélio, durante a infecção estimula a expressão celular de integrinas com a CD11b (Kumaratilake e cols., 1995; Sponaas e cols., 2009). Um receptor muito importante na aderência de HPs às células do hospedeiro é o CD36, já tendo sido demonstrado que a interação de HPs com CD36 leva a aumento da expressão da integrina CD11b/CD18 (McGilvray e cols., 2000). As integrinas CD18 também foram implicadas no aumento da incidência de apoptose de linfócitos durante a infecção com PbA (Piguet e cols., 2001). A integrina CD11d/CD18, que é expressa predominantemente em monócitos, e é muito similar a CD11b/CD18, também tem demonstrado ter um papel importante no decorrer da infecção da malária, através do uso de animais deficientes (Miyazaki e cols., 2008).

Miyazaki e cols. (2008) observaram que animais selvagens e deficientes para a subunidades CD11d, ao serem infectados com PbA, não apresentaram diferenças no percentual de parasitemia e da contagem do hematócrito (Figura 1.2.1.2- B e C respectivamente). Além disso, os animais selvagens apresentaram sinais clínicos e alterações histológicas a partir do sétimo dia de infecção, de maneira mais proeminente sendo a principal diferença com relação a mortalidade, onde os animais deficientes para a integrina CD11d apresentaram uma maior sobrevivência (Figura 1.2.1.2- A). Esta cinética pode nos sugerir que a integrina CD11d poderia estar influenciando na evolução da malária.

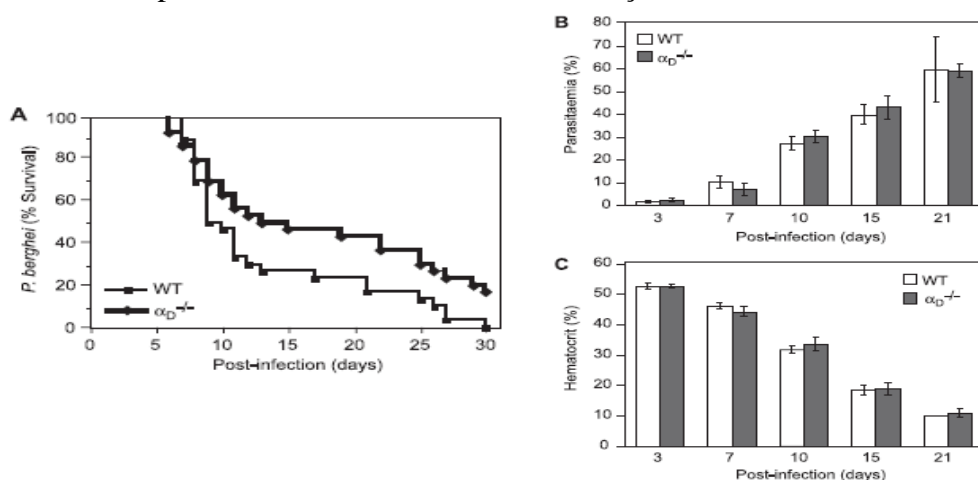


Figura 1.2.1.2: Caracterização da infecção com PbA em animais deficientes para integrina CD11d. Figura demonstrando em A, curva de mortalidade demonstrando que a deleção da integrina CD11d gera uma maior sobrevivência após a infecção com PbA. Em B e C, a percentagem de hemácias infectadas por PbA foi determinada pela microscopia e o hematócrito por sedimentação de hemácias respectivamente. Miyazaki e cols., 2008.

1.2.1.1. LEUCOINTEGRINA CD11d/CD18 ($\alpha_D\beta_2$)

A integrina CD11d/CD18 é membro mais recentemente descrito da subfamília CD18. Danilenko em 1995, foi o primeiro a descrever a subunidade CD11d em tecido esplênico e hematopoiético de cães, e a confirmou como o quarto membro da família das leucointegrinas (Danilenko e cols., 1995). Como foi mencionado anteriormente a integrina CD11d/CD18 é expressa principalmente em monócitos e macrófagos, sendo sua expressão no baço limitada a polpa vermelha (el-Gabalawy e cols., 1996). Recentemente, ela foi identificada em vários tipos de leucócitos humanos, como células NK (natural “Killer”), subpopulações de células T, basófilos, neutrófilos, eosinófilos e em células de linhagem. A integrina CD11d/CD18 desempenha um importante papel na diferenciação (Shi e cols., 2004), adesão, migração (Utagawa e cols., 2008; Yakubenko e cols., 2008) e ativação celular (Bronte e cols., 2000).

A subunidade CD11d permanece retida intracelularmente no complexo de Golgi até ocorrer a coexpressão com a subunidade CD18, ocorrendo então a heterodimerização e subsequente realocização na superfície celular (McKillop e cols., 2009). Para que ocorra a heterodimerização é necessária a ativação celular, independente do modo, ou seja, “de dentro para fora” ou “de fora para dentro”, ocorrendo a exposição do domínio A da integrina e a ligação entre as subunidades e o reconhecimento do ligante (Harris e cols., 2000). O domínio A da subunidade CD11d é muito semelhante ao domínio A da integrina CD11b, indicando que estas moléculas podem se associar a ligantes muito parecidos (Van der Vieren e cols., 1999), sendo a integrina CD11d/CD18 reconhecida como um receptor multi-ligante (promiscuo) nas suas ligações.

A integrina CD11d/CD18 é capaz de se ligar à proteínas que são constituintes da MEC, como a fibronectina, ou que se tornam associadas à MEC durante a inflamação, como o fibrinogênio, a vitronectina, CCN1 (Cyr61) e VCAM-1 (Yakubenko e cols., 2006). Contudo, os principais ligantes conhecidos para a integrina CD11d/CD18 são o ICAM-3 (em humanos) e VCAM-1 (em ratos e humanos). Enquanto que as integrinas CD11b e CD11c as quais ela é mais relacionada se ligam preferencialmente a ICAM-1 (Costantini e cols., 2011; Grayson e cols., 1998; Van der Vieren e cols., 1999).

A distribuição celular da integrina CD11d/CD18 é muito parecida com das integrinas da mesma família. Entretanto, a integrina CD11d/CD18 é pouco expressa nos leucócitos do sangue periférico, e pode ser rapidamente super-regulada em resposta a estímulos quimioatraentes, porém a sua expressão é realmente aumentada no momento da diferenciação de monócitos em macrófagos (Noti, 2002). Num experimento muito elegante, Yakubenko e cols. (2008), demonstraram que em baixa densidade de expressão a subunidade CD11d pode

cooperar com outras integrinas, suportando a migração celular e quando a sua expressão é aumentada tende a tornar a célula mais propícia a adesão. Neste mesmo trabalho ele demonstrou que a ativação de macrófagos “in vitro” (usando a linhagem celular IC-21) e “in vivo” é acompanhada de uma forte aumento da expressão de CD11d (Yakubenko e cols., 2008), demonstrando a importância da integrina CD11d/CD18 na adesividade leucocitária.

O papel real da integrina CD11d/CD18 ainda não está totalmente esclarecido. Contudo, sabemos que o aumento da expressão da integrina CD11d/CD18 é comum em leucócitos fagocíticos, como por exemplo em macrófagos da polpa vermelha esplênica que atuam na fagocitose de hemácias senescentes (Van der Vieren e cols., 1999). Tal aumento, também é observado em macrófagos presentes em: placas ateroscleróticas (Noti, 2002), tecido adiposo branco de ratos e de mulheres obesas (Thomas e cols., 2011), e sítios de neurotrauma (Bao e cols., 2004; Bao e cols., 2005; Grayson e cols., 1998; Saville e cols., 2004).

Face ao exposto, achamos relevante avaliar o papel da integrina CD11d/CD18 nos eventos de adesão celular, fenômeno esse de grande importância no desencadeamento da malária pulmonar. Visto que na malária já foi demonstrado que animais deficientes para a subunidade CD11d tem uma maior sobrevivência quando infectados com PbA (Miyazaki e cols., 2008) e uma maior resistência a malária cerebral (dados não publicados). A subunidade CD11d também já demonstrou ter um papel relevante na injúria pulmonar em ratos, quando esta é induzida por imunocomplexos (Shanley e cols., 1998). Acreditamos que a integrina CD11d/CD18 possa também estar influenciando na injúria pulmonar desencadeada pela malária experimental. O esclarecimento destes fatos será de grande valia para a compreensão de mecanismos envolvidos na patogênese, assim como na identificação de novos alvos terapêuticos para malária, como para outras doenças.

2. OBJETIVOS

A leucointegrina CD11d/CD18 tem um papel crucial mediando as interações célula-célula, e célula matriz extracelular participando de eventos importantes como sinalização, migração e adesão celular, estando associada a diversos eventos patológicos com quadro inflamatório intenso. A hipótese deste trabalho é que a leucointegrina CD11d/CD18 esteja envolvida na resposta inflamatória, assim como nos eventos de adesão de leucócitos causados pela infecção pelo *Plasmodium berghei* Anka.

2.1. Objetivo geral

Nosso principal objetivo é determinar o papel da subunidade CD11d, na injúria pulmonar aguda durante a infecção pelo *Plasmodium berghei* Anka.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar as alterações na expressão da subunidade CD11d, no tecido pulmonar de animais CD11d^{+/+} no curso da infecção com PbA;
- Avaliar o perfil de mediadores inflamatórios no tecido pulmonar dos animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-} após a infecção com PbA;
- Determinar características histológicas, infiltrado inflamatório e edema pulmonar nos animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-} após a infecção com PbA;
- Avaliar possíveis diferenças na migração e adesão leucocitária entre os animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-} após a infecção com PbA;
- Avaliar a função respiratória de animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-} após a infecção com PbA;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos selvagens da linhagem C57Bl/6 e camundongos deficientes para subunidade CD11d da integrina CD11d/CD18 (CD11d^{-/-}), no “background” C57Bl/6, gentilmente cedidos pelo Dr. Guy Zimmerman da Universidade de Utah, EUA, que são mantidos no Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Durante os experimentos, os animais foram mantidos no Biotério do Pavilhão Ozório de Almeida, do Instituto Oswaldo Cruz. Animais machos com peso entre 20 a 25g foram mantidos em gaiolas plásticas de micro isoladores ventilados (Gabinete Biotério mod. EB-273, Insight, Brasil) com livre acesso a água e ração, com temperatura controlada entre 22 a 24°C, e ciclos de claro e escuro com duração de 12 horas. Os animais receberam uma dose de vermífugo (10 µL Petzi Plus/Vetbrands em 190 µL de salina) por via oral (gavagem) e foram utilizados uma semana após o tratamento. Todos os procedimentos foram realizados após a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fiocruz sob a licença n° P-0528/08.

3.2. Manutenção e infecção com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA)

Para infecção dos animais foi utilizado o *Plasmodium berghei* Anka (PbA) cedido gentilmente pelo Dr. Leonardo Carvalho do laboratório de Malária do Instituto Oswaldo Cruz.

Para estocagem do sangue foi realizada a punção cardíaca de animais infectados com PbA, sendo escolhidos para este procedimento, apenas animais que apresentaram até 10% de parasitemia. O sangue recolhido foi centrifugado em centrífuga Eppendorf mod. 5415C por cinco minutos a 500g. O soro foi descartado e as hemácias foram ressuspensas em uma solução de glicerol tamponada e mantidas em nitrogênio líquido.

Para realização da infecção, primeiro o sangue, em estoque, foi descongelado e inoculado em alguns animais, chamados de animais passagem. A parasitemia dos animais passagem foi monitorada até chegar a 10%, e então o sangue desses foi utilizado para fazer uma nova infecção, agora nos animais usados nos experimentos. O inóculo utilizado foi na concentração de 10⁵ hemácias parasitadas em 200 µL de PBS 1X, via intraperitoneal (i.p.) com a forma assexuada do estágio sanguíneo. Animais controle recebiam 10⁵ hemácias não parasitadas (HNP) em 200 µL de PBS 1X.

Para determinação da parasitemia, foi feito um pequeno corte com tesoura na extremidade da cauda dos animais, permitindo a coleta de aproximadamente dez microlitros

de sangue para a realização de esfregaço sanguíneo. As lâminas foram coradas em *kit* Panótico (Laborclin), através de imersão por um minuto em cada uma das soluções que compõe o *kit*. Foi contado o número de hemácias parasitadas entre cem hemácias totais através de microscopia de luz, utilizando o microscópio óptico (OLYMPUS mod. CX31).

Após verificação da parasitemia, 1µL do sangue do animal foi diluído em 999µL de PBS 1X, sendo as hemácias contadas em câmara de Neubauer (Neubauer Improved). O número de hemácia total contadas, aliada a porcentagem de hemácias parasitadas foi usado para determinar o volume total de sangue a ser utilizado para fazer o inóculo.

3.3. Obtenção de tecidos

Para a obtenção de tecidos para diversas análises, posteriormente descritas, animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-}, controle e com sete dias de infecção foram profundamente anestesiados com isoflurano (Abott). Após a anestesia os animais foram então perfundidos com 10 mL de salina não estéril, para exclusão de leucócitos e hemácias. O sistema de perfusão continha um escalpe acoplado a um frasco de solução salina com gotejador pendurado em local elevado. Após a perfusão, a cavidade torácica e peritoneal foram expostas para retirada do tecido pulmonar, que foi pesado, e do tecido esplênico para posteriores análises. O tecido pulmonar foi dividido: 50 mg para análises de reações de cadeia de polimerase (PCR) em tempo Real e o restante do pulmão foi colocado em criotubo e congelado instantaneamente em gelo seco, para posterior análise de citocinas. Para obtenção de células da medula óssea um fêmur de cada animal foi retirado e lavado com 3 mL de meio RPMI 1640 com 10U/mL de heparina.

3.4. Extração de RNA

Os tecidos recolhidos foram fragmentados, homogeneizados e armazenados em tubos livre de RNase (Axygen) com 1000 µL de reagente Trizol® (Invitrogen) a -20°C, para posterior extração do RNA.

Para a extração e purificação do RNA, as amostras foram incubadas com 200 µL de clorofórmio (Vetec) por 5 minutos a temperatura ambiente, misturadas por 2 minutos e centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e o RNA foi precipitado pela adição de 600 µL de álcool isopropílico (Vetec). As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 10 minutos e depois centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. O precipitado de RNA foi lavado com 1 mL de etanol (Vetec) a 75 % e, em seguida, centrifugado a 8.000 g por 5 minutos a 4°C, seco (ou seja, esperou-se a

evaporação do álcool em capela) e dissolvido em 20 μL de água livre de RNase. O RNA foi quantificado através da utilização do espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) e armazenado a -80°C para uso posterior.

3.5. Transcrição reversa do RNA (RT)

O cDNA foi sintetizado utilizando kit específico (*SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR*, Invitrogen). Para isso, 1 μg de cada amostra de RNA foi misturado com 1 μL de dNTP (*deoxyribonucleotide triphosphate*) a 10 mM, 1 μL de *primer* oligodT (Invitrogen, 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), e completado com água (livre de RNase) até 10 μL . Esta mistura foi incubada por 5 minutos a 65°C . Em seguida, adicionaram-se em cada tubo os seguintes reagentes: 1 μL de RT *buffer* 10x, 2 μL de MgCl_2 a 25 mM, 1 μL de DTT a 0,1 M e 0,5 μL de RNase OUT 40 U/ μL . Os tubos foram incubados a 42°C por 2 minutos e logo após, adicionou-se 1 μL de enzima *SuperScript II RT* (Invitrogen, 50U/ μL) em cada tubo. Incubou-se a 42°C por 50 minutos e depois a 70°C por 15 minutos. Após este período, foi adicionado 1 μL de RNase H (2 U/ μL) por tubo, que foram em seguida, incubados por 20 minutos a 37°C . O cDNA foi armazenado a -20°C .

3.6. Reação em cadeia de polimerase quantitativo (PCR em tempo real)

Os transcritos de CD11d obtidos da reação de transcriptase reversa foram quantificados por PCR fluorogênico quantitativo em tempo real utilizando o sistema *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Para tanto, foram misturados 5 μL de Master Mix 2X; 0,5 μL do primer 20X; 1 μL da amostra de cDNA e 3,5 μL de água livre de RNase. A amplificação foi realizada no aparelho de PCR em tempo real modelo 7500 *Real Time PCR System* (Applied Biosystems). Os primers utilizados foram: para o gene *CD11d* (TaqMan-murine-Mm01159115_m1) e para o gene hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (*HPRT*) (TaqMan- murine- Mm01545399_m1). A expressão dos níveis de RNA foi calculada através do *software Data Assist v.3* e normalizadas em relação aos níveis de expressão do gene constitutivo *HPRT*.

3.7. Lavado broncoalveolar (LBA)

Os animais foram submetidos a eutanásia pela inalação de isoflurano e procedeu-se a coleta de amostras de lavado broncoalveolar (LBA). Após a eutanásia, foi feita a exposição da

traqueia e secção dos músculos adjacentes. Em seguida, foi aberto um pequeno orifício na região proeminente da cartilagem traqueal para a inserção de uma cânula acoplada a uma agulha de 21G (BD). O lavado bronco-alveolar foi obtido pela injeção de 1mL de PBS 1X gelado, seguida pela aspiração do conteúdo, sendo este procedimento repetido por 3 vezes. Ao término do processo, recuperava-se um volume aproximado de 0,9 mL do LBA por camundongo.

3.8. Contagem total e diferencial das células da medula óssea e do LBA

A contagem total de leucócitos da medula óssea e do LBA foi efetuada em câmaras de Neubauer em microscópio óptico (aumento de 10X), após diluição das mesmas em solução de Turk. As células de medula foram diluídas quarenta vezes, e a do LBA foram diluídas cinco vezes. A análise diferencial de leucócitos foi realizada em citoesfregaços preparados em citocentrífuga (Cytospin3- Shandon – 0,05 g por 5 minutos), corados pelo método May Grunwald-Giemsa. De acordo com este método, as lâminas foram imersas no May Grunwald por 3 minutos para fixação, 2 minutos em água para retirada do excesso de corante e 15 minutos no Giemsa, para coloração. Foram contadas 100 células consecutivas por citoesfregaço em microscópio de luz, com objetiva de imersão em óleo (aumento de 100X). O valor absoluto de cada tipo celular foi calculada a partir da porcentagem encontrada em relação ao número total de células.

3.9. Dosagem de proteínas pelo método do BCA (Pierce)

Para dosagem de proteínas, o LBA foi centrifugado a 0,2 g por 5 minutos, e o sobrenadante foi aliquoteado e utilizado no método de BCA segundo o kit de Pierce. O reagente de trabalho foi preparado juntando-se 50 partes de Reagente BCA A e uma parte de Reagente BCA B. Uma curva padrão (de 0,01562 a 2mg/mL) foi construída através de diluições seriadas a partir da albumina de soro bovino (BSA) fornecida pelo fabricante. Um total de 25 µL das amostras de sobrenadante de LBA foram adicionadas aos poços contendo 200 µL de Reagente de Trabalho. A placa de fundo em U (Nunc) foi incubada na estufa (Labline) a 37°C por 30 minutos e a leitura das amostras foi realizada a 562 nm na leitora de placas.

3.10. Dosagem de citocinas através do ensaio imunossorvente ligado à enzima (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA*)

Para as análises de níveis de citocinas e quimiocinas, o tecido pulmonar foi homogeneizado em 800 µL de água MILLIQ contendo um coquetel de inibidores de protease (Complete mini EDTA-free /Roche) por trinta segundos, usando a Ultra-Turrax Disperser T-10 basic (IKA). Após a homogeneização dos tecidos, estes foram centrifugados a 0,2 g por 5 minutos e o sobrenadante foi aliquoteado para as análises. Para realização do ELISA placas de fundo chato (Nunc) para ensaio em volume reduzido foram cobertas com o anticorpo de captura (50µL/poço) e seladas com filme plástico. Após incubação overnight a 4°C, as placas foram lavadas 4X com tampão de lavagem (100µL/poço de 1L de PBS1X + 500µL de Tween® 20) e incubadas durante 1 hora com a solução de bloqueio (50µL/poço de 100mL PBS 1X +1g BSA (Sigma Aldrich)) à temperatura ambiente. A curva padrão foi diluída em solução de bloqueio + Tween® 20 e aplicada na placa, bem como as amostras (50µL/poço). Após nova incubação overnight a 4°C as placas foram lavadas 6X com tampão de lavagem e o anticorpo de detecção diluído em solução de bloqueio+ Tween® 20 (50µL/poço) foi adicionado. Uma hora após a incubação com o anticorpo de detecção, as placas foram lavadas 8X com tampão de lavagem e foi adicionada a solução de streptavidina-peroxidase (50µL/poço de 25uL de Streptavidina-peroxidase (R&D)+ 5mL de Tampão de bloqueio com Tween® 20). Trinta minutos após a incubação no escuro, foi acrescida a solução de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB, Sigma Aldrich), substrato para a reação colorimétrica. Após desenvolvimento satisfatório de cor na curva-padrão, a reação foi parada com solução de parada (50µL/poço de 10,65mL de H₂SO₄ (Merck) + Água MilliQ q.s.p. 1L) e a absorbância a 405 nm foi determinada pela leitora de placas (Spectr Max 190).

Tabela 3.10.1: **Anticorpos usados para ensaios de ELISA**

| Citocina | Anticorpo de captura | Curva de citocina recombinante | Anticorpo de detecção |
|-----------------------------|----------------------|--------------------------------|-----------------------|
| IL-6 (R&D, dual set) | 2 µg/mL | 1000 pg/mL | 0,2 µg/mL |
| IL-1β (R&D, dual set) | 4 µg/mL | 1000 pg/mL | 0,6 µg/mL |
| IL-12 (R&D, dual set) | 4 µg/mL | 2500 pg/mL | 0,4 µg/mL |
| TNF (R&D, dual set) | 0,8 µg/mL | 2000 pg/mL | 0,2 µg/mL |
| CCL-2/MCP-1 (R&D, dual set) | 0,2 µg/mL | 250 pg/mL | 0,05 µg/mL |
| CXCL-1/KC (R&D, dual set) | 0,2 µg/mL | 1000 pg/mL | 0,2 µg/mL |
| CCL-5/RANTES(R&D, dual set) | 2 µg/mL | 2000 pg/mL | 0,4 µg/mL |

3.11. Permeabilidade vascular

Para análise da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar, animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-}, controle e infectados foram anestesiados com isoflurano (Abott) e submetidos a uma injeção intravenosa de 2% de azul de Evans (Sigma) em 100 µL PBS 1X. Após 1 hora, os animais foram anestesiados e perfundidos conforme descrito anteriormente. Os tecidos foram retirados e deixados por 18 horas em 4mL de solução de formamida (VETEC) na estufa (REVCO Technologies modelo RC03000TVBB) a 37°C 5% CO₂, para extração do corante. Uma curva padrão iniciando-se em 2mg/mL do corante azul de Evans (Sigma) em formamida (VETEC) foi construída através de diluições seriadas, e aplicada na placa em duplicata. Um total de 200 µL do corante extraído foi adicionado a placa de fundo chato (Nunc), juntamente com a curva padrão e a leitura das amostras foi realizada a 620 nm no espectrofotômetro (Molecular Devices Spectra Max 190).

3.12. Análises histológicas

Animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-}, controles e com sete dias de infecção foram anestesiados com isoflurano (Abott) e submetidos a perfusão com solução salina conforme descrito anteriormente. Os tecidos foram retirados e deixados na formalina 3,7% a 4°C. O processamento histológico foi realizado através de desidratação em série alcoólica crescente de etanol passando por álcool 80%, 85%, 90%, 95% e etanol absoluto. Posteriormente, foi realizada diafanização em xilol e impregnação e inclusão em parafina a 56 °C. Os blocos foram cortados em micrótomo à espessura de 5 µm e as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina para análise morfológica. Os cortes histológicos foram fotografados em microscópio Olympus BX41 acoplado a sistema fotográfico, no aumento de 200 vezes.

3.13. Citometria de fluxo

Para as análises do percentual de células CD14⁺ no sangue periférico foi realizada a punção cardíaca nos animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-}, controle e com sete dias de infecção. Utilizando uma seringa de 1 mL contendo 100µL de solução de citrato (10mL de ácido cítrico a 0,1M em 10mL de citrato de sódio a 0,1M). Após a retirada do sangue, este foi misturado a 4 mL de tampão de lise (0,72225g de NH₄Cl 135mM, 0,120g de fosfato de sódio 10mM, 0,168g de NaHCO₃ 20mM, 0,037g de EDTA 1mM, em 100mL de água destilada em pH 7,2) e centrifugado a 0,3 g por 5 minutos. Após a lise das hemácias, o número de leucócitos foi

contado em câmaras de Neubauer em microscópio óptico (aumento de 10x), usando a diluição de vinte vezes em solução de Turk. Após a contagem a concentração foi ajustada para 1×10^6 células em 100 μ L. Inicialmente, foi adicionado um anticorpo CD16 (BD- Pharmingen) para bloqueio. Após 15 minutos de incubação à 4°C, as amostras foram centrifugadas a 0,1 g por 5 minutos, e adicionado o anticorpo anti-CD14-PE (BD- Pharmingen). Vinte minutos depois da incubação à 4°C, foi adicionado formalina a 3,7%. Após 10 minutos de repouso ao abrigo da luz, a fluorescência das células foi determinada em citômetria de fluxo.

3.14. Imunohistoquímica

Para as análises de imunohistoquímica, animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-}, controles e após sete dias de infecção foram anestesiados com isoflurano (Abott) e submetidos a um processo de perfusão conforme descrito anteriormente. Após a perfusão com salina, os animais foram submetidos a uma nova perfusão com 5 mL de paraformaldeído a 4%. Após a perfusão o tecido pulmonar foi retirado e colocado em 2-3 mL de Paraformaldeído 4%, por duas horas na geladeira, agitando periodicamente, em seguida o paraformaldeído 4% foi substituído pela solução de Sucrose (7,5%) + Azida (0,02%), e ficou na geladeira por mais 15 minutos. A solução de Sucrose (7,5%) + Azida (0,02%) foi substituída por uma nova solução de Sucrose (15%) e ficou na geladeira overnight. No outro dia os tecidos foram embebidos na solução de Sucrose (15%) + Gelatina bovina (7,5%), e ficou na estufa (REVCO Technologies modelo RC03000TVBB) a 37°C e 5% de CO₂ por duas horas. Após as duas horas na estufa os tecidos foram congelados em meio de congelamento de tecidos (Tissue Freezing Medium/TBS™), e armazenados a -80° C até a realização dos cortes. Cortes na espessura 10 μ m foram realizados em criostato (Leica CM1850), e depositados em lâminas preparadas com 3-Aminopropyl triethoxysilane (Sigma-Aldrich).

Para fazer a marcação, os tecidos foram incubados por 20 minutos a -20°C. Após a incubação foi feita a permeabilização das células com Triton X-100 (Sigma) 0,01% em PBS 1X por 10 minutos. As lâminas retiradas do Triton X-100 foram secas e foi adicionado, dentro da marcação circular feita ao redor das células, 100 μ l de soro de cabra (10%) diluído em PBS 1X, para bloqueio de ligações inespecíficas. Depois de 40 minutos, as lâminas foram lavadas com PBS 1X por 5 minutos e, então, foi adicionado o anticorpo primário: VCAM-1 (rat anti-Mouse CD106-eBioscience) e para controle negativo IgG (rat anti-IgG2b- eBioscience). As lâminas ficaram overnight à 4°C e em ambiente úmido. No dia seguinte após três lavagens de 5 minutos em PBS 1X, foi adicionado o anticorpo secundário Alexa 546 goat anti-mouse diluído 1/1000 em PBS 1X. Depois de 1 hora de incubação, as lâminas foram lavadas três

vezes com PBS (1X) por 5 minutos. Para a montagem das lâminas, que devem ser seladas com esmalte, foi usado um meio de montagem contendo DAPI apropriado (Fluorescent medium from VECTASHIELD). As lâminas ficaram armazenadas à 4°C até a hora da análise. A fluorescência foi analisada utilizando o microscópio confocal de varredura a laser LSM 510 META (Zeiss) no laboratório de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz, através do sistema de redes de plataformas tecnológicas PDTIS.

3.15. Avaliação da responsividade brônquica

Para avaliação da responsividade brônquica animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-}, controles e após sete dias de infecção foram analisados em relação à responsividade brônquica à metacolina através de um sistema não invasivo de pletismografia barométrico de corpo inteiro (Buxco Technology, Sharon, CT). Os experimentos de pletismografia de corpo inteiro foram realizados no laboratório de Inflamação do Instituto Oswaldo Cruz, através da utilização da rede de plataforma tecnológicas PDTIS. Os camundongos foram colocados em câmaras de pletismógrafia respirando espontaneamente para coleta dos valores de fluxo. A hiperresponsividade brônquica foi avaliada utilizando os valores calculados do Pehn (medida indireta correlacionada com a resistência das vias aéreas, impedância e pressão intrapleural) como um índice. Uma média das medidas foi calculada para este intervalo. Os camundongos foram expostos à nebulização de PBS 1X, seguida de nebulização com concentração de 25mg/ml de metacolina. As medidas foram obtidas durante 7 minutos de aerolização. Os valores do Pehn foram calculados como a média de aproximadamente 25 ciclos respiratórios e as médias dos valores cumulativos foram expressas para cada concentração.

3.16. Análises estatísticas

Os resultados obtidos neste trabalho foram expressos como média e erro padrão da média (SEM) e analisados utilizando o teste “t” *Student*. Os valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Ausência da subunidade CD11d não interfere na parasitemia

O primeiro parâmetro que avaliamos foi a parasitemia dos animais após a infecção com *Plasmodium berghei* Anka (PbA). Miyazaki e cols. (2008) demonstraram que os animais deficientes para a integrina CD11d (CD11d^{-/-}) apresentam uma maior sobrevivência em relação aos animais selvagens (CD11d^{+/+}) frente a infecção com PbA. Contudo, não foi observado diferenças nos níveis do hematócrito e na parasitemia entre os grupos (Figura 1.2.1.2). Baseado na curva de sobrevivência, também realizada nesse trabalho, onde a mortalidade dos animais inicia-se no sétimo dia de infecção, escolhemos este dia para todas as nossas análises seguintes.

Para confirmar a infecção realizamos esfregaços sanguíneos e contamos o percentual de hemácias parasitadas, em todos os experimentos. Observamos que não há diferença no percentual de células parasitadas entre os animais deficientes para a integrina CD11d^{-/-} e o animais CD11d^{+/+} em nenhum dos dias analisados.

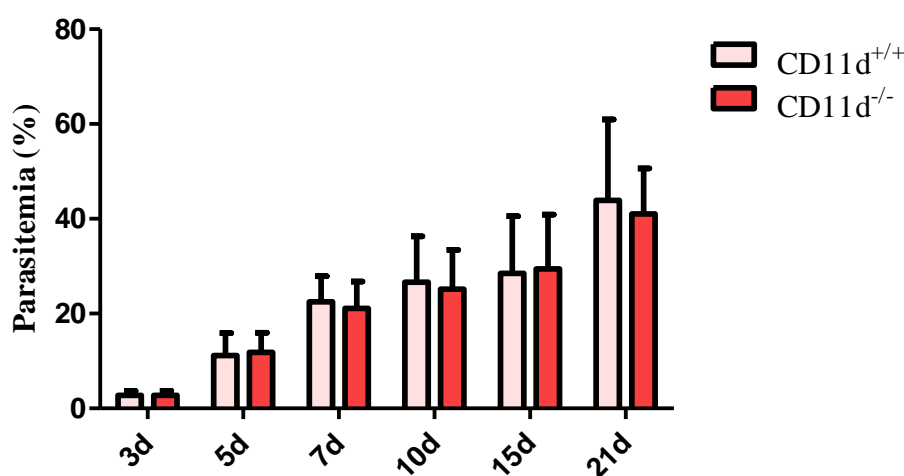


Figura 4.1.1: A ausência da integrina CD11d não interfere na parasitemia periférica após a infecção com PbA. Animais foram inoculados via i.p. com 10⁵ hemácias não parasitadas (HNP) ou com 10⁵ Hemácias Parasitadas (HP), e foram realizados esfregaços sanguíneos para análise da parasitemia. Gráfico da parasitemia dos animais Gráfico representativo de três experimentos, cada barra é a média de 15 animais.

4.2. Caracterização da expressão da subunidade CD11d em tecido pulmonar

Avaliamos a expressão da leucointegrina CD11d/CD18 no tecido pulmonar dos animais selvagens (CD11d^{+/+}) após a infecção com *Plasmodium berghei* Anka (PbA). Esta cepa desenvolve sintomatologia muito parecida com a infecção por *Plasmodium falciparum*, podendo levar ao desenvolvimento de malária cerebral (Stevenson e cols., 2004) e à injúria pulmonar associada à malária (Lovegrove e cols., 2008).

Para avaliarmos a expressão da subunidade CD11d fizemos PCR em tempo real e como podemos observar na figura IV.1.1, ocorre um aumento da expressão da subunidade CD11d no sétimo dia de infecção, quando comparado ao animal controle que recebeu somente hemácias não parasitadas (HNP), e este aumento é mantido até o décimo dia de infecção com PbA. A integrina CD11d/CD18 foi descrita inicialmente no baço (Danilenko e cols., 1995), e que sua expressão é aumentada durante o curso da infecção com PbA (Miyazaki e cols., 2008). Para tal utilizamos o baço do animal inoculado com hemácia não parasitada (animal controle), como controle positivo, da expressão da subunidade CD11d em nossas análises. O que podemos concluir com este resultado é que a subunidade CD11d é expressa no pulmão em condições basais e que sua expressão é aumentada no curso da infecção pelo PbA no tecido pulmonar.

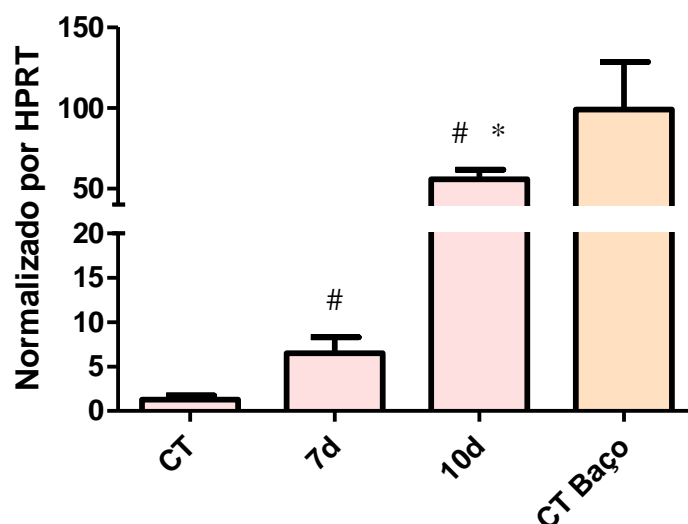


Figura 4.2.1: Aumento da expressão da subunidade CD11d em tecido pulmonar de animais infectados com PbA. Animais foram inoculados via i.p. com 10^5 hemácias não parasitadas (HNP) ou com 10^5 Hemácias Parasitadas (HP), e foram sacrificados 7 e 10 dias após a infecção. Gráfico da análise da expressão da subunidade CD11d por PCR em tempo real. Gráfico representativo de três experimentos, cada barra é a média \pm S.E.M de 3 animais ($p \leq 0.05$), # comparando animais infectados em relação ao controle.* comparando a expressão do 10d em relação a expressão do 7d.

4.3. Ausência da subunidade CD11d modula o perfil de citocinas e quimiocinas liberadas durante a infecção com *PbA*

O perfil de produção de citocinas, está descrito na literatura como um importante evento no curso da doença causada pelo *Plasmodium* sp. e principalmente nas manifestações graves decorrentes da infecção como a malária cerebral (Clark e cols., 1994; Randall e cols., 2010). Desta forma, resolvemos investigar se a ausência da subunidade CD11d poderia alterar o padrão de produção de algumas citocinas e quimiocinas importantes na malária.

O tecido pulmonar foi recolhido sete dias após a infecção, para processamento e análise pelo método de ELISA. Escolhemos trabalhar com o sétimo dia de infecção por ser o momento que inicia a mortalidade dos animais em decorrência da infecção e também porque já foi demonstrado ter a formação de edema pulmonar com extravasamento de proteínas para o LBA (Lovegrove e cols., 2008). Podemos observar na figura IV.2.1 A-H, que os animais CD11d^{+/+} tiveram os níveis das citocinas (TNF, IL-12, IL-1b, Il-6) e quimiocinas (CCL-2/MCP-1, CCL-5/RANTES e CXCL-1/KC) analisadas elevados em relação ao seus controles. Contudo os animais CD11d^{-/-}, não apresentaram nenhuma alteração das citocinas analisadas quando comparados aos seus controles, no entanto níveis elevados de CCL-2/MCP-1 e CCL-5/RANTES foram detectados, porém em níveis significativamente mais baixos que dos animais CD11d^{+/+}. A análise destes dados nos indica que a ausência da subunidade CD11d reduz a produção de citocinas e quimiocinas em resposta à infecção pelo PbA.

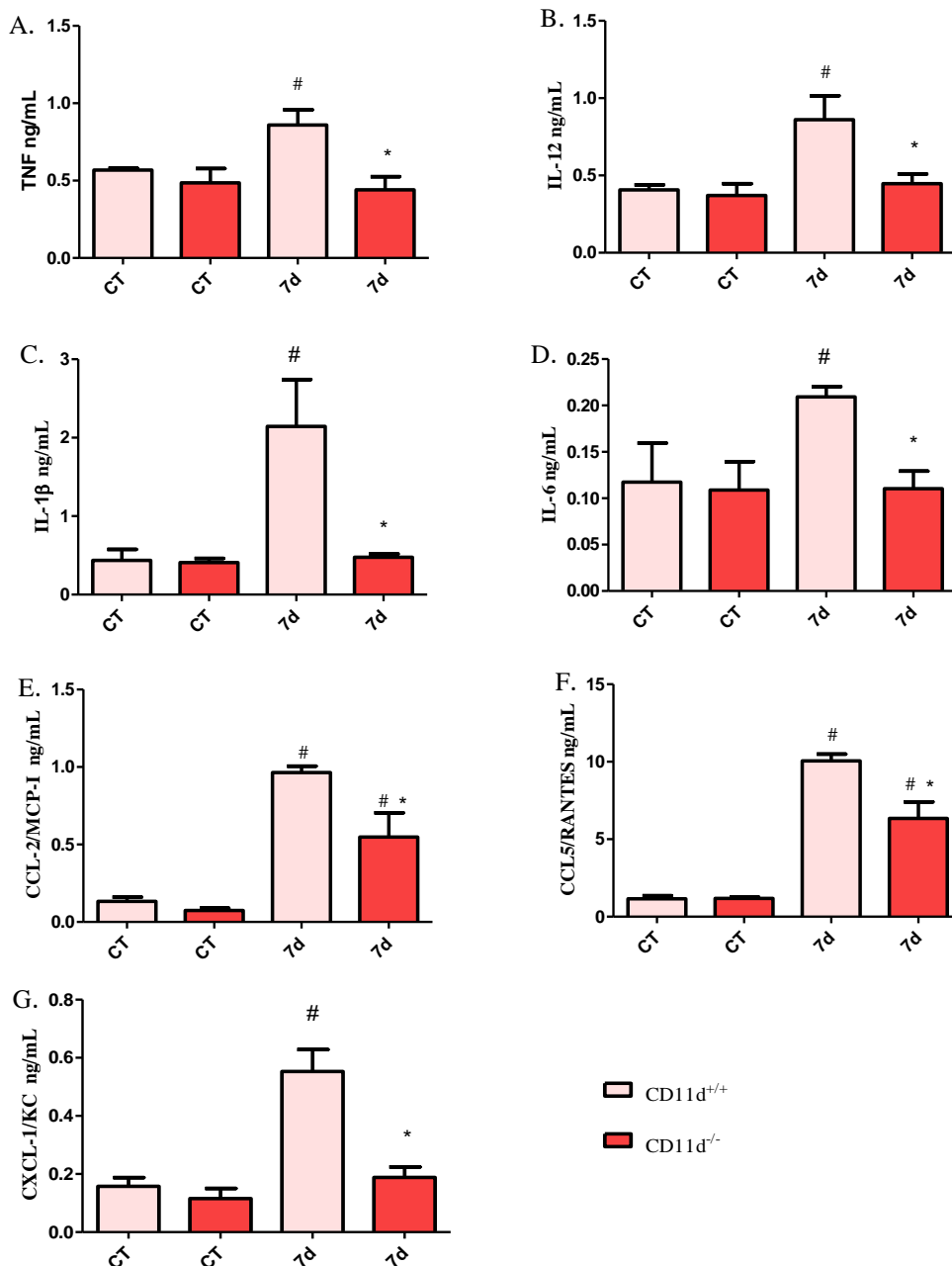


Figura 4.3.1: O homogenato do tecido pulmonar dos animais $CD11d^{-/-}$ apresentou menor nível de liberação de citocinas e quimiocinas quando comparado com animais $CD11d^{+/+}$ após a infecção com PbA. Animais foram inoculados via i.p. com 10^5 hemácias não parasitadas (HNP) ou com 10^5 Hemácias Parasitadas (HP), e foram sacrificados 7 dias após a infecção. Os pulmões foram removidos e processados para ELISA. No A, TNF, no B, IL-12, no C, IL-1 β , no D, IL-6, no E, CCL-2/MCP-1, no F, CCL-5/RANTES e no G, CXCL-1/KC. Gráficos representativos de três experimentos, cada barra é a média \pm S.E.M de 5 animais, onde $p \leq 0.05$, *comparando animais $CD11d^{+/+}$ e $CD11d^{-/-}$, # animais infectados em relação aos seus controles.

4.4. A ausência da subunidade CD11d influencia na formação do edema pulmonar durante a infecção com *PbA*

Muitas doenças pulmonares, durante seu estabelecimento e formação do quadro inflamatório, levam a alterações estruturais importantes, como formação de edema, acúmulo de infiltrado inflamatório e produção de muco (Churg e cols., 2005). Sabendo disso, após a perfusão, os pulmões foram pesados. Na figura IV.3-A observamos que após sete dias de infecção os animais CD11d^{+/+} apresentam um peso pulmonar mais elevado quando comparado aos animais CD11d^{-/-} que não apresentavam diferença em relação ao seu controle não infectado. Este resultado nos sugere que a ausência da subunidade CD11d influencia na formação do edema gerado pela infecção.

Outra forma de análise de formação de edema muito usual é a quantificação do exsudado protéico no lavado broncoalveolar (LBA). A avaliação de proteínas no LBA é utilizado como marcador de rompimento de membrana alvéolo-capilar e de injúria pulmonar aguda (IPA) (Guidot e cols., 2006; Ware e cols., 2001). Após sete dias de infecção o LBA foi coletado em animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-} e o sobrenadante foi utilizado para dosagem de proteínas, através do método do BCA (Pierce). Podemos observar, na figura IV.3-B, que os animais CD11d^{+/+} após a infecção, apresentam um grande extravasamento de proteínas, enquanto que os animais CD11d^{-/-} infectados, apresentam um extravasamento equivalente ao de seu controle, significativamente menor que os CD11d^{+/+} infectados. Este conjunto de dados confirma o envolvimento da subunidade CD11d na formação de edema no curso da infecção pelo *PbA*.

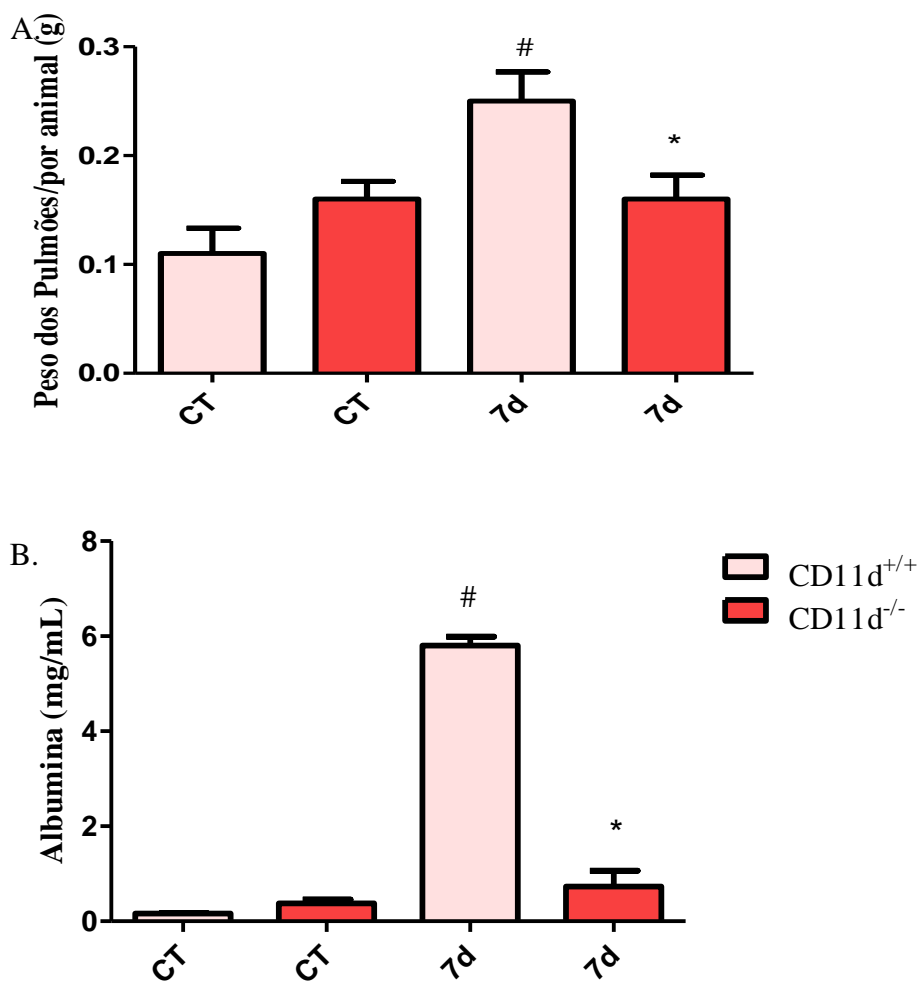


Figura 4.4.1: Pulmão de animais $CD11d^{-/-}$ tem menor formação de edema quando comparado com $CD11d^{+/+}$ após a infecção com PbA. Animais foram inoculados via i.p. com 10^5 hemácias não parasitadas (HNP) ou com 10^5 Hemácias Parasitadas (HP), e foram sacrificados 7 dias após a infecção. No gráfico A, peso dos pulmões. No gráfico B, demonstrando o extravasamento de proteínas identificado pelo método BCA. Gráfico representativo de três experimentos, cada barra é a média \pm S.E.M de 5 animais ($p \leq 0.05$), * comparando animais $CD11d^{+/+}$ e $CD11d^{-/-}$, e # animais infectados em relação aos seus controles.

4.5. A ausência da subunidade CD11d interfere na permeabilidade da barreira alvéolo-capilar

O corante Azul de Evans é realizado desde 1987 para análise da barreira hematoencefálica em animais com malária cerebral experimental (Thumwood e cols., 1988). Buscando confirmar nossos resultados sobre a permeabilidade da barreira alvéolo-capilar escolhemos utilizar o corante azul de Evans também para avaliar a formação de edema pulmonar em nosso modelo.

Para tanto, animais $CD11d^{+/+}$ e $CD11d^{-/-}$, após sete dias de infecção e seus respectivos controles, foram anestesiados, e 100 μ L de azul de Evans (2%) foi injetado via intra venosa. Após 1 hora os animais foram anestesiados, o pulmão foi perfundido e retirado para extração do corante. Como observamos na figura IV.4-A e B os animais $CD11d^{+/+}$ mais uma vez apresentam uma maior permeabilidade da barreira alvéolo-capilar, por ter uma grande retenção do corante no tecido, enquanto os $CD11d^{-/-}$ apresentaram pouca retenção do corante. Estes resultados sugerem que os animais $CD11d^{-/-}$ possuem a barreira alveolar mais íntegra e um menor edema pulmonar quando comparados aos $CD11d^{+/+}$.

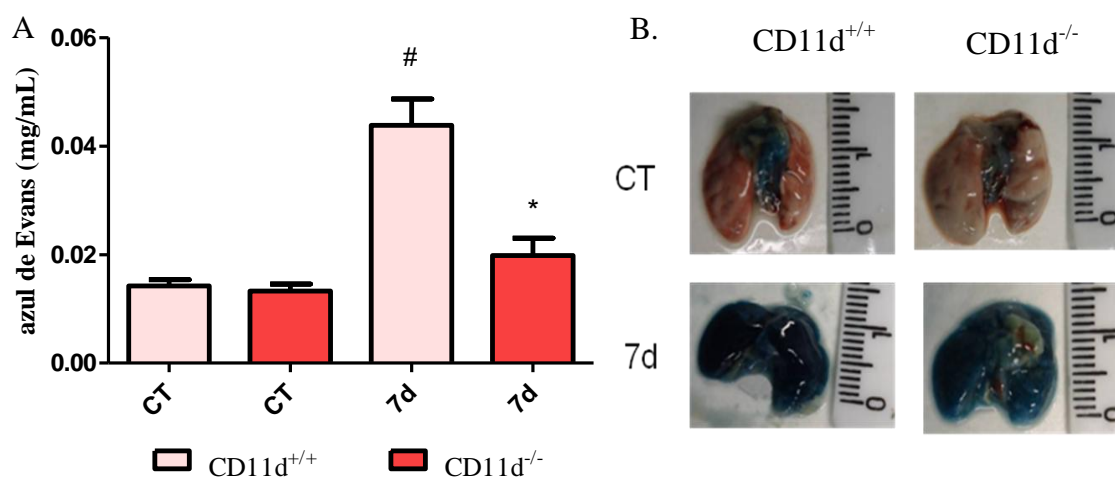


Figura 4.5.1: Redução da formação do edema pulmonar em camundongos $CD11d^{-/-}$ após a infecção com PbA quando comparado com os $CD11d^{+/+}$. Animais foram inoculados via i.p. com 10^5 hemácias não parasitadas (HNP) ou com 10^5 Hemácias Parasitadas (HP), e foram sacrificados 7 dias após a infecção. No gráfico A, demonstrando o nível de azul Evans extravasado para o tecido, no gráfico B, imagens dos pulmões de ambos grupos experimentais, as fotos da direita são imagens do pulmão animais $CD11d^{-/-}$ e da esquerda de animais $CD11d^{+/+}$ (Controle e sétimo dia de infecção). Gráfico representativo de três experimentos, cada barra é a média \pm S.E.M de 8-10 animais ($p \leq 0.05$), * comparando animais $CD11d^{+/+}$ e $CD11d^{-/-}$, e # animais infectados em relação aos seus controles.

4.6. A ausência da subunidade CD11d diminui o infiltrado leucocitário no tecido pulmonar durante a infecção malárica

Dados da literatura demonstram que a injúria pulmonar associada à malária é desencadeada por um processo inflamatório intenso, aliado a uma grande migração celular (Anstey e cols., 2002). Para confirmarmos se a menor liberação de mediadores inflamatórios, e a maior integridade da barreira alvéolo-capilar após a infecção em animais CD11d^{-/-} é acompanhada por um menor infiltrado inflamatório, analisamos cortes histológicos dos pulmões desses animais e dos seus respectivos controles.

Os cortes histológicos de tecido pulmonar foram corados pelo método de Hematoxilina e Eosina. As figuras IV.5.1-A e B, demonstram respectivamente os pulmões dos animais CD11d^{+/+}, CD11d^{-/-} controles, enquanto na figura IV.5.1-C podemos observar fotomicrografia do animal CD11d^{+/+} com um intenso infiltrado inflamatório (seta), áreas hemorrágicas (asterisco) e células aderidas (cabeça de seta) caracterizando um quadro inflamatório intenso, que não encontra correspondência ao observarmos a figura IV.5.1-D, que demonstra um pulmão de animal CD11d^{-/-} infectado sem alteração em relação ao seu respectivo controle. Esses dados sugerem que a subunidade CD11d esteja envolvida na migração celular e formação de edema durante a resposta inflamatória desencadeada pela infecção com PbA.

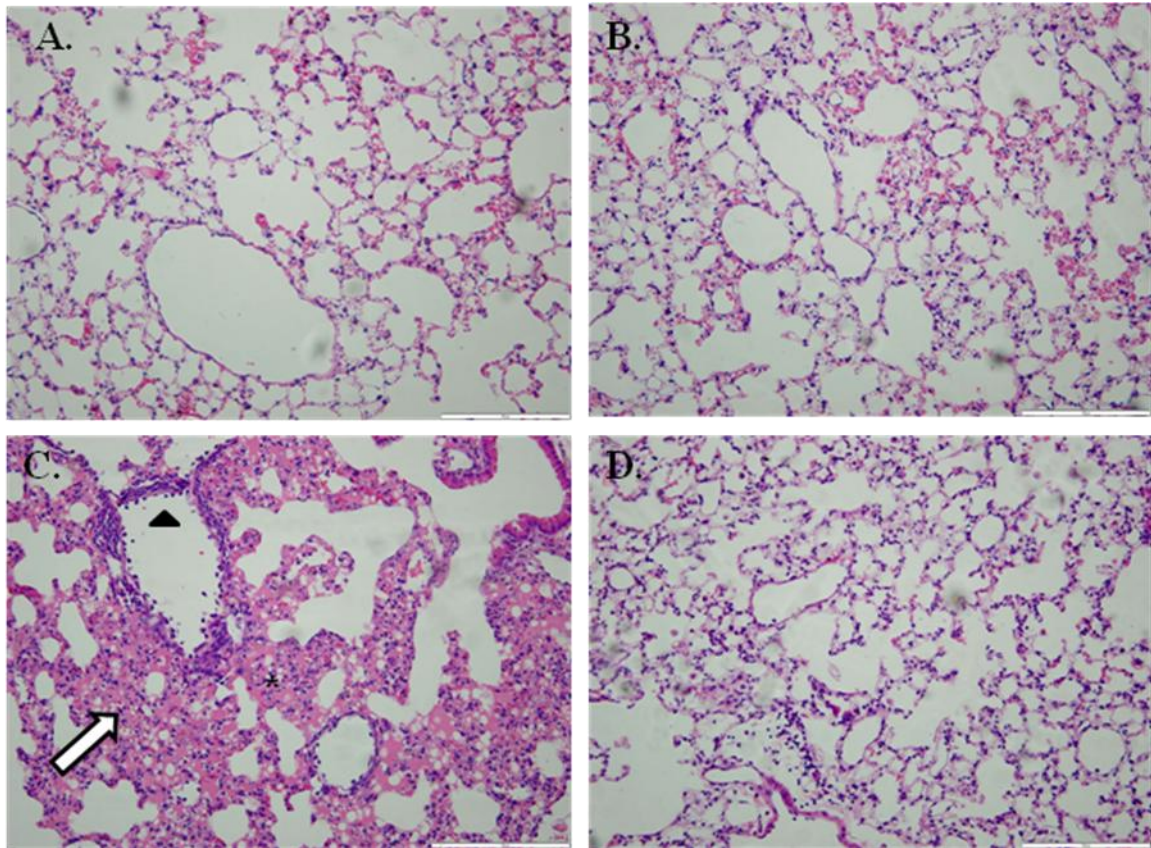
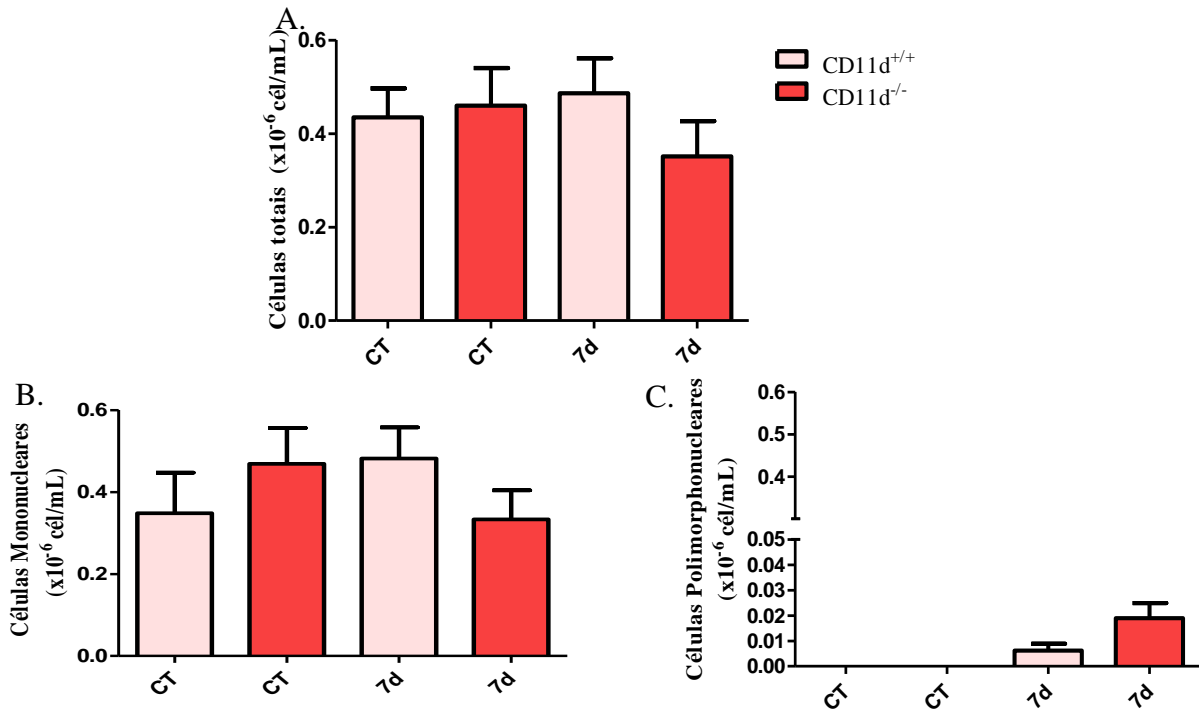


Figura 4.6.1: Análises histológicas de pulmão de animais $CD11d^{-/-}$ demonstraram menos áreas hemorrágicas, edema e infiltrado celular quando comparados com dos animais $CD11d^{+/+}$ após a infecção com PbA. Animais foram inoculados via i.p. com 10^5 hemácias não parasitadas (HNP) ou com 10^5 Hemácias Parasitadas (HP), e foram sacrificados 7 dias após a infecção. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. As fotomicrografias mostram áreas hemorrágicas (asterisco), infiltrado celular (seta) e células aderidas aos vasos (cabeça de seta) que foram mais frequentes em animais $CD11d^{+/+}$ (C) que em $CD11d^{-/-}$ (D). A e B animais controle. O padrão demonstrado nas fotos é representativo de três experimentos, contendo cinco animais cada. Aumento de 20X. Barra de $50\mu\text{m}$

4.7. A ausência da subunidade CD11d não interfere na migração celular no Lavado Brônquio Alveolar

A migração e o recrutamento leucocitário são comuns para o estabelecimento de um quadro inflamatório, representando um importante mecanismo da resposta imunológica. Esses processos envolvem algumas etapas como a adesão firme de células ao endotélio, mediada pela interação entre integrinas e seus ligantes, que possibilitam a transmigração de leucócitos para o foco inflamatório e atuação dessas células no controle da infecção (Springer, 1994). Tendo em vista o infiltrado inflamatório encontrado na histologia, fomos avaliar se havia alteração no número de células no LBA entre os animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-}.

Após a realização do LBA, foi realizada a contagem total e diferencial de leucócitos. Na figura IV.6.1-A, após a contagem de leucócitos totais e em IV.6.1-B a contagem de células de mononucleares, constatamos que a ausência da subunidade CD11d não altera a migração celular já que os dois grupos experimentais não apresentaram diferenças no número de leucócitos presentes no LBA.



*Figura 4.7.1: LBA dos animais CD11d^{-/-} e CD11d^{+/+} não apresentaram diferenças no perfil de recrutamento celular após a infecção com PbA. Animais foram inoculados via i.p. 10⁵ hemácias não parasitadas (HNP) ou 10⁵ Hemácias Parasitadas (HP), e foram sacrificados 7 dias após a infecção. O LBA foi coletado e contado o número total e diferencial de células. A contagem de célula total foi realizada solução de Turk, e o diferencial por citoesfregaço da amostra, depois corada por Giemsa No gráfico A, número de células totais, no gráfico B, número de células mononucleares, no gráfico C, número de células polimorfosnucleares. Gráfico representativo de três experimentos, cada barra é a média ± S.E.M de 5 animais (p ≤ 0.05), * comparando animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-}, e # animais infectados em relação aos seus controles.*

4.8. A ausência da subunidade CD11d interfere no número de células CD14⁺ no sangue periférico durante a infecção com *PbA*

As integrinas participam de vários processos celulares. A subfamília CD18 é relacionada principalmente com processos de migração e adesão de leucócitos no sangue periférico (Harris e cols., 2000). Como em nosso modelo, observamos diferenças entre os grupos experimentais no número de células infiltradas no parênquima pulmonar e não encontramos alteração na contagem de células no LBA, resolvemos avaliar possíveis diferenças no número de leucócitos na circulação.

Para tanto, o sangue periférico foi obtido através de punção cardíaca, foi processado para retirada de hemácias e os leucócitos foram marcados com anti-CD14-PE para análise por citometria de fluxo. Podemos observar na figura IV.7.1-A que não há alteração no percentual de células CD14⁺ entre os animais CD11d^{+/+} controles e após a infecção, também os animais CD11d^{-/-} controle apresentam o mesmo percentual de células CD14⁺ próximo do encontrado nos animais CD11d^{+/+}. Porém quando vamos avaliar os animais CD11d^{-/-} infectados curiosamente estes animais apresentam um percentual muito menor de células positivas, nos indicando que a ausência da integrina pode estar influenciando na migração destes leucócitos.

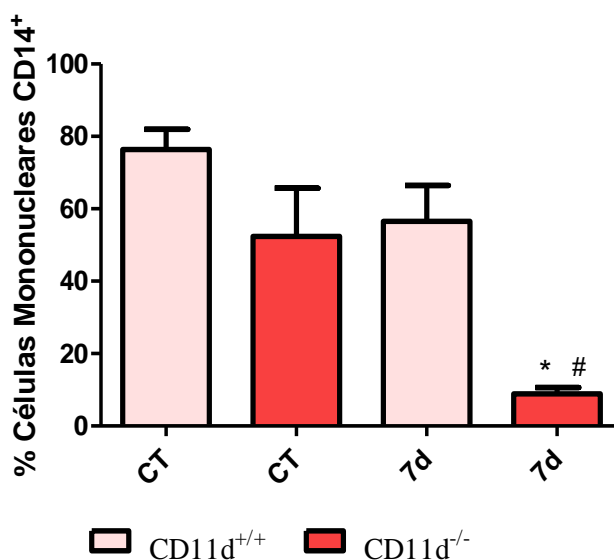


Figura 4.8.1: Sangue periférico de animais CD11d^{-/-} apresentou menos células CD14⁺ quando comparado com animais CD11d^{+/+} após a infecção PbA. Animais foram inoculados via i.p. com 10⁵ hemácias não parasitadas (HNP) ou com 10⁵ Hemácias Parasitadas (HP). Foram sacrificados 7 dias após a infecção. Os animais foram anestesiados e realizada a punção cardíaca o sangue foi centrifugado diversas vezes e as hemácias foram retiradas, para marcação com anti-CD14 e analisada por citometria de fluxo. Gráfico da porcentagem da população de células Mononucleares. Gráfico representativo de dois experimentos, cada barra é a média ±S.E.M de 5 animais ($p \leq 0.05$), * comparando animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-}, e # animais infectados em relação aos seus controles.

4.9. A ausência da subunidade CD11d interfere na saída de células da medula óssea durante a infecção com *PbA*

O acúmulo de leucócitos nos tecidos inicia-se com a saída dos mesmos da medula óssea, com a participação das moléculas de adesão e de citocinas. Como observamos alteração no número de leucócitos no tecido pulmonar e no sangue periférico entre os grupos experimentais, fomos investigar possíveis alterações no número de leucócitos na medula óssea de animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-}.

Animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-}, controle e infectados após sete dias de infecção, foram anestesiados, perfundidos e a medula óssea foi lavada em 3 mL de meio RPMI heparinizado, para contagem de células totais e diferencial. Como vemos na figura IV.8.1-A os animais CD11d^{+/+} apresentam uma diminuição no número total de leucócitos em relação ao seu controle, enquanto que os animais CD11d^{-/-} não apresentam uma redução tão drástica em relação ao seus controles e possuem significativamente mais células retidas na medula que os animais CD11d^{+/+}. A diferença encontrada no número total de células é decorrente de alterações no número de células mononucleares (IV.8.1-B) e granulócitos (IV.8.1-C), retidos na medula, quando comparado com os animais CD11d^{+/+}. Este dados nos indicam que a integrina CD11d/CD18 pode ser importante na migração celular, através de uma ação direta na saída de células da medula óssea durante a infecção.

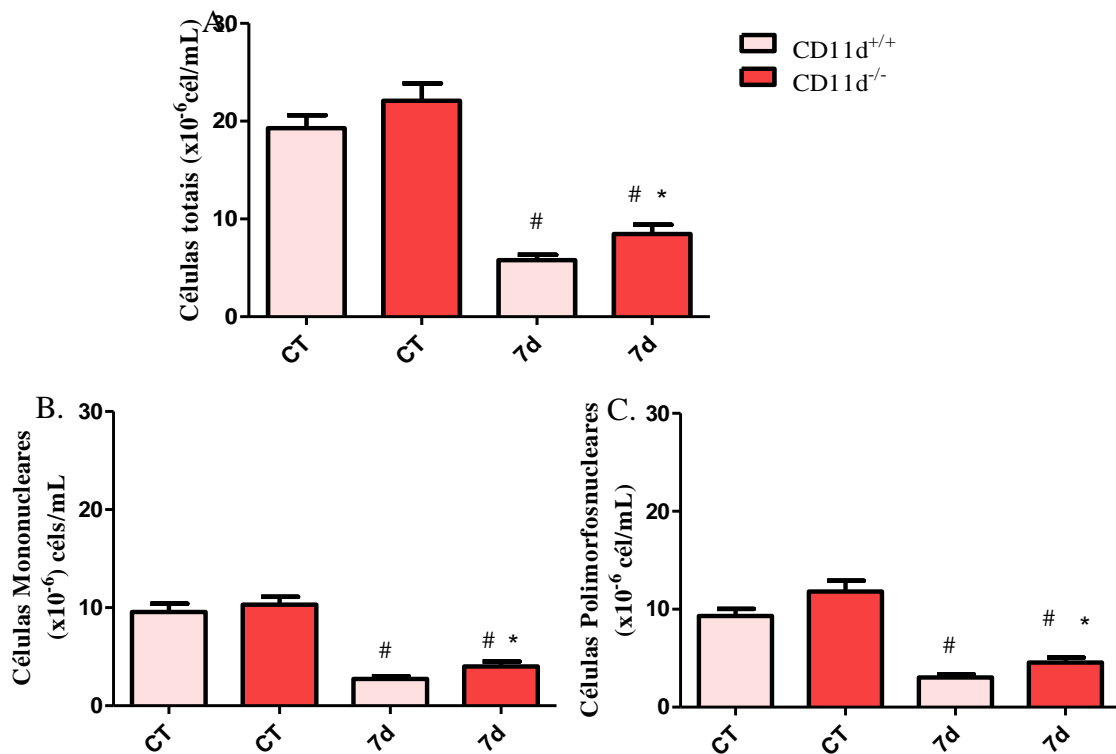


Figura 4.9.1: Medula de animais $CD11d^{-/-}$ tem mais células retidas quando comparado com a dos animais $CD11d^{+/+}$, após a infecção com PbA. Animais foram inoculados via i.p. com 10^5 hemácias não parasitadas (HNP) ou com 10^5 Hemácias Parasitadas (HP). Foram sacrificados 7 dias após a infecção. A contagem de célula total foi realizada em solução de Turk, e o diferencial por citoesfregaço, depois de corada por Giemsa. No gráfico A, número de células totais, no gráfico B, número de células mononucleares, e no gráfico C, número de granulócitos. Gráficos representativo de dois experimentos, cada barra é a média \pm S.E.M de 5 animais ($p \leq 0.05$), * comparando animais $CD11d^{+/+}$ e $CD11d^{-/-}$, e # animais infectados em relação aos seus controles.

4.10 A ausência da subunidade CD11d não interfere na expressão da molécula VCAM-1

O desencadeamento de formas graves da doença como a malária cerebral, placentária e/ou pulmonar, têm sido associada à resposta pró-inflamatória exacerbada a ao processo de citoaderencia de hemácias parasitadas à microcirculação, levando a anóxia tissula (Anstey e cols., 2002; Marsh e cols., 1997; Schofield e cols., 2005). Sabe-se que o sequestro celular pode ocorrer em vários órgãos, incluindo cérebro e pulmão, e que as leuointegrinas CD18 são importantes para ocorrência da migração e recrutamento celular (Harris e cols., 2000; Yakubenko e cols., 2008). Yakubenko e col. (2008) demonstrou que o aumento da expressão da leuointegrina CD11d/CD18 pode levar a um aumento da adesão em detrimento da migração. Para analisar se a ausência da integrina poderia estar influenciando na expressão de seus ligantes escolhemos analisar a expressão da molécula VCAM-1, por ser um conhecido ligante das moléculas CD11d/CD18 em humanos (Grayson e cols., 1998; Van der Vieren e cols., 1999).

Criocortes de tecido pulmonar de animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-}, controles e após sete dias de infecção, foram realizados e marcados para VCAM-1. Podemos observar na figura IV.9.1-A o controle de nossas marcações demonstrando, que as marcações encontradas em IV.9.1-B são específicas. Podemos observar na figura IV.9.1-B que com a infecção ocorre um aumento na expressão da molécula VCAM-1 de maneira muito semelhante em ambos os grupo experimentais. Portanto, nossos dados sugerem que os efeitos observados são em função da presença e modulação da expressão molécula CD11d, sem alteração do seu ligante VCAM-1.

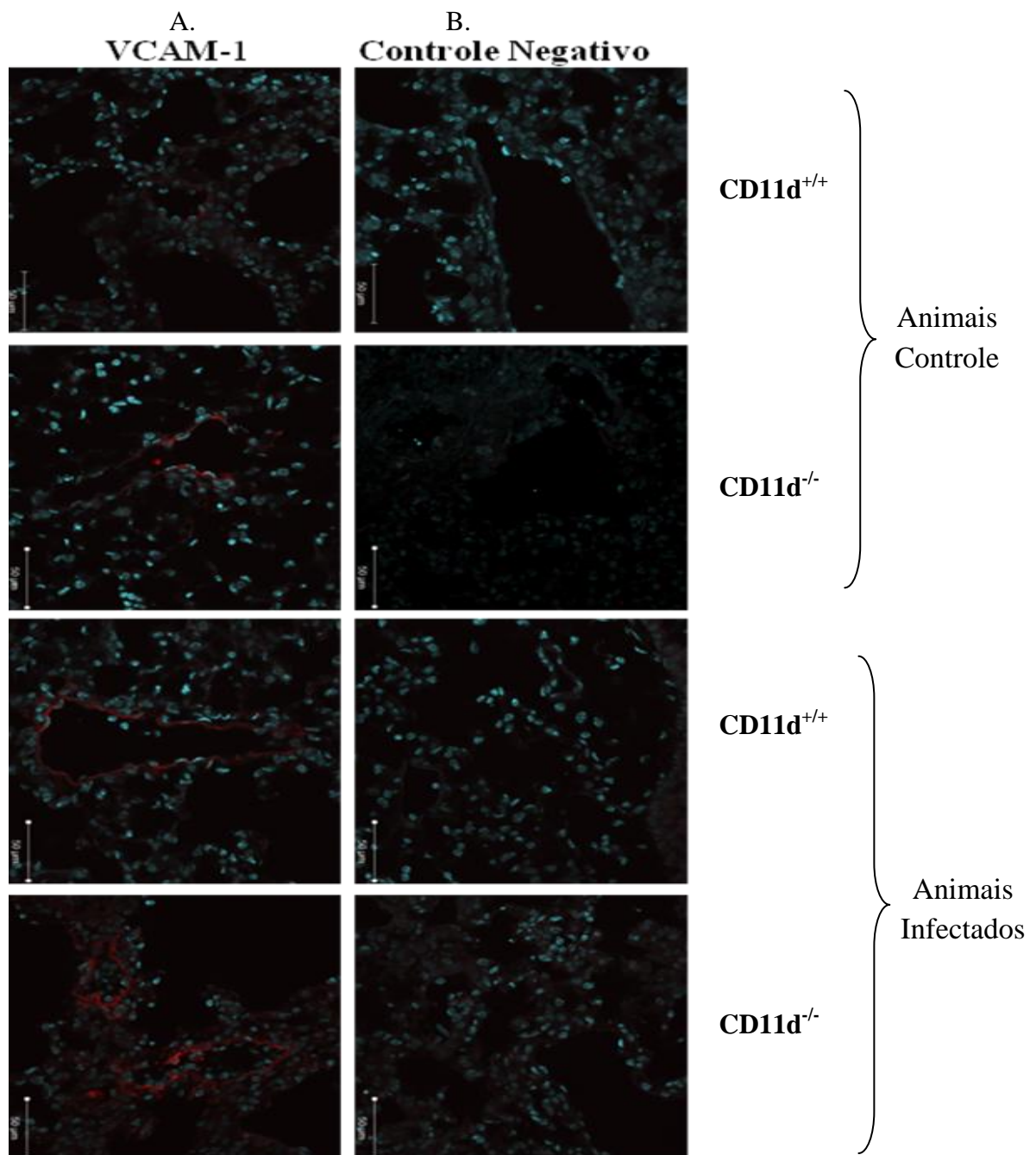


Figura 4.10.1: A *deleção da subunidade CD11d não altera a expressão da molécula VCAM-1 após a infecção com PbA*. Animais foram inoculados via i.p. com 10^5 hemácias não parasitadas (HNP) ou com 10^5 Hemácias Parasitadas (HP). Foram sacrificados 7 dias após a infecção. Os pulmões foram removidos e processados para realização de criocortes e marcação para VCAM-1 (mAb rat anti-Mouse CD106) e detecção por ensaio de imunofluorescência. No item A, criocortes de pulmões marcados com anticorpo inespecífico IgG (rato anti-IgG2b) como controle negativo. No item B, criocortes de pulmões marcados para VCAM-1. No item A e B podemos ver que os dois primeiros painéis da esquerda são criocortes de pulmão de animais controle respectivamente CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-}, e o terceiro e quarto painéis demonstram aumento da expressão de VCAM-1 em animais infectados de maneira muito semelhante entre os animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-} respectivamente. O padrão demonstrado são representativos de seis animais em dois experimentos diferentes. Aumento de 200 vezes. Barra 50 μ m

4.11. Animais CD11d^{-/-} demonstram menor comprometimento da função respiratória

As alterações encontradas na fisiologia pulmonar em pacientes infectados com *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* são muito semelhantes e incluem: obstrução de vias aéreas, diminuição da ventilação, redução da transferência de gases, e aumento da atividade fagocítica pulmonar (Anstey e cols., 2002; Mohan e cols., 2008). Dessa forma, para analisarmos se no modelo estudado há o desenvolvimento da hiperreatividade das vias aéreas foi analisada a responsividade brônquica a metacolina através de um sistema não invasivo de pletismografia de corpo inteiro (Buxco Technology, Sharon, CT). A hiperresponsividade brônquica foi avaliada utilizando os valores calculados do Pehn (pausa aumentada ou “enhanced pause”) como um índice.

A responsividade dos animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-}, controles e com sete dias de infecção, para metacolina foi mensurada pelo pletismógrafo não invasivo (Buxco Technology, Sharon, CT). Como pode ser observado na figura IV.10.1, animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-} já apresentaram uma maior pausa respiratória quando a aerolisação foi feita com PBS 1X, e uma hiper-reatividade brônquica quando a aerolisação foi feita com metacolina, na concentração de 25 mg/mL, quando comparados aos seus controles. Todavia, os animais CD11d^{-/-} infectados apresentaram responsividade brônquica à metacolina significativamente menor do que os animais CD11d^{+/+} infectados (figura IV.10.1). Possivelmente, isso é consequência de um infiltrado inflamatório reduzido e, assim, do quadro inflamatório menos intenso dos animais CD11d^{-/-} infectados.

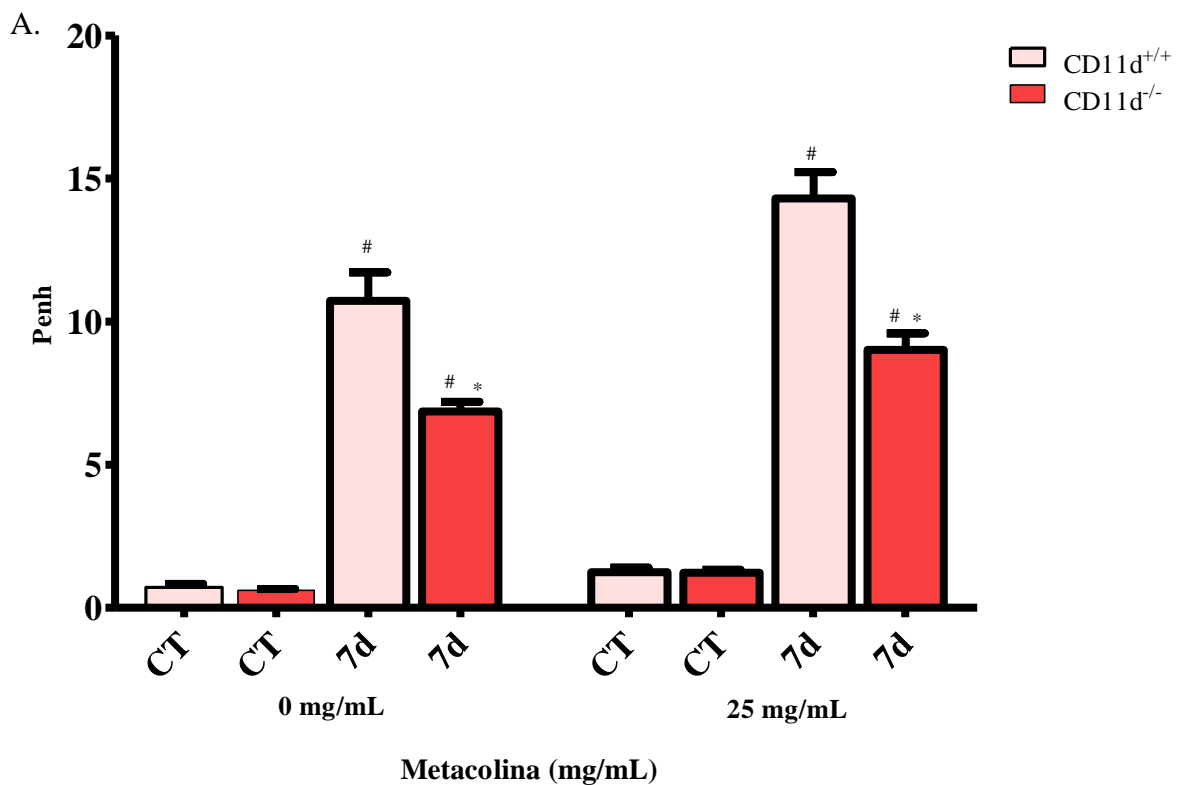


Figura 4.11.1: Animais $CD11d^{-/-}$ demonstraram menor responsividade brônquica a metacolina quando comparado aos $CD11d^{+/+}$ após a infecção com PbA. Animais foram inoculados via i.p. com 10^5 hemácias não parasitadas (HNP) ou com 10^5 Hemácias Parasitadas (HP). Foram sacrificados 7 dias após a infecção. A responsividade brônquica foi mensurada através da aerolisação de PBS 1X, seguida pela aerolisação com metacolina na concentração de 25 mg/mL e expressa em valores calculados do Pehn (pausa aumentada ou enhanced pause). No gráfico A observamos que os valores de Pehn foram significativamente mais elevados nos animais infectados em relação aos seus controles já quando aerolisados com PBS 1X e continuou alto com a aerolisação com 25 mg/mL de metacolina. Porém os animais $CD11d^{-/-}$ infectados apresentaram valores significativamente menores de Pehn quando comparados com os animais $CD11d^{+/+}$ infectados. Gráficos representativo de dois experimentos, cada barra é a media \pm S.E.M de 10 animais ($p \leq 0.05$), * comparando animais $CD11d^{+/+}$ e $CD11d^{-/-}$, e # animais infectados em relação aos seus controles.

5. DISCUSSÃO

A malária ainda é uma doença grave, e é a parasitose de maior importância no mundo, por desencadear até 1 milhão de mortes por ano em especial na África Subsaariana (OMS, 2011b). No Brasil, a malária ocorre na região da Amazônia Legal e gera problemas financeiros pela diminuição do turismo e pela grande morbidade gerada (Saúde, 2003). A principal “causa mortis” decorrente da malária é a malária cerebral (Schofield e cols., 2005). Contudo, a injúria pulmonar em decorrência da malária é também uma complicação importante e ocorre em um terço dos adultos com malária grave, sendo mais comum em mulheres grávidas (Mohan e cols., 2008; Rajput e cols., 2000; Schofield, 2007; Torres e cols., 1997).

A injúria pulmonar é, portanto, bem estabelecida como uma característica da malária grave em decorrência da infecção por *P. falciparum*, mas também ocorre na malária gerada por *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae* (Mohan e cols., 2008; Tan e cols., 2008). A injúria pulmonar caracteristicamente ocorre após o início do tratamento com antimalárico e é considerada uma manifestação da resposta inflamatória exacerbada (Anstey e cols., 2007; Anstey e cols., 2002; Gachot e cols., 1995; Tan e cols., 2008). Portanto, torna-se importante a investigação dos processos que levam ao desenvolvimento da injúria pulmonar, já que *P. vivax* e *P. falciparum* são as principais espécies responsáveis pelos episódios de malária ao redor do mundo. Na injúria pulmonar aguda em decorrência da malária ocorre obstrução das vias aéreas, diminuição da ventilação e das trocas gasosas e aumento da atividade fagocítica pulmonar (Anstey e cols., 2002; Taylor e cols., 2006).

Na malária humana e experimental é comum ocorrerem mudanças metabólicas, alteração da expressão de citocinas e sequestro de células na microcirculação do cérebro e de outros tecidos (Schofield e cols., 2005). Uma das etapas mais importantes no processo infeccioso é a resposta imunoinflamatória que envolve entre outros eventos a migração de leucócitos para a região tecidual, com acúmulo dos mesmos em focos inflamatórios. Esse processo requer a presença de receptores e mediadores químicos, que estão envolvidos na adesão e transmigração de células através do endotélio. Na malária, diversas integrinas têm sido associada à essa patogênese (Kumaratilake e cols., 1995; Piguet e cols., 2001; Siano e cols., 1998; Sponaas e cols., 2009; van der Heyde e cols., 2005). As integrinas medeiam a migração e adesão de leucócitos, e conseqüentemente, o acúmulo de células no sítio inflamatório, podendo estar associadas ao agravamento da inflamação (Golias e cols., 2011; Schmid e cols., 2011).

As integrinas, portanto têm um papel fisiopatológico dual, uma vez que quando ausentes nos leucócitos levam a uma síndrome caracterizada por infecções bacterianas e fungicas graves que podem levar à morte. Em contrapartida, a ativação prolongada dessas integrinas leva ao dano tecidual como evidenciado durante o processo de isquemia e reperfusão e na formação de placas ateroscleróticas (Noti, 2002). Diversos estudos mostraram a participação das leucointegrinas no desenvolvimento de patologias em modelos animais (Gris e cols., 2004; Miyazaki e cols., 2008). Vieira-de-Abreu A. e col. (manuscrito em preparação), observaram a importância da subunidade CD11d no desenvolvimento da malária cerebral no modelo experimental murino. No entanto, a atividade da integrina CD11d/CD18 em processos inflamatórios desencadeados por parasitos é pouco explorado.

No presente trabalho investigamos o possível papel da integrina CD11d/CD18 na injúria pulmonar decorrente da infecção pelo *P. berghei* Anka. Esse parasito é amplamente utilizado não somente para estudar a fisiopatologia da malária cerebral, mas também das complicações pulmonares causadas pela malária (Lovegrove e cols., 2008; Stevenson e cols., 2004).

Sabe-se que o aumento da migração de células para o pulmão, com conseqüente aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar, em modelos de ARDS induzida pela injeção intratraqueal de lipopolissacarídeo (LPS) em coelhos, é abolida ao utilizar anticorpos bloqueadores da subunidade CD18 (Yamamoto e cols., 1998). Considerando a observação acima, primeiramente investigamos se a infecção pelo PbA, em camundongos C57BL/6, poderia gerar um aumento da expressão da subunidade CD11d no tecido pulmonar, uma vez que já foi descrito o aumento de sua expressão em diversas patologias (Bao e cols., 2004; Bao e cols., 2005; Gris e cols., 2004; Mabon e cols., 2000; Noti, 2002; Oatway e cols., 2005; Saville e cols., 2004; Shanley e cols., 1998; Utagawa e cols., 2008; Van der Vieren e cols., 1995). Miyazaki (2008), em colaboração com nosso grupo, demonstrou que a expressão da integrina CD11d ocorre preferencialmente em tecido esplênico, mas também é evidente em diversos outros tecidos, e que a infecção com PbA, ou com *Salmonella typhimurium* poderia modular a expressão dessa leucointegrina e o desfecho da infecção. Considerando estes dados, observamos em nosso modelo, através da técnica de PCR em tempo real, um aumento da expressão da subunidade CD11d, no tecido pulmonar no curso da infecção pelo PbA, sugerindo assim que a subunidade CD11d, possa ter um papel importante na resposta do hospedeiro a injúria pulmonar desencadeada pela malária. Esse processo pode aumentar o acúmulo de leucócitos e produção/liberação de mediadores inflamatórios no foco inflamatório.

A produção de mediadores inflamatórios desempenha um papel muito importante na patogênese da ARDS. Durante a resposta inflamatória sistêmica, monócitos circulantes,

macrófagos alveolares e neutrófilos podem secretar citocinas e quimiocinas, incluindo TNF, IL-1 β , IL-6, CXCL-8/IL-8, IL-12 e interferon- γ (IFN- γ) (Yang e cols., 2010). Evidências substanciais sugerem que as citocinas são importantes mediadores da injúria pulmonar desencadeada por infecções ou pela exposição a produtos microbianos (Reiss e cols., 2012). O TNF também desempenha um papel importante na ativação da defesa do hospedeiro, ao promover a produção de uma gama de outras citocinas e quimiocinas, como IL-1, IL-6, CXCL-8/IL-8, e GM-CSF em processos inflamatórios, assim como o rompimento da barreira alvéolo-capilar. Essas citocinas ativam leucócitos e células endoteliais induzindo o aumento da expressão de moléculas de adesão, como as integrinas CD18 na superfície dessas células (Martin, 1999; Zheng e cols., 2010). Miyazaki e col (2008) demonstraram que a expressão da subunidade CD11d é modulada por citocinas em culturas de células leucocitárias murinas de linhagem mielóides M1.

Diversos trabalhos demonstram que o perfil de citocinas liberadas durante a malária é importante no desencadeamento das síndromes graves, como no desenvolvimento da malária cerebral (Armah e cols., 2005; Bostrom e cols., 2012; Marsh e cols., 1997) e do dano cognitivo desencadeado pela malária cerebral experimental induzida por PbA (Reis, e col manuscrito em preparação). Ao analisar a produção de citocinas e quimiocinas no tecido pulmonar de animais infectados com PbA, observamos uma maior liberação de TNF, IL-12, IL-1 β , IL-6, CCL-2/MCP-1, CCL-5/RANTES e CXCL-1/KC nos animais selvagens quando comparados aos animais deficientes para a subunidade CD11d. Estudos clínicos de pacientes com malária apresentando comprometimento pulmonar em decorrência da infecção com *P. vivax* ou *P. falciparum*, demonstraram níveis elevados de TNF, IL-6 e CXCL-8/IL-8 no plasma. Estes dados nos sugerem que a presença de níveis elevados destas citocinas no plasma de pacientes com malária, está relacionada com a propagação da resposta inflamatória pela ativação celular e consequente liberação de outras citocinas e quimiocinas. Este fenômeno pode levar ao aumento da citoaderência de hemácias e leucócitos às células endoteliais, e aumentar a expressão de moléculas de adesão gerando assim a quebra da barreira alvéolo-capilar e a formação de edema (Gachot e cols., 1995; Hiekkänen e cols., 2001; Mohan e cols., 2008; Torres e cols., 1997).

Nos modelos de malária pulmonar experimental, a produção e liberação de citocinas e quimiocinas têm um papel importante no desenvolvimento e no agravamento do quadro inflamatório (Mohan e cols., 2008). Portanto, os nossos dados de perfil de citocinas, associados aos dados de literatura, nos sugerem que a ausência da subunidade CD11d, pode esta modulando a produção e/ou liberação dessas citocinas e quimiocinas. E essa liberação

estaria impactando no acúmulo de líquido (edema) e de células no tecido pulmonar, que não encontra correspondência nos animais deficientes da subunidade CD11d.

Nossos dados encontram similaridades com modelo de ARDS bacteriano, realizados através da injeção de LPS, onde ocorre uma produção elevada de citocinas e quimiocinas como TNF, IL-1 β , IL-6, CXCL-8/IL-8, IL-12, CCL-2/MCP-1, dentre outras (van Zoelen e cols., 2011; Yamaguchi e cols., 2012; Yeh e cols., 2007). Adicionalmente, também encontramos similaridades nas complicações pulmonares desencadeadas por vírus, uma vez que há um aumento nos níveis de IL-6, CXCL-8/IL-8, IL-9, IL-12, IL-15 e TNF no soro de pacientes infectados com vírus influenza A (H1N1) (Hagau e cols., 2010). Em modelos experimentais, de infecção com H1N1, de camundongos selvagens e deficientes para TNF, foi possível observar a importância de mediadores inflamatório como o CCL-2/MCP-1 e do fator de crescimento e transformação (TGF- β 1), para o agravamento do quadro inflamatório pulmonar (Damjanovic e cols., 2011). Além disso, foi observada uma maior liberação de quimiocinas como o CCL-5/RANTES, pelas células pulmonares endoteliais infectadas com o vírus respiratório sincicial (RSV), com consequente aumento da inflamação local (Casola e cols., 2001).

Durante o processo inflamatório, de doenças como pneumonias, ALI ou ARDS, ocorre o rompimento da barreira semipermeável entre o sangue e o interstício pulmonar, que é formada pelas células endoteliais da vasculatura pulmonar. Essa disfunção na barreira pode resultar no movimento de fluidos e macromoléculas para o interstício e para as vias aéreas pulmonares, processos que contribuem significativamente para alta morbidade e mortalidade de pacientes com ARDS (Churg e cols., 2005). Considerando os níveis elevados de citocinas encontradas no homogenato do tecido pulmonar em nosso modelo, resolvemos avaliar se o processo inflamatório poderia estar levando a uma maior permeabilidade da barreira alvéolo-capilar e consequente formação de edema. Reiss e col (2012) relataram o papel das citocinas na formação do edema pulmonar em diversos modelos de ARDS e Yang e col (2010) demonstraram o papel dual da citocina TNF, ora podendo desencadear ativação das células endoteliais e rompimento de barreira, e ora tendo um papel protetor, aumentando a eliminação do líquido alveolar. Diante da modulação da liberação de citocinas e de quimiocinas geradas pela ausência da subunidade CD11d, observada neste trabalho, acreditamos que a formação do edema pulmonar em nosso modelo experimental, também poderia estar diminuída nos animais deficientes da subunidade CD11d.

Nossos dados nos indicam um aumento do peso dos pulmões, seguido por um grande extravasamento de proteínas no lavado broncoalveolar, e uma maior concentração da absorção do corante azul de Evans no tecido pulmonar, demonstrando um edema pulmonar

acentuado nos animais selvagens infectados, que foi significativamente inibido nos animais deficientes para subunidade CD11d. Esse resultado parece confirmar a importância da subunidade CD11d na fisiopatologia da malária experimental. Também nos trabalhos de malária pulmonar experimental, de Lovegrove e col. (2008), de Epiphanyo e col. (2010) e de Van de Steen e col. (2010) há formação de edema pulmonar. Todos esses trabalhos demonstraram uma correlação entre a elevada produção de citocinas, o extravazamento de proteínas, e o aumento do peso dos pulmões. A análise por azul de Evans também demonstra um aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar. Essa técnica é utilizada em trabalhos de identificação de ARDS, porém ela é extensivamente usada para caracterizar o rompimento da barreira hemato-encefálica em estudos de MCE (Thumwood e cols., 1988).

Ao ocorrer o rompimento da barreira alvéolo-capilar, e a consequente formação do edema, ocorre também um aumento na migração de células para os espaços alveolares e para o parênquima pulmonar. O recrutamento e a ativação de leucócitos nos sítios inflamatórios são orquestrados por um número distinto de eventos, incluindo a geração de citocinas inflamatórias, a expressão de moléculas de adesão e a produção de moléculas quimioatraentes, que conjuntamente levam a um maior rompimento da barreira alvéolo-capilar, formando um ciclo e agravando o dano tecidual (Churg e cols., 2005; Puneet e cols., 2005; Reiss e cols., 2012). Esta relação entre edema, e infiltrado inflamatório, é comumente encontrada em pacientes infectados com H1N1, e em modelos experimentais de ARDS, com injeção intratraqueal de LPS e de instilação de ácido clorídrico (HCl) (Hagau e cols., 2010; Reiss e cols., 2012; Yeh e cols., 2007).

Nos estudos de casos de pacientes com complicações pulmonares desencadeadas pela malária, é comum encontrar nas radiografias torácicas um denso infiltrado pulmonar. Na maioria dos casos, esse infiltrado inicia-se após o tratamento antimalárico, podendo estar aliado a outras complicações como malária cerebral, falência renal aguda, dentre outras (Asiedu e cols., 2000; Aursudkij e cols., 1998; Hiekkänen e cols., 2001; Lomar e cols., 2005; Mohan e cols., 2008; Price e cols., 2007; Sarkar e cols., 2010; Tan e cols., 2008; Torres e cols., 1997). A teoria mais aceita, para explicar como as complicações pulmonares desencadeadas pela malária são geradas, baseia-se no sequestro de hemácias parasitadas e não parasitadas (formação de rosetas). Essas hemácias estariam aderidas, por exemplo, ao sulfato de condroitina A ou mesmo ao receptor CD36, ambos expressos nas células endoteliais pulmonares, levando à obstrução da microvasculatura.

Aliado a citoadesão, a intensa migração de leucócitos para o sítio inflamatório gera uma resposta inflamatória intensa, levando ao dano tecidual (Agarwal e cols., 2007; Anstey e cols., 2007; Feldman e cols., 1987; Lovegrove e cols., 2008). Uma possível explicação para

essa intensa resposta inflamatória ser gerada pós-tratamento, é que com o rompimento da hemácia e a morte do parasito ocorre a liberação de bioprodutos, e eventos de reperfusão. A soma desses fenômenos levaria ao aumento da atividade fagocítica no sítio inflamatório, com exacerbada liberação de citocinas e quimiocinas, e a uma intensa ativação celular, o que leva ao dano tecidual (Anstey e cols., 2002; von Mach e cols., 2003). Nas nossas análises histológicas, podemos observar um extenso infiltrado inflamatório no parênquima pulmonar, acompanhado de áreas hemorrágicas e de infiltrado celular aderido aos vasos, corroborando com os dados encontrados na literatura tanto nos estudos de caso clínicos como nos modelos experimentais.

Nos modelos experimentais de malária, é comum encontrarmos infiltrado leucocitário, ao invés de hemácias parasitadas ocasionando obstrução mecânica. Contudo, recentemente um trabalho muito elegante foi demonstrado um acúmulo preferencial de hemácias parasitadas por *P. berghei* Anka no tecido pulmonar, esplênico e adiposo (Franke-Fayard e cols., 2010). Portanto, acreditamos que a interação entre leucócitos e hemácias aderidas aos capilares pulmonares, em decorrência da infecção, levam a uma resposta inflamatória aumentada, e a uma maior expressão de moléculas de adesão, que aumenta a migração e aderência de leucócitos, e hemácias parasitadas e não parasitadas. Os nossos dados nos indicam que o aumento da expressão da subunidade CD11d, pode estar tornando os leucócitos mais aderentes, como já demonstrado por Yakubenko e col. (2008), e levando ao agravamento do quadro, como visto em nossos animais selvagens. Foi visto que o uso de anticorpo bloqueador da subunidade CD11d foi capaz de inibir a migração e consequente infiltração de monócitos/macrófagos para o sítio inflamatório no modelo de trauma de medula espinhal em ratos (Mabon e cols., 2000). Portanto, os nossos achados corroboram com os dados da literatura, demonstrando que a subunidade CD11d, pode estar desempenhando um papel fundamental na formação de infiltrado inflamatório no modelo de injúria pulmonar causada pela infecção do PbA.

Em diversos modelos de inflamação pulmonar, já tem sido descrito o papel das moléculas de adesão, como as integrinas e em especial as leucointegrinas no desenvolvimento de edema pulmonar. O bloqueio da ligação entre VLA-4 e VCAM-1 demonstra ser importante para reduzir a migração de eosinófilos no modelo de inflamação pulmonar ocasionada por ovalbumina (Taylor e cols., 1997). Além disso, já foi demonstrado o papel da integrina $\alpha_v\beta_6$ na ativação de TGF- β em células epiteliais pulmonares levando à ativação da cascata de coagulação e assim contribuindo para o desenvolvimento de ARDS (Jenkins e cols., 2006b). As beta integrinas também têm sido implicadas no desenvolvimento da inflamação pulmonar em diversos modelos onde o bloqueio de CD11b/CD18 foi capaz de inibir o aumento de peso

pulmonar e o aumento da permeabilidade a moléculas como albumina (Fang e cols., 1998). No modelo de pleurisia induzida por carragenina, após o uso de ciclosporina A, observou-se uma diminuição na expressão da leucointegrina CD11a/CD18 no pulmão, juntamente com a diminuição da produção e da liberação de citocinas como o TNF e a IL-1 β no lavado da cavidade pleural, o que proporcionou uma melhora do quadro (Dalmarco e cols., 2008). Interessantemente, foi demonstrado no modelo de injúria pulmonar induzida por reperfusão após a isquemia em coelhos, que a migração de polimorfonucleares demonstrou ser dependente da expressão da glicoproteína CD18 (Welbourn e cols., 1992). O bloqueio da integrina CD11d/CD18 desencadeou uma melhora no quadro de injúria inflamatória pulmonar em ratos induzida por imunocomplexos, com redução do nível de TNF e diminuição do recrutamento do infiltrado inflamatório celular no LBA (Shanley e cols., 1998).

Sabe-se que as integrinas são moléculas importantes no desenvolvimento da injúria pulmonar em diversos estímulos. Em nosso trabalho, curiosamente, não percebemos alteração na migração celular avaliada no LBA, o que contrapõe vários modelos de injúria pulmonar nos quais inclusive as leucointegrinas são implicadas na migração de polimorfonucleares para o espaço alveolar (Jin e cols., 2003; Kawakami e cols., 1997; Steinmuller e cols., 2006; Sumida, 1995). Contudo, Lovergrove e col. (2008) e Van den Steen e col. (2010) descrevem a ausência de migração celular visível no LBA, quando os animais foram infectados com PbA, indicando ser uma característica do modelo de injúria pulmonar escolhido, o que nos indica ter uma falha na indução de transmigração de células inflamatórias para o espaço alveolar. Porém ambos os trabalhos citados anteriormente demonstram aumento no número de células no parênquima pulmonar, no entanto em estudos de caso de malária pulmonar não é comum a análise do LBA. Contudo, apesar de não haver diferença no número de células totais, a análise do tipo celular nos demonstrou uma preponderância de células mononucleares no tecido pulmonar, condizente com a literatura (Lovegrove e cols., 2008; Van den Steen e cols., 2010). Como monócitos e macrófagos são células que preferencialmente expressam a integrina CD11d/CD18 (Danilenko e cols., 1995; el-Gabalawy e cols., 1996; Miyazaki e cols., 2008) é provável que a diferença vista nas análises histológicas, do número de células no parênquima pulmonar, seja diretamente relacionado com a ausência da subunidade CD11d.

Monócitos e/ou macrófagos são células que desempenham um papel importante na patogênese da malária, por serem células efectoras na produção de citocinas e na fagocitose de hemácias parasitadas (Chimma e cols., 2009; Lovegrove e cols., 2008; Price e cols., 2007). Além disso, encontra-se na literatura a participação de monócitos e/ou macrófagos na patogênese da anemia grave da malária (Ogonda e cols., 2010) e na malária cerebral (Oakley e cols., 2009). Estudos de casos de coinfeção de malária e HIV demonstraram a expansão de

subpopulações de células CD14⁺CD16⁺ em mulheres grávidas, assim como a indução da replicação do vírus HIV-1 dentro de macrófagos CD14⁺ (Ogonda e cols., 2010; Pisell e cols., 2002). A molécula CD14 é um importante marcador de monócitos e/ou macrófagos por ser expressa predominantemente na superfície de células de origem mieloide, porém também é encontrada em células epiteliais, endoteliais e fibroblastos (Anas e cols., 2010). Diversos trabalhos já demonstraram que ocorre o aumento da expressão da molécula CD14 na superfície de monócitos e de células dendríticas mieloides, assim como de CD14 solúvel no plasma de pacientes com malária (Loharungsikul e cols., 2008; Wenisch e cols., 1996). A molécula CD14 é muito importante no reconhecimento de patógenos realizado pelos receptores do tipo TLRs, que são receptores importantes na fisiopatologia da malária, por fazerem o reconhecimento de bioprodutos da infecção como GPI e hemozoína (Oakley e cols., 2009). O reconhecimento pela molécula CD14 resulta na ativação de uma cascata inflamatória, que desencadeia a liberação de TNF e IL-1 β , levando a ativação endotelial e aumento da expressão de moléculas de adesão, sendo ainda um dos principais receptores envolvidos no processo de apoptose (Ogonda e cols., 2010; Wenisch e cols., 1996). A diminuição do percentual de células CD14⁺ no sangue periférico dos animais deficientes para subunidade CD11d, vista em nosso trabalho nos indica que as células mononucleares podem ser importantes também nas complicações pulmonares desencadeada pela malária. O menor número de células presentes no sangue periférico, aliado a um menor número de células chegando ao pulmão, sugere que menos células estariam aderidas no sítio inflamatório, liberando um menor nível de mediadores inflamatórios, ocasionando menor dano tecidual. Este dado encontra respaldo também nos trabalhos de Anstey e col. (2002) que demonstra aumento da atividade de células fagocíticas no tecido pulmonar de pacientes com complicações pulmonares infectados com *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*.

Baseado em nossos dados até agora, podemos dizer que a ausência da subunidade CD11d, e conseqüentemente da integrina CD11d/CD18, uma vez que só ocorre a expressão da integrina na superfície celular após a formação do complexo heterodimérico (McKillop e cols., 2009), tem um papel importante na migração de leucócitos. Aliados a estes achados, observamos que a ausência da subunidade CD11d desencadeou uma maior retenção de células na medula óssea. Sabe-se que moléculas como CD11b e VLA-4 influenciam na passagem de eosinófilos da medula óssea, para o sangue periférico, e destas para o pulmão, em modelos murinos de asma alérgica induzida por ovalbumina (Pelaquini e cols., 2010). Também a saída de eosinófilos da medula óssea, em resposta à IL-5 é dependente do aumento da expressão de beta integrinas, visto que ao usar o anticorpo bloqueador inibiu a mobilização destas células (Palframan e cols., 1998). Em condições de repouso, ao realizar o bloqueio da subunidade

CD18, ocorre uma diminuição do número destas células dendríticas para o pulmão, e um consequente acúmulo destas no sangue periférico (Schneeberger e cols., 2000).

Além da migração celular, a integrina CD11d/CD18, assim como as outras leucointegrinas, está envolvida em processos de adesão celular. Yakubenko e col. (2008) demonstraram que o complexo heterodimérico CD11d/CD18, quando super-expresso torna as células mais aderentes em detrimento da migração. Apesar da pouca literatura sobre esta integrina, ela é classificada como uma integrina de ligação promiscua. Dentre os ligantes para CD11d/CD18 as moléculas de adesão celular, CAM, representam uma extensiva classe de proteínas envolvida no recrutamento e migração de leucócitos e são reconhecidas como ligantes específicos para as leucointegrinas e em especial para a integrina CD11d/CD18 (Grayson e cols., 1998; Van der Vieren e cols., 1999). Podemos observar em nosso modelo, que a infecção foi importante no aumento da expressão da molécula VCAM-1 tanto na presença quanto ausência da integrina. Tal evento foi condizente com o aumento da liberação das citocinas, sugerindo que o acúmulo de células visto nos cortes histológicos é devido a ausência da subunidade CD11d que provavelmente dificulta a adesão dos leucócitos ao sítio inflamatório levando a um menor dano, e não a ausência de outros receptores importantes para a adesão.

Em modelos animais de ARDS e em “in vitro” nos quais células da microvasculatura pulmonar são utilizadas, foi identificado que a liberação de citocinas como: TNF, IL-1 β , CXCL-8/IL-8, IL-6, levam à ativação do endotélio pulmonar. Ocorrendo assim, o aumento da expressão de moléculas como ICAM-1, VCAM-1 e selectinas, desencadeando a migração e acúmulo de leucócitos no sítio inflamatório (Blease e cols., 1998; Li e cols., 2012; Silva e cols., 2012; Skerrett e cols., 2004; Vanderstocken e cols., 2010). Trabalhos que utilizaram anticorpos bloqueadores da subunidade CD18 demonstraram uma diminuição da migração de polimorfonucleares, e uma modulação da expressão da molécula ICAM-1. Assim como em modelos de injúria pulmonar induzida pela instilação de HCl ou por insulflamento de citocinas, o bloqueio da leucointegrina CD11b, CD18 ou ICAM-1 limitou o sequestro de leucócitos, o extravasamento de proteínas e a formação de edema (Parmley e cols., 2007; Reiss e cols., 2012; Yeh e cols., 2007). Estudos prévios demonstraram que VCAM-1 é uma molécula de adesão importante também na malária experimental (Zanini e cols., 2011) e humana (Fatih e cols., 2012; Janes e cols., 2011; Wu e cols., 2011), por ser um ligante tanto dos leucócitos, através das leucointegrinas, quanto de hemácias parasitadas ou não parasitadas, participando dos processos de citoaderência que levam a obstrução da microvasculatura. Contudo, a função do VCAM-1 na injúria pulmonar induzida pela malária ainda não havia sido analisada.

Pacientes com complicações pulmonares em decorrência da malária apresentam manifestações clínicas semelhantes ao quadro de síndrome do desconforto respiratório agudo, e em muitos casos é necessário o uso da ventilação mecânica (Agarwal e cols., 2007; Gerardin e cols., 2007; Mohan e cols., 2008). Acredita-se que ocorra um comprometimento do processo de troca dos gases, provavelmente em decorrência da reação inflamatória e da lesão endotelial que se seguem, juntamente com as alterações hemodinâmicas induzidas pelo bloqueio capilar devido ao acúmulo local de hemácias parasitadas e de células inflamatórias (Anstey e cols., 2002; Mohan e cols., 2008). Em nosso modelo, podemos constatar que com a infecção ocorreu um aumento da liberação de mediadores inflamatórios, levando a um comprometimento da barreira alvéolo-capilar e um aumento da migração celular, desencadeando uma piora na função respiratória dos animais. O papel de integrinas na hiperresponsividade brônquica em especial das leucointegrinas tem sido muito investigado, em especial o papel da interação entre VLA-4 ou das integrinas CD18 com VCAM-1 no tecido pulmonar, levando ao aumento da migração de células, desencadeando asma e rinite alérgica (Hisada e cols., 1999; Kanwar e cols., 2001; Milne e cols., 1994; Schwarze e cols., 1999; Weiss e cols., 2005). Esses modelos geram uma migração intensa de células para as vias aéreas com comprometimento destas e assim dificultando a função respiratória, diferente do modelo de malária pulmonar que é caracterizado por uma intensa inflamação no parênquima pulmonar (Anstey e cols., 2007; Anstey e cols., 2002; Braunstahl, 2009; Epiphany e cols., 2010; Lovegrove e cols., 2008; Van den Steen e cols., 2010).

Em nosso trabalho sugerimos que a integrina CD11d/CD18 estaria influenciando na migração e adesão de leucócitos para o tecido pulmonar durante a infecção com PbA. Contudo, mais estudos são necessários para uma melhor compreensão do papel da integrina CD11d/CD18 na injúria pulmonar desencadeada pela malária, sugerindo que este talvez possa ser um alvo interessante para futuras estratégias terapêuticas no tratamento de doenças inflamatórias pulmonares.

6. CONCLUSÃO

- A expressão da subunidade CD11d é modulada no tecido pulmonar durante a infecção com *PbA*.
- A ausência da subunidade CD11d levou a diminuição da produção/liberação de citocinas/quimiocinas imunomodulatórias durante a infecção com *PbA*.
- A ausência da subunidade CD11d levou a uma diminuição do infiltrado inflamatório, e a uma menor permeabilidade da barreira alvéolo capilar, durante a infecção com *PbA*.
- A ausência da subunidade CD11d influencia no processo de migração celular, levando a retenção de células na medula óssea, e uma diminuição no número de células CD14⁺ no sangue periférico, durante a infecção com *PbA*.
- A ausência da integrina CD11d não influencia na aumento da expressão do seu receptor VCAM-1, durante a infecção com *PbA*.
- Os animais deficientes para a subunidade CD11d, apresentam uma melhor função respiratória, durante a infecção com *PbA*.

7. PERSPECTIVAS

- Avaliar a expressão das demais leucointegrinas, no tecido pulmonar durante a infecção com *PbA*;
- Avaliar a expressão dos demais ligantes conhecidos para integrina CD11d/CD18;
- Avaliar a produção de muco e colágeno nos cortes histológicos de pulmão, durante a infecção com *PbA*;

8. REFERÊNCIAS

- Adachi K, H Tsutsui, S Kashiwamura, E Seki, H Nakano, O Takeuchi, K Takeda, K Okumura, L Van Kaer, H Okamura, S Akira eK Nakanishi. Plasmodium berghei infection in mice induces liver injury by an IL-12- and toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88-dependent mechanism. *J Immunol* 2001.167:5928-34.
- Agarwal R, A Nath eD Gupta. Noninvasive ventilation in Plasmodium vivax related ALI/ARDS. *Intern Med* 2007.46:2007-11.
- Amino R, S Thiberge, S Shorte, F Frischknecht eR Menard. Quantitative imaging of Plasmodium sporozoites in the mammalian host. *C R Biol* 2006.329:858-62.
- Anas A, T van der Poll eAF de Vos. Role of CD14 in lung inflammation and infection. *Crit Care* 2010.14:209.
- Anstey NM, T Handojo, MC Pain, E Kenangalem, E Tjitra, RN Price eGP Maguire. Lung injury in vivax malaria: pathophysiological evidence for pulmonary vascular sequestration and posttreatment alveolar-capillary inflammation. *J Infect Dis* 2007.195:589-96.
- Anstey NM, SP Jacups, T Cain, T Pearson, PJ Ziesing, DA Fisher, BJ Currie, PJ Marks eGP Maguire. Pulmonary manifestations of uncomplicated falciparum and vivax malaria: cough, small airways obstruction, impaired gas transfer, and increased pulmonary phagocytic activity. *J Infect Dis* 2002.185:1326-34.
- Antinori S, L Galimberti, L Milazzo eM Corbellino. Biology of human malaria plasmodia including Plasmodium knowlesi. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2012.4:e2012013.
- Anyona SB, P Kempaiah, E Raballah, GC Davenport, T Were, SN Konah, JM Vulule, JB Hittner, CW Gichuki, JM Ong'echa eDJ Perkins. Reduced systemic bicyclic prostaglandin-E2 and cyclooxygenase-2 gene expression are associated with inefficient erythropoiesis and enhanced uptake of monocytic hemozoin in children with severe malarial anemia. *Am J Hematol* 2012.87:782-9.
- Armah H, EK Wired, AK Dodoo, AA Adjei, Y Tettey eR Gyasi. Cytokines and adhesion molecules expression in the brain in human cerebral malaria. *Int J Environ Res Public Health* 2005.2:123-31.
- Asiedu DK eCB Sherman. Adult respiratory distress syndrome complicating Plasmodium falciparum malaria. *Heart Lung* 2000.29:294-7.
- Aursudkij B, P Wilairatana, S Vannaphan, DS Walsh, VR Gordeux eS Looareesuwan. Pulmonary edema in cerebral malaria patients in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1998.29:541-5.

- Awandare GA, B Goka, P Boeuf, JK Tetteh, JA Kurtzhals, C Behr eBD Akanmori. Increased levels of inflammatory mediators in children with severe Plasmodium falciparum malaria with respiratory distress. *J Infect Dis* 2006.194:1438-46.
- Baker DA. Malaria gametocytogenesis. *Mol Biochem Parasitol* 2010.172:57-65.
- Bao F, Y Chen, GA Dekaban eLC Weaver. Early anti-inflammatory treatment reduces lipid peroxidation and protein nitration after spinal cord injury in rats. *J Neurochem* 2004.88:1335-44.
- Bao F, GA Dekaban eLC Weaver. Anti-CD11d antibody treatment reduces free radical formation and cell death in the injured spinal cord of rats. *J Neurochem* 2005.94:1361-73.
- Barrera V, OA Skorokhod, D Baci, G Gremo, P Arese eE Schwarzer. Host fibrinogen stably bound to hemozoin rapidly activates monocytes via TLR-4 and CD11b/CD18-integrin: a new paradigm of hemozoin action. *Blood* 2011.117:5674-82.
- Baruch DI. Adhesive receptors on malaria-parasitized red cells. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 1999.12:747-61.
- Belnoue E, SM Potter, DS Rosa, M Mauduit, AC Gruner, M Kayibanda, AJ Mitchell, NH Hunt eL Renia. Control of pathogenic CD8+ T cell migration to the brain by IFN-gamma during experimental cerebral malaria. *Parasite Immunol* 2008.30:544-53.
- Belyaev NN, DE Brown, AI Diaz, A Rae, W Jarra, J Thompson, J Langhorne eAJ Potocnik. Induction of an IL7-R(+)-Kit(hi) myelolymphoid progenitor critically dependent on IFN-gamma signaling during acute malaria. *Nat Immunol* 2010.11:477-85.
- Blanloeil Y, D Baron, AY de Lajartre eF Nicolas. [Acute respiratory distress syndrome (ARDS) in cerebral malaria (author's transl)]. *Sem Hop* 1980.56:1088-90.
- Blease K, A Burke-Gaffney ePG Hellewell. Modulation of cell adhesion molecule expression and function on human lung microvascular endothelial cells by inhibition of phosphodiesterases 3 and 4. *Br J Pharmacol* 1998.124:229-37.
- Bonifacio A, S Finaurini, C Krafft, S Parapini, D Taramelli eV Sergio. Spatial distribution of heme species in erythrocytes infected with Plasmodium falciparum by use of resonance Raman imaging and multivariate analysis. *Anal Bioanal Chem* 2008.392:1277-82.
- Bostrom S, P Giusti, C Arama, JO Persson, V Dara, B Traore, A Dolo, O Doumbo eM Troye-Blomberg. Changes in the levels of cytokines, chemokines and malaria-specific antibodies in response to Plasmodium falciparum infection in children living in sympatry in Mali. *Malar J* 2012.11:109.

- Bouyou-Akotet MK, M Kombila, PG Kreamsner eE Mavoungou. Cytokine profiles in peripheral, placental and cord blood in pregnant women from an area endemic for *Plasmodium falciparum*. *Eur Cytokine Netw* 2004.15:120-5.
- Braunstahl GJ. United airways concept: what does it teach us about systemic inflammation in airways disease? *Proc Am Thorac Soc* 2009.6:652-4.
- Bronte V, E Apolloni, A Cabrelle, R Ronca, P Serafini, P Zamboni, NP Restifo eP Zanovello. Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood* 2000.96:3838-46.
- Bunting M, ES Harris, TM McIntyre, SM Prescott eGA Zimmerman. Leukocyte adhesion deficiency syndromes: adhesion and tethering defects involving beta 2 integrins and selectin ligands. *Curr Opin Hematol* 2002.9:30-5.
- Caillard V, A Beaute-Lafitte, AG Chabaud eI Landau. *Plasmodium vinckei petteri*: identification of the stages sensitive to arteether. *Exp Parasitol* 1992.75:449-56.
- Cairo CW, R Mirchev eDE Golan. Cytoskeletal regulation couples LFA-1 conformational changes to receptor lateral mobility and clustering. *Immunity* 2006.25:297-308.
- Carter R eKN Mendis. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clin Microbiol Rev* 2002.15:564-94.
- Carvalho BO, SC Lopes, PA Nogueira, PP Orlandi, DY Bargieri, YC Blanco, R Mamoni, JA Leite, MM Rodrigues, IS Soares, TR Oliveira, G Wunderlich, MV Lacerda, HA del Portillo, MO Araujo, B Russell, R Suwanarusk, G Snounou, L Renia eFT Costa. On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *J Infect Dis* 2010.202:638-47.
- Casola A, RP Garofalo, H Haeberle, TF Elliott, R Lin, M Jamaluddin eAR Brasier. Multiple cis regulatory elements control RANTES promoter activity in alveolar epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. *J Virol* 2001.75:6428-39.
- Chakravarty S, IA Cockburn, S Kuk, MG Overstreet, JB Sacci eF Zavala. CD8+ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. *Nat Med* 2007.13:1035-41.
- Chavakis T. Leucocyte recruitment in inflammation and novel endogenous negative regulators thereof. *Eur J Clin Invest* 2012.42:686-91.
- Chimma P, C Roussillon, P Sratongno, R Ruangveerayuth, K Pattanapanyasat, JL Perignon, DJ Roberts eP Druilhe. A distinct peripheral blood monocyte phenotype is associated with parasite inhibitory activity in acute uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Pathog* 2009.5:e1000631.

- Churg AM, JL Myers, HD Tazelaar eJL Wright. Thurlbeck's Pathology of the Lung. Thieme Medical Publishers, Inc. 2005.3rd edition:1157.
- Claessens A, Y Adams, A Ghumra, G Lindergard, CC Buchan, C Andisi, PC Bull, S Mok, AP Gupta, CW Wang, L Turner, M Arman, A Raza, Z Bozdech eJA Rowe. A subset of group A-like var genes encodes the malaria parasite ligands for binding to human brain endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012.109:E1772-81.
- Clark IA, WB Cowden eGA Butcher. TNF and inhibition of growth of *Plasmodium falciparum*. *Immunol Lett* 1990.25:175-8.
- Clark IA eKA Rockett. The cytokine theory of human cerebral malaria. *Parasitol Today* 1994.10:410-2.
- Coban C, KJ Ishii, T Kawai, H Hemmi, S Sato, S Uematsu, M Yamamoto, O Takeuchi, S Itagaki, N Kumar, T Horii eS Akira. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med* 2005.201:19-25.
- Coban C, KJ Ishii, S Uematsu, N Arisue, S Sato, M Yamamoto, T Kawai, O Takeuchi, H Hisaeda, T Horii eS Akira. Pathological role of Toll-like receptor signaling in cerebral malaria. *Int Immunol* 2007.19:67-79.
- Collins WE. *Plasmodium knowlesi*: a malaria parasite of monkeys and humans. *Annu Rev Entomol* 2012.57:107-21.
- Combes V, N Coltel, D Faille, SC Wassmer eGE Grau. Cerebral malaria: role of microparticles and platelets in alterations of the blood-brain barrier. *Int J Parasitol* 2006.36:541-6.
- Costantini C, A Micheletti, F Calzetti, O Perbellini, N Tamassia, C Albanesi, W Vermi eMA Cassatella. On the potential involvement of CD11d in co-stimulating the production of interferon-gamma by natural killer cells upon interaction with neutrophils via intercellular adhesion molecule-3. *Haematologica* 2011.96:1543-7.
- Cox-Singh J, J Hiu, SB Lucas, PC Divis, M Zulkarnaen, P Chandran, KT Wong, P Adem, SR Zaki, B Singh eS Krishna. Severe malaria - a case of fatal *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings: a case report. *Malar J* 2010.9:10.
- Cox FE. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit Vectors* 2010.3:5.
- Cserti-Gazdewich CM, A Dhabangi, C Musoke, I Ssewanyana, H Ddungu, D Nakiboneka-Ssenabulya, N Nabukeera-Barungi, A Mpimbaza eWH Dzik. Cytoadherence in paediatric malaria: ABO blood group, CD36, and ICAM1 expression and severe *Plasmodium falciparum* infection. *Br J Haematol* 2012.159:223-36.

- Cunha CB eBA Cunha. Brief history of the clinical diagnosis of malaria: from Hippocrates to Osler. *J Vector Borne Dis* 2008.45:194-9.
- D'Amato C, JPM Torres eO Malm. DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano): Toxicidade e Contaminação Ambiental - Uma Revisão. *Química Nova* 2002.25:995-1002.
- Dalmarco EM, YS Medeiros eTS Frode. Cyclosporin A inhibits CD11a/CD18 adhesion molecules due to inhibition of TNF α and IL-1 beta levels in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan. *Cell Adh Migr* 2008.2:231-5.
- Damjanovic D, M Divangahi, K Kugathasan, CL Small, A Zganiacz, EG Brown, CM Hogaboam, J Gauldie eZ Xing. Negative regulation of lung inflammation and immunopathology by TNF- α during acute influenza infection. *Am J Pathol* 2011.179:2963-76.
- Danilenko DM, PV Rossitto, M Van der Vieren, H Le Trong, SP McDonough, VK Affolter ePF Moore. A novel canine leukointegrin, alpha d beta 2, is expressed by specific macrophage subpopulations in tissue and a minor CD8⁺ lymphocyte subpopulation in peripheral blood. *J Immunol* 1995.155:35-44.
- Day NP, TT Hien, T Schollaardt, PP Loc, LV Chuong, TT Chau, NT Mai, NH Phu, DX Sinh, NJ White eM Ho. The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. *J Infect Dis* 1999.180:1288-97.
- de Souza JB, M Runglall, PH Corran, LC Okell, S Kumar, DC Gowda, KN Couper eEM Riley. Neutralization of malaria glycosylphosphatidylinositol in vitro by serum IgG from malaria-exposed individuals. *Infect Immun* 2010.78:3920-9.
- del Portillo HA, C Fernandez-Becerra, S Bowman, K Oliver, M Preuss, CP Sanchez, NK Schneider, JM Villalobos, MA Rajandream, D Harris, LH Pereira da Silva, B Barrell eM Lanzer. A superfamily of variant genes encoded in the subtelomeric region of *Plasmodium vivax*. *Nature* 2001.410:839-42.
- Deshpande P eP Shastry. Modulation of cytokine profiles by malaria pigment--hemozoin: role of IL-10 in suppression of proliferative responses of mitogen stimulated human PBMC. *Cytokine* 2004.28:205-13.
- Diouf I, N Fievet, S Doucoure, M Ngom, M Andrieu, JF Mathieu, A Gaye, OT Thiaw eP Deloron. IL-12 producing monocytes and IFN- γ and TNF- α producing T-lymphocytes are increased in placentas infected by *Plasmodium falciparum*. *J Reprod Immunol* 2007.74:152-62.
- el-Gabalawy H, J Canvin, GM Ma, M Van der Vieren, P Hoffman, M Gallatin eJ Wilkins. Synovial distribution of alpha d/CD18, a novel leukointegrin. Comparison with other integrins and their ligands. *Arthritis Rheum* 1996.39:1913-21.

- Elangbam CS, CW Qualls, Jr. eRR Dahlgren. Cell adhesion molecules--update. *Vet Pathol* 1997.34:61-73.
- Engwerda C, E Belnoue, AC Gruner eL Renia. Experimental models of cerebral malaria. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005.297:103-43.
- Epiphanio S, MG Campos, A Pamplona, D Carapau, AC Pena, R Ataide, CA Monteiro, N Felix, A Costa-Silva, CR Marinho, S Dias eMM Mota. VEGF promotes malaria-associated acute lung injury in mice. *PLoS Pathog* 2010.6:e1000916.
- Esposito S, CG Molteni, A Zampiero, E Baggi, A Lavizzari, M Semino, C Daleno, M Groppo, A Scala, L Terranova, M Miozzo, C Pelucchi eN Principi. Role of polymorphisms of toll-like receptor (TLR) 4, TLR9, toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein (TIRAP) and FCGR2A genes in malaria susceptibility and severity in Burundian children. *Malar J* 2012.11:196.
- Faille D, V Combes, AJ Mitchell, A Fontaine, I Juhan-Vague, MC Alessi, G Chimini, T Fusai eGE Grau. Platelet microparticles: a new player in malaria parasite cytoadherence to human brain endothelium. *FASEB J* 2009.23:3449-58.
- Fang Y, Y Chen eS Ge. [The effect of PMN adhesion mediated by CD11b/CD18 on the increasing permeability of microvascular endothelial monolayer after severe burn injury]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 1998.78:746-8.
- Fatih FA, A Siner, A Ahmed, LC Woon, AG Craig, B Singh, S Krishna eJ Cox-Singh. Cytoadherence and virulence - the case of Plasmodium knowlesi malaria. *Malar J* 2012.11:33.
- Feldman RM eC Singer. Noncardiogenic pulmonary edema and pulmonary fibrosis in falciparum malaria. *Rev Infect Dis* 1987.9:134-9.
- Figueiredo RT, PL Fernandez, DS Mourao-Sa, BN Porto, FF Dutra, LS Alves, MF Oliveira, PL Oliveira, AV Graca-Souza eMT Bozza. Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2007.282:20221-9.
- França TCC, MG dos Santos eJD Figueroa-Villar. MALÁRIA: ASPECTOS HISTÓRICOS E QUIMIOTERAPIA. *Quimica Nova* 2008.31:1271-78.
- Franke-Fayard B, J Fonager, A Braks, SM Khan eCJ Janse. Sequestration and tissue accumulation of human malaria parasites: can we learn anything from rodent models of malaria? *PLoS Pathog* 2010.6:e1001032.
- Franke-Fayard B, CJ Janse, M Cunha-Rodrigues, J Ramesar, P Buscher, I Que, C Lowik, PJ Voshol, MA den Boer, SG van Duinen, M Febbraio, MM Mota eAP Waters. Murine malaria parasite sequestration: CD36 is the major receptor, but cerebral pathology is unlinked to sequestration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005.102:11468-73.

- Franklin BS, SO Rodrigues, LR Antonelli, RV Oliveira, AM Goncalves, PA Sales-Junior, EP Valente, JI Alvarez-Leite, C Ropert, DT Golenbock eRT Gazzinelli. MyD88-dependent activation of dendritic cells and CD4(+) T lymphocytes mediates symptoms, but is not required for the immunological control of parasites during rodent malaria. *Microbes Infect* 2007.9:881-90.
- Fu Y, Y Ding, T Zhou, X Fu eW Xu. Plasmodium yoelii blood-stage primes macrophage-mediated innate immune response through modulation of toll-like receptor signalling. *Malar J* 2012.11:104.
- Gachot B, M Wolff, G Nissack, B Veber eF Vachon. Acute lung injury complicating imported Plasmodium falciparum malaria. *Chest* 1995.108:746-9.
- Gahmberg CG, L Valmu, S Fagerholm, P Kotovuori, E Ihanus, L Tian eT Pessa-Morikawa. Leukocyte integrins and inflammation. *Cell Mol Life Sci* 1998.54:549-55.
- Garcia LS. Malaria. *Clin Lab Med* 2010.30:93-129.
- Gaur D eCE Chitnis. Molecular interactions and signaling mechanisms during erythrocyte invasion by malaria parasites. *Curr Opin Microbiol* 2011.14:422-8.
- Gazit Y, A Mory, A Etzioni, M Frydman, O Scheuerman, R Gershoni-Baruch eBZ Garty. Leukocyte adhesion deficiency type II: long-term follow-up and review of the literature. *J Clin Immunol* 2010.30:308-13.
- Gerardin P, C Rogier, AS Ka, P Jouvencel, B Diatta eP Imbert. Outcome of life-threatening malaria in African children requiring endotracheal intubation. *Malar J* 2007.6:51.
- Giribaldi G, M Prato, D Ulliers, V Gallo, E Schwarzer, OB Akide-Ndunge, E Valente, S Saviozzi, RA Calogero eP Arese. Involvement of inflammatory chemokines in survival of human monocytes fed with malarial pigment. *Infect Immun* 2010.78:4912-21.
- Golias C, A Batistatou, G Bablekos, A Charalabopoulos, D Peschos, P Mitsopoulos eK Charalabopoulos. Physiology and Pathophysiology of Selectins, Integrins, and IgSf Cell Adhesion Molecules Focusing on Inflammation. A Paradigm Model on Infectious Endocarditis. *Cell Commun Adhes* 2011.18:19-32.
- Grau GE, CD Mackenzie, RA Carr, M Redard, G Pizzolato, C Allasia, C Cataldo, TE Taylor eME Molyneux. Platelet accumulation in brain microvessels in fatal pediatric cerebral malaria. *J Infect Dis* 2003.187:461-6.
- Grau GE, F Tacchini-Cottier, C Vesin, G Milon, JN Lou, PF Piguet eP Juillard. TNF-induced microvascular pathology: active role for platelets and importance of the LFA-1/ICAM-1 interaction. *Eur Cytokine Netw* 1993.4:415-9.

- Grayson MH, M Van der Vieren, SA Sterbinsky, W Michael Gallatin, PA Hoffman, DE Staunton eBS Bochner. alphadbeta2 integrin is expressed on human eosinophils and functions as an alternative ligand for vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). *J Exp Med* 1998.188:2187-91.
- Greene JA, N Sam-Agudu, CC John, RO Opoka, PA Zimmerman eJW Kazura. Toll-like receptor polymorphisms and cerebral malaria: TLR2 Delta22 polymorphism is associated with protection from cerebral malaria in a case control study. *Malar J* 2012.11:47.
- Gris D, DR Marsh, MA Oatway, Y Chen, EF Hamilton, GA Dekaban eLC Weaver. Transient blockade of the CD11d/CD18 integrin reduces secondary damage after spinal cord injury, improving sensory, autonomic, and motor function. *J Neurosci* 2004.24:4043-51.
- Gueirard P, J Tavares, S Thiberge, F Bernex, T Ishino, G Milon, B Franke-Fayard, CJ Janse, R Menard eR Amino. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010.107:18640-5.
- Guidot DM, HG Folkesson, L Jain, JI Sznajder, JF Pittet eMA Matthay. Integrating acute lung injury and regulation of alveolar fluid clearance. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006.291:L301-6.
- Hagau N, A Slavcovici, DN Gonganau, S Oltean, DS Dirzu, ES Brezozski, M Maxim, C Ciuce, M Mlesnite, RL Gavrus, C Laslo, R Hagau, M Petrescu eDM Studnicska. Clinical aspects and cytokine response in severe H1N1 influenza A virus infection. *Crit Care* 2010.14:R203.
- Hanna S eA Etzioni. Leukocyte adhesion deficiencies. *Ann N Y Acad Sci* 2012.1250:50-5.
- Hansen DS, MC D'Ombrian eL Schofield. The role of leukocytes bearing Natural Killer Complex receptors and Killer Immunoglobulin-like Receptors in the immunology of malaria. *Curr Opin Immunol* 2007.19:416-23.
- Harris ES, TM McIntyre, SM Prescott eGA Zimmerman. The leukocyte integrins. *J Biol Chem* 2000.275:23409-12.
- Haydoura S, O Mazboudi, K Charafeddine, I Bouakl, TA Baban, AT Taher eSS Kanj. Transfusion-related Plasmodium ovale malaria complicated by acute respiratory distress syndrome (ARDS) in a non-endemic country. *Parasitol Int* 2010.60:114-6.
- Hensmann M eD Kwiatkowski. Cellular basis of early cytokine response to Plasmodium falciparum. *Infect Immun* 2001.69:2364-71.

- Hiekkanen T, K Skogberg eV Pettila. Evolution of plasma proinflammatory cytokines in malaria-related ARDS treated with corticosteroids. *Intensive Care Med* 2001.27:1823-4.
- Hill AV. Vaccines against malaria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2011.366:2806-14.
- Hisada T, PG Hellewell, MM Teixeira, MG Malm, M Salmon, TJ Huang eKF Chung. α 4 integrin-dependent eotaxin induction of bronchial hyperresponsiveness and eosinophil migration in interleukin-5 transgenic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999.20:992-1000.
- Hu P eBH Luo. Integrin bidirectional signaling across the plasma membrane. *J Cell Physiol* 2012.
- Hu X, JE Wohler, KJ Dugger eSR Barnum. β 2-integrins in demyelinating disease: not adhering to the paradigm. *J Leukoc Biol* 2010.87:397-403.
- Hughes KR, GA Biagini eAG Craig. Continued cytoadherence of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells after antimalarial treatment. *Mol Biochem Parasitol* 2010.169:71-8.
- Hunt NH eGE Grau. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol* 2003.24:491-9.
- Huttenlocher A eAR Horwitz. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011.3:a005074.
- Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002.110:673-87.
- Janes JH, CP Wang, E Levin-Edens, I Vigan-Womas, M Guillotte, M Melcher, O Mercereau-Puijalon eJD Smith. Investigating the host binding signature on the *Plasmodium falciparum* PfEMP1 protein family. *PLoS Pathog* 2011.7:e1002032.
- Jenkins NE, SJ Chakravorty, BC Urban, OK Kai, K Marsh eAG Craig. The effect of *Plasmodium falciparum* infection on expression of monocyte surface molecules. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006a.100:1007-12.
- Jenkins RG, X Su, G Su, CJ Scotton, E Camerer, GJ Laurent, GE Davis, RC Chambers, MA Matthay eD Sheppard. Ligation of protease-activated receptor 1 enhances α (v) β 6 integrin-dependent TGF- β activation and promotes acute lung injury. *J Clin Invest* 2006b.116:1606-14.
- Jin RB, PF Zhu, ZG Wang, DW Liu eJH Zhou. Changes of pulmonary intercellular adhesion molecule-1 and CD11b/CD18 in peripheral polymorphonuclear neutrophils and their significance at the early stage of burns. *Chin J Traumatol* 2003.6:156-9.

- John GK, NM Douglas, L von Seidlein, F Nosten, KJ Baird, NJ White eRN Price. Primaquine radical cure of *Plasmodium vivax*: a critical review of the literature. *Malar J* 2012.11:280.
- Kanwar S, CW Smith, FR Shardonofsky eAR Burns. The role of Mac-1 (CD11b/CD18) in antigen-induced airway eosinophilia in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001.25:170-7.
- Kawakami K, J Kadota, K Iida, T Fujii, R Shirai, Y Matsubara eS Kohno. Phenotypic characterization of T cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and peripheral blood of patients with diffuse panbronchiolitis; the importance of cytotoxic T cells. *Clin Exp Immunol* 1997.107:410-6.
- Keller CC, O Yamo, C Ouma, JM Ong'echa, D Ounah, JB Hittner, JM Vulule eDJ Perkins. Acquisition of hemozoin by monocytes down-regulates interleukin-12 p40 (IL-12p40) transcripts and circulating IL-12p70 through an IL-10-dependent mechanism: in vivo and in vitro findings in severe malarial anemia. *Infect Immun* 2006.74:5249-60.
- Krafts K, E Hempelmann eA Skorska-Stania. From methylene blue to chloroquine: a brief review of the development of an antimalarial therapy. *Parasitol Res* 2012.
- Krauss K eP Altevogt. Integrin leukocyte function-associated antigen-1-mediated cell binding can be activated by clustering of membrane rafts. *J Biol Chem* 1999.274:36921-7.
- Krishnegowda G, AM Hajjar, J Zhu, EJ Douglass, S Uematsu, S Akira, AS Woods eDC Gowda. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem* 2005.280:8606-16.
- Kucik DF, ML Dustin, JM Miller eEJ Brown. Adhesion-activating phorbol ester increases the mobility of leukocyte integrin LFA-1 in cultured lymphocytes. *J Clin Invest* 1996.97:2139-44.
- Kumar S, NM Gowda, X Wu, RN Gowda eDC Gowda. CD36 modulates proinflammatory cytokine responses to *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositols and merozoites by dendritic cells. *Parasite Immunol* 2012.34:372-82.
- Kumar S, M Melzer, P Dodds, J Watson eR Ord. *P. vivax* malaria complicated by shock and ARDS. *Scand J Infect Dis* 2007.39:255-6.
- Kumaratilake LM, DA Rathjen, P Mack, F Widmer, V Prasertsiriroj eA Ferrante. A synthetic tumor necrosis factor-alpha agonist peptide enhances human polymorphonuclear leukocyte-mediated killing of *Plasmodium falciparum* in vitro and suppresses *Plasmodium chabaudi* infection in mice. *J Clin Invest* 1995.95:2315-23.

- Kurtzhals JA, V Adabayeri, BQ Goka, BD Akanmori, JO Oliver-Commey, FK Nkrumah, C Behr eL Hviid. Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. *Lancet* 1998.351:1768-72.
- Lacerda MV, SC Fragoso, MG Alecrim, MA Alexandre, BM Magalhaes, AM Siqueira, LC Ferreira, JR Araujo, MP Mourao, M Ferrer, P Castillo, L Martin-Jaular, C Fernandez-Becerra, H Del Portillo, J Ordi, PL Alonso eQ Bassat. Postmortem Characterization of Patients With Clinical Diagnosis of *Plasmodium vivax* Malaria: To What Extent Does This Parasite Kill? *Clin Infect Dis* 2012a.55:e67-74.
- Lacerda MV, MP Mourao, MA Alexandre, AM Siqueira, BM Magalhaes, FE Martinez-Espinosa, FS Filho, P Brasil, AM Ventura, MS Tada, VS Couto, AR Silva, RS Silva eMG Alecrim. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malar J* 2012b.11:12.
- Lacerda MV, MP Mourao, HC Coelho eJB Santos. Thrombocytopenia in malaria: who cares? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011.106 Suppl 1:52-63.
- LaCrue AN, M Scheel, K Kennedy, N Kumar eDE Kyle. Effects of artesunate on parasite recrudescence and dormancy in the rodent malaria model *Plasmodium vinckei*. *PLoS One* 2011.6:e26689.
- Langhorne J, FM Ndungu, AM Sponaas eK Marsh. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat Immunol* 2008.9:725-32.
- Lee JO, LA Bankston, MA Arnaout eRC Liddington. Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? *Structure* 1995a.3:1333-40.
- Lee JO, P Rieu, MA Arnaout eR Liddington. Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell* 1995b.80:631-8.
- Li C, E Seixas eJ Langhorne. Rodent malarial: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite. *Med Microbiol Immunol* 2001.189:115-26.
- Li J, S Pattaradilokrat, F Zhu, H Jiang, S Liu, L Hong, Y Fu, L Koo, W Xu, W Pan, JM Carlton, O Kaneko, R Carter, JC Wootton eXZ Su. Linkage maps from multiple genetic crosses and loci linked to growth-related virulent phenotype in *Plasmodium yoelii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011.108:E374-82.
- Li R, P Rieu, DL Griffith, D Scott eMA Arnaout. Two functional states of the CD11b A-domain: correlations with key features of two Mn²⁺-complexed crystal structures. *J Cell Biol* 1998.143:1523-34.

- Li ZP, JF Hu, MN Sun, HJ Ji, SF Chu, G Liu eNH Chen. Anti-inflammatory effect of IMMLG5521, a coumarin derivative, on Sephadex-induced lung inflammation in rats. *Int Immunopharmacol* 2012.
- Lindner SE, JL Miller eSH Kappe. Malaria parasite pre-erythrocytic infection: preparation meets opportunity. *Cell Microbiol* 2011.14:316-24.
- Lindner SE, JL Miller eSH Kappe. Malaria parasite pre-erythrocytic infection: preparation meets opportunity. *Cell Microbiol* 2012.14:316-24.
- Loftus JC eRC Liddington. Cell adhesion in vascular biology. New insights into integrin-ligand interaction. *J Clin Invest* 1997.99:2302-6.
- Loharungsikul S, M Troye-Blomberg, P Amoudruz, S Pichyangkul, K Yongvanitchit, S Looareesuwan, Y Mahakunkijcharoen, S Sarntivijai eS Khusmith. Expression of toll-like receptors on antigen-presenting cells in patients with falciparum malaria. *Acta Trop* 2008.105:10-5.
- Lomar AV, JE Vidal, FP Lomar, CV Barbas, GJ de Matos eM Boulos. Acute respiratory distress syndrome due to vivax malaria: case report and literature review. *Braz J Infect Dis* 2005.9:425-30.
- Lou J, R Lucas eGE Grau. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clin Microbiol Rev* 2001.14:810-20, table of contents.
- Lovegrove FE, SA Gharib, L Pena-Castillo, SN Patel, JT Ruzinski, TR Hughes, WC Liles eKC Kain. Parasite burden and CD36-mediated sequestration are determinants of acute lung injury in an experimental malaria model. *PLoS Pathog* 2008.4:e1000068.
- Lozano F, M Leal, E Lissen, J Munoz, A Bautista eC Regordan. [*P. falciparum* and *P. malariae* malaria complicated by pulmonary edema with disseminated intravascular coagulation]. *Presse Med* 1983.12:3004-5.
- Luty AJ, B Lell, R Schmidt-Ott, LG Lehman, D Luckner, B Greve, P Matousek, K Herbich, D Schmid, F Migot-Nabias, P Deloron, RS Nussenzweig ePG Kremsner. Interferon-gamma responses are associated with resistance to reinfection with *Plasmodium falciparum* in young African children. *J Infect Dis* 1999.179:980-8.
- Lyke KE, R Burges, Y Cissoko, L Sangare, M Dao, I Diarra, A Kone, R Harley, CV Plowe, OK Doumbo eMB Sztein. Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. *Infect Immun* 2004.72:5630-7.

- Mabon PJ, LC Weaver eGA Dekaban. Inhibition of monocyte/macrophage migration to a spinal cord injury site by an antibody to the integrin alphaD: a potential new anti-inflammatory treatment. *Exp Neurol* 2000.166:52-64.
- MacPherson GG, MJ Warrell, NJ White, S Looareesuwan eDA Warrell. Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am J Pathol* 1985.119:385-401.
- Majori G. Short history of malaria and its eradication in Italy with short notes on the fight against the infection in the mediterranean basin. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2012.4:e2012016.
- Margadant C, HN Monsuur, JC Norman eA Sonnenberg. Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Curr Opin Cell Biol* 2011.23:607-14.
- Marinho CR, R Neres, S Epiphonio, LA Goncalves, MB Catarino eC Penha-Goncalves. Recrudescence of *Plasmodium berghei* from pregnant mice displays enhanced binding to the placenta and induces protection in multigravida. *PLoS One* 2009.4:e5630.
- Markus MB. The hypnozoite concept, with particular reference to malaria. *Parasitol Res* 2010.108:247-52.
- Marsh K eRW Snow. Host-parasite interaction and morbidity in malaria endemic areas. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1997.352:1385-94.
- Martin TR. Lung cytokines and ARDS: Roger S. Mitchell Lecture. *Chest* 1999.116:2S-8S.
- Martins YC, MJ Smith, M Pelajo-Machado, GL Werneck, HL Lenzi, CT Daniel-Ribeiro eLJ Carvalho. Characterization of cerebral malaria in the outbred Swiss Webster mouse infected by *Plasmodium berghei* ANKA. *Int J Exp Pathol* 2009.90:119-30.
- McGilvray ID, L Serghides, A Kapus, OD Rotstein eKC Kain. Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance. *Blood* 2000.96:3231-40.
- McGuire W, AV Hill, CE Allsopp, BM Greenwood eD Kwiatkowski. Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 1994.371:508-10.
- McKillop WM, JW Barrett, SH Pasternak, BM Chan eGA Dekaban. The extracellular domain of CD11d regulates its cell surface expression. *J Leukoc Biol* 2009.86:851-62.
- Menard R, V Heussler, M Yuda eV Nussenzweig. *Plasmodium* pre-erythrocytic stages: what's new? *Trends Parasitol* 2008.24:564-9.
- Mercereau-Puijalon O eD Menard. *Plasmodium vivax* and the Duffy antigen: a paradigm revisited. *Transfus Clin Biol* 2010.17:176-83.

- Metenou S, M Kovacs, B Dembele, YI Coulibaly, AD Klion eTB Nutman. Interferon regulatory factor modulation underlies the bystander suppression of malaria antigen-driven IL-12 and IFN-gamma in filaria-malaria co-infection. *Eur J Immunol* 2012.42:641-50.
- Meyer KC, JE Klatter, HV Dinh, MJ Harries, K Reithmayer, W Meyer, R Sinclair eR Paus. Evidence that the bulge region is a site of relative immune privilege in human hair follicles. *Br J Dermatol* 2008.159:1077-85.
- Miller LH, DI Baruch, K Marsh eOK Doumbo. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 2002.415:673-9.
- Milne AA ePJ Piper. The effects of two anti-CD18 antibodies on antigen-induced airway hyperresponsiveness and leukocyte accumulation in the guinea pig. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994.11:337-43.
- Miyazaki Y, M Bunting, DM Stafforini, ES Harris, TM McIntyre, SM Prescott, VS Frutuoso, FC Amendoeira, D de Oliveira Nascimento, A Vieira-de-Abreu, AS Weyrich, HC Castro-Faria-Neto eGA Zimmerman. Integrin alphaDbeta2 is dynamically expressed by inflamed macrophages and alters the natural history of lethal systemic infections. *J Immunol* 2008.180:590-600.
- Mo M, HC Lee, M Kotaka, M Niang, X Gao, JK Iyer, J Lescar eP Preiser. The C-terminal segment of the cysteine-rich interdomain of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 determines CD36 binding and elicits antibodies that inhibit adhesion of parasite-infected erythrocytes. *Infect Immun* 2008.76:1837-47.
- Mohan A, SK Sharma eS Bollineni. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in malaria. *J Vector Borne Dis* 2008.45:179-93.
- Muniz-Junqueira MI, LL dos Santos-Neto eCE Tosta. Influence of tumor necrosis factor-alpha on the ability of monocytes and lymphocytes to destroy intraerythrocytic Plasmodium falciparum in vitro. *Cell Immunol* 2001.208:73-9.
- Naik RS, OH Branch, AS Woods, M Vijaykumar, DJ Perkins, BL Nahlen, AA Lal, RJ Cotter, CE Costello, CF Ockenhouse, EA Davidson eDC Gowda. Glycosylphosphatidylinositol anchors of Plasmodium falciparum: molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis. *J Exp Med* 2000.192:1563-76.
- Niikura M, S Inoue eF Kobayashi. Role of interleukin-10 in malaria: focusing on coinfection with lethal and nonlethal murine malaria parasites. *J Biomed Biotechnol* 2011.2011:383962.

- Noti JD. Expression of the myeloid-specific leukocyte integrin gene CD11d during macrophage foam cell differentiation and exposure to lipoproteins. *Int J Mol Med* 2002.10:721-7.
- Nti BK, JL Slingsluff, CC Keller, JB Hittner, JM Ong'echa, M Murphey-Corb eDJ Perkins. Stage-specific effects of *Plasmodium falciparum*-derived hemozoin on blood mononuclear cell TNF-alpha regulation and viral replication. *AIDS* 2005.19:1771-80.
- Oakley MS, V Majam, B Mahajan, N Gerald, V Anantharaman, JM Ward, LJ Faucette, TF McCutchan, H Zheng, M Terabe, JA Berzofsky, L Aravind eS Kumar. Pathogenic roles of CD14, galectin-3, and OX40 during experimental cerebral malaria in mice. *PLoS One* 2009.4:e6793.
- Oatway MA, Y Chen, JC Bruce, GA Dekaban eLC Weaver. Anti-CD11d integrin antibody treatment restores normal serotonergic projections to the dorsal, intermediate, and ventral horns of the injured spinal cord. *J Neurosci* 2005.25:637-47.
- Ochiel DO, GA Awandare, CC Keller, JB Hittner, PG Kremsner, JB Weinberg eDJ Perkins. Differential regulation of beta-chemokines in children with *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* 2005.73:4190-7.
- Ogonda LA, AS Orago, MF Otieno, C Adhiambo, W Otieno eJA Stoute. The levels of CD16/Fc gamma receptor IIIA on CD14+ CD16+ monocytes are higher in children with severe *Plasmodium falciparum* anemia than in children with cerebral or uncomplicated malaria. *Infect Immun* 2010.78:2173-81.
- OMS OMdS-. chapter 7 Impact of malaria control. www.who.int/entity/malaria/world_malaria_report_2011/WMR2011_chapter7.pdf 2011a.
- OMS OMdS-. Malaria. www.who.int/mediacenter/factsheets/fs094/en/ 2011b.
- OMS OMdS. Guidelines for the treatment of malaria. 2010.second edition:1-194.
- Palframan RT, PD Collins, NJ Severs, S Rothery, TJ Williams eSM Rankin. Mechanisms of acute eosinophil mobilization from the bone marrow stimulated by interleukin 5: the role of specific adhesion molecules and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Exp Med* 1998.188:1621-32.
- Pardi R, JR Bender, C Dettori, E Giannazza eEG Engleman. Heterogeneous distribution and transmembrane signaling properties of lymphocyte function-associated antigen (LFA-1) in human lymphocyte subsets. *J Immunol* 1989.143:3157-66.
- Parmley LA, ND Elkins, MA Fini, YE Liu, JE Repine eRM Wright. Alpha-4/beta-1 and alpha-L/beta-2 integrins mediate cytokine induced lung leukocyte-epithelial adhesion and injury. *Br J Pharmacol* 2007.152:915-29.

- Pelaquini EH, A Guimaraes Lde, LR Benetti, LG Fernandes, WM Tamashiro, N Conran eHH Ferreira. Role of the Mac-1 and VLA-4 integrins, and concomitant Th2-cytokine production, in nitric oxide modulated eosinophil migration from bone marrow to lungs in allergic mice. *Int Immunopharmacol* 2010.11:204-11.
- Perkins DJ, JB Weinberg ePG Kreamsner. Reduced interleukin-12 and transforming growth factor-beta1 in severe childhood malaria: relationship of cytokine balance with disease severity. *J Infect Dis* 2000.182:988-92.
- Petruzzelli L, L Maduzia eTA Springer. Differential requirements for LFA-1 binding to ICAM-1 and LFA-1-mediated cell aggregation. *J Immunol* 1998.160:4208-16.
- Piguet PF, C Da Laperrousaz, C Vesin eY Donati. Incidence of apoptosis in the lymphoid organs of normal or malaria infected mice is decreased in CD18 and urokinase-receptor (UPAR, CD87) deficient mice. *Dev Immunol* 2001.8:183-91.
- Pisell TL, IF Hoffman, CS Jere, SB Ballard, ME Molyneux, ST Butera eSD Lawn. Immune activation and induction of HIV-1 replication within CD14 macrophages during acute *Plasmodium falciparum* malaria coinfection. *AIDS* 2002.16:1503-9.
- Polimeni M, E Valente, E Aldieri, A Khadjavi, G Giribaldi eM Prato. Haemozoin Induces Early Cytokine-Mediated Lysozyme Release from Human Monocytes through p38 MAPK- and NF-kappaB- Dependent Mechanisms. *PLoS One* 2012.7:e39497.
- Price L, T Planche, C Rayner eS Krishna. Acute respiratory distress syndrome in *Plasmodium vivax* malaria: case report and review of the literature. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007.101:655-9.
- Puneet P, S Mochhala eM Bhatia. Chemokines in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005.288:L3-15.
- Quelhas D, L Puyol, L Quinto, T Nhampossa, E Serra-Casas, E Macete, P Aide, S Sanz, JJ Aponte, DL Doolan, PL Alonso, C Menendez eC Dobano. Intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine does not modify plasma cytokines and chemokines or intracellular cytokine responses to *Plasmodium falciparum* in Mozambican children. *BMC Immunol* 2012.13:5.
- Rajput R, H Singh, S Singh, Meena eUC Tiwari. Pulmonary manifestations in malaria. *J Indian Med Assoc* 2000.98:612-4.
- Randall LM, FH Amante, KA McSweeney, Y Zhou, AC Stanley, A Haque, MK Jones, GR Hill, GM Boyle eCR Engwerda. Common strategies to prevent and modulate experimental cerebral malaria in mouse strains with different susceptibilities. *Infect Immun* 2008.76:3312-20.

- Randall LM eCR Engwerda. TNF family members and malaria: old observations, new insights and future directions. *Exp Parasitol* 2010.126:326-31.
- Ravi Chandra B, R Gowthaman, R Raj Akhouri, D Gupta eA Sharma. Distribution of proline-rich (PxxP) motifs in distinct proteomes: functional and therapeutic implications for malaria and tuberculosis. *Protein Eng Des Sel* 2004.17:175-82.
- Reiss LK, U Uhlig eS Uhlig. Models and mechanisms of acute lung injury caused by direct insults. *Eur J Cell Biol* 2012.91:590-601.
- Rey L. *Parasitologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2008.4º:833.
- Roport C, BS Franklin eRT Gazzinelli. Role of TLRs/MyD88 in host resistance and pathogenesis during protozoan infection: lessons from malaria. *Semin Immunopathol* 2008.30:41-51.
- Rovira-Vallbona E, G Moncunill, Q Bassat, R Aguilar, S Machevo, L Puyol, L Quinto, C Menendez, CE Chitnis, PL Alonso, C Dobano eA Mayor. Low antibodies against *Plasmodium falciparum* and imbalanced pro-inflammatory cytokines are associated with severe malaria in Mozambican children: a case-control study. *Malar J* 2012.11:181.
- Ryg-Cornejo V, CQ Nie, NJ Bernard, RJ Lundie, KJ Evans, BS Crabb, L Schofield eDS Hansen. NK cells and conventional dendritic cells engage in reciprocal activation for the induction of inflammatory responses during *Plasmodium berghei* ANKA infection. *Immunobiology* 2012.
- Sadhu C, HJ Ting, B Lipsky, K Hensley, LF Garcia-Martinez, SI Simon eDE Staunton. CD11c/CD18: novel ligands and a role in delayed-type hypersensitivity. *J Leukoc Biol* 2007.81:1395-403.
- Sanchez-Madrid F eMA del Pozo. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J* 1999.18:501-11.
- Sarkar S, K Saha eCS Das. Three cases of ARDS: An emerging complication of *Plasmodium vivax* malaria. *Lung India* 2010.27:154-7.
- Saúde Md. Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária - PNCM. 2003.
- Saúde Md. Manual de diagnóstico laboratorial de malária 2009.2a. edição:116.
- Saville LR, CH Pospisil, LA Mawhinney, F Bao, FC Simeanea, AA Peters, PJ O'Connell, LC Weaver eGA Dekaban. A monoclonal antibody to CD11d reduces the inflammatory infiltrate into the injured spinal cord: a potential neuroprotective treatment. *J Neuroimmunol* 2004.156:42-57.

- Schmid MC, CJ Avraamides, P Foubert, Y Shaked, SW Kang, RS Kerbel eJA Varner. Combined blockade of integrin $\alpha_4\beta_1$ plus cytokines SDF-1 α or IL-1 β potently inhibits tumor inflammation and growth. *Cancer Res* 2011.
- Schneeberger EE, Q Vu, BW LeBlanc eCM Doerschuk. The accumulation of dendritic cells in the lung is impaired in CD18 $^{-/-}$ but not in ICAM-1 $^{-/-}$ mutant mice. *J Immunol* 2000.164:2472-8.
- Schofield L. Intravascular infiltrates and organ-specific inflammation in malaria pathogenesis. *Immunol Cell Biol* 2007.85:130-7.
- Schofield L eGE Grau. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol* 2005.5:722-35.
- Schofield L eF Hackett. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J Exp Med* 1993.177:145-53.
- Schofield L, S Novakovic, P Gerold, RT Schwarz, MJ McConville eSD Tachado. Glycosylphosphatidylinositol toxin of Plasmodium up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite cytoadherence via tyrosine kinase-dependent signal transduction. *J Immunol* 1996.156:1886-96.
- Schwarze J, G Cieslewicz, E Hamelmann, A Joetham, LD Shultz, MC Lamers eEW Gelfand. IL-5 and eosinophils are essential for the development of airway hyperresponsiveness following acute respiratory syncytial virus infection. *J Immunol* 1999.162:2997-3004.
- Schwarzer E, M Alessio, D Ulliers eP Arese. Phagocytosis of the malarial pigment, hemozoin, impairs expression of major histocompatibility complex class II antigen, CD54, and CD11c in human monocytes. *Infect Immun* 1998.66:1601-6.
- Schwarzer E, F Turrini, D Ulliers, G Giribaldi, H Ginsburg eP Arese. Impairment of macrophage functions after ingestion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes or isolated malarial pigment. *J Exp Med* 1992.176:1033-41.
- Scorza T, S Magez, L Brys eP De Baetselier. Hemozoin is a key factor in the induction of malaria-associated immunosuppression. *Parasite Immunol* 1999.21:545-54.
- Shanley TP, RL Warner, LD Crouch, GN Dietsch, DL Clark, MM O'Brien, WM Gallatin ePA Ward. Requirements for alpha d in IgG immune complex-induced rat lung injury. *J Immunol* 1998.160:1014-20.
- Shen B, MK Delaney eX Du. Inside-out, outside-in, and inside-outside-in: G protein signaling in integrin-mediated cell adhesion, spreading, and retraction. *Curr Opin Cell Biol* 2012.

- Sherry BA, G Alava, KJ Tracey, J Martiney, A Cerami eAF Slater. Malaria-specific metabolite hemozoin mediates the release of several potent endogenous pyrogens (TNF, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta) in vitro, and altered thermoregulation in vivo. *J Inflamm* 1995.45:85-96.
- Shi C, X Zhang, Z Chen, K Sulaiman, MW Feinberg, CM Ballantyne, MK Jain eDI Simon. Integrin engagement regulates monocyte differentiation through the forkhead transcription factor Foxp1. *J Clin Invest* 2004.114:408-18.
- Siano JP, KK Grady, P Millet eTM Wick. Short report: Plasmodium falciparum: cytoadherence to alpha(v)beta3 on human microvascular endothelial cells. *Am J Trop Med Hyg* 1998.59:77-9.
- Silva AC, RP Vieira, M Nisiyama, AB Santos, A Perini, T Mauad, M Dolhnikoff, MA Martins eCR Carvalho. Exercise inhibits allergic lung inflammation. *Int J Sports Med* 2012.33:402-9.
- SIVEP SdIdVE. Situação Epidemiológica da Malária na Amazônia. Ministério da Saúde 2011.
- Skerrett SJ, HD Liggitt, AM Hajjar, RK Ernst, SI Miller eCB Wilson. Respiratory epithelial cells regulate lung inflammation in response to inhaled endotoxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004.287:L143-52.
- Skorokhod OA, M Alessio, B Mordmuller, P Arese eE Schwarzer. Hemozoin (malarial pigment) inhibits differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effect. *J Immunol* 2004.173:4066-74.
- Sponaas AM, AP Freitas do Rosario, C Voisine, B Mastelic, J Thompson, S Koernig, W Jarra, L Renia, M Mauduit, AJ Potocnik eJ Langhorne. Migrating monocytes recruited to the spleen play an important role in control of blood stage malaria. *Blood* 2009.114:5522-31.
- Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994.76:301-14.
- Steinmuller M, M Srivastava, WA Kuziel, JW Christman, W Seeger, T Welte, J Lohmeyer eUA Maus. Endotoxin induced peritonitis elicits monocyte immigration into the lung: implications on alveolar space inflammatory responsiveness. *Respir Res* 2006.7:30.
- Stevenson MM eEM Riley. Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol* 2004.4:169-80.
- Stewart MP, A McDowall eN Hogg. LFA-1-mediated adhesion is regulated by cytoskeletal restraint and by a Ca²⁺-dependent protease, calpain. *J Cell Biol* 1998.140:699-707.

- Sturm A, R Amino, C van de Sand, T Regen, S Retzlaff, A Rennenberg, A Krueger, JM Pollok, R Menard eVT Heussler. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* 2006.313:1287-90.
- Sumida S. The expression of adhesion molecules, including CD11a and CD11b, on the human T lymphocyte surface membrane in patients with bronchial asthma. *Kurume Med J* 1995.42:21-32.
- Tachado SD, P Gerold, MJ McConville, T Baldwin, D Quilici, RT Schwarz eL Schofield. Glycosylphosphatidylinositol toxin of Plasmodium induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase C-dependent signaling pathway. *J Immunol* 1996.156:1897-1907.
- Takada Y, X Ye eS Simon. The integrins. *Genome Biol* 2007.8:215.
- Tan LK, S Yacoub, S Scott, S Bhagani eM Jacobs. Acute lung injury and other serious complications of Plasmodium vivax malaria. *Lancet Infect Dis* 2008.8:449-54.
- Taylor BM, KP Kolbasa, JE Chin, IM Richards, WE Fleming, RL Griffin, SF Fidler eFF Sun. Roles of adhesion molecules ICAM-1 and alpha4 integrin in antigen-induced changes in microvascular permeability associated with lung inflammation in sensitized brown Norway rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997.17:757-66.
- Taylor SM, CM Parobek eRM Fairhurst. Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2012.
- Taylor WR, V Canon eNJ White. Pulmonary manifestations of malaria : recognition and management. *Treat Respir Med* 2006.5:419-28.
- Taylor WR eNJ White. Malaria and the lung. *Clin Chest Med* 2002.23:457-68.
- Thomas AP, TN Dunn, PJ Oort, M Grino eSH Adams. Inflammatory phenotyping identifies CD11d as a gene markedly induced in white adipose tissue in obese rodents and women. *J Nutr* 2011.141:1172-80.
- Thumwood CM, NH Hunt, IA Clark eWB Cowden. Breakdown of the blood-brain barrier in murine cerebral malaria. *Parasitology* 1988.96 (Pt 3):579-89.
- Torre D, F Speranza, M Giola, A Matteelli, R Tambini eG Biondi. Role of Th1 and Th2 cytokines in immune response to uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002.9:348-51.
- Torres JR, H Perez, MM Postigo eJR Silva. Acute non-cardiogenic lung injury in benign tertian malaria. *Lancet* 1997.350:31-2.

- Urban BC eDJ Roberts. Malaria, monocytes, macrophages and myeloid dendritic cells: sticking of infected erythrocytes switches off host cells. *Curr Opin Immunol* 2002.14:458-65.
- Utagawa A, HM Bramlett, L Daniels, G Lotocki, GA Dekaban, LC Weaver eWD Dietrich. Transient blockage of the CD11d/CD18 integrin reduces contusion volume and macrophage infiltration after traumatic brain injury in rats. *Brain Res* 2008.1207:155-63.
- Van den Steen PE, N Geurts, K Deroost, I Van Aelst, S Verhenne, H Heremans, J Van Damme eG Opdenakker. Immunopathology and dexamethasone therapy in a new model for malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2010.181:957-68.
- van der Heyde HC, I Gramaglia, G Sun eC Woods. Platelet depletion by anti-CD41 (alphaIIb) mAb injection early but not late in the course of disease protects against *Plasmodium berghei* pathogenesis by altering the levels of pathogenic cytokines. *Blood* 2005.105:1956-63.
- Van der Vieren M, DT Crowe, D Hoekstra, R Vazeux, PA Hoffman, MH Grayson, BS Bochner, WM Gallatin eDE Staunton. The leukocyte integrin alpha D beta 2 binds VCAM-1: evidence for a binding interface between I domain and VCAM-1. *J Immunol* 1999.163:1984-90.
- Van der Vieren M, H Le Trong, CL Wood, PF Moore, T St John, DE Staunton eWM Gallatin. A novel leukointegrin, alpha d beta 2, binds preferentially to ICAM-3. *Immunity* 1995.3:683-90.
- van Zoelen MA, MI Verstege, C Draing, R de Beer, C van't Veer, S Florquin, P Bresser, JS van der Zee, AA te Velde, S von Aulock eT van der Poll. Endogenous MCP-1 promotes lung inflammation induced by LPS and LTA. *Mol Immunol* 2011.48:1468-76.
- Vanderstocken G, B Bondue, M Horckmans, L Di Pietrantonio, B Robaye, JM Boeynaems eD Communi. P2Y2 receptor regulates VCAM-1 membrane and soluble forms and eosinophil accumulation during lung inflammation. *J Immunol* 2010.185:3702-7.
- Vigan-Womas I, M Guillotte, A Juillerat, A Hessel, B Raynal, P England, JH Cohen, O Bertrand, T Peyrard, GA Bentley, A Lewit-Bentley eO Mercereau-Puijalon. Structural basis for the ABO blood-group dependence of *Plasmodium falciparum* rosetting. *PLoS Pathog* 2012.8:e1002781.

- Vijaykumar M, RS Naik eDC Gowda. Plasmodium falciparum glycosylphosphatidylinositol-induced TNF-alpha secretion by macrophages is mediated without membrane insertion or endocytosis. *J Biol Chem* 2001.276:6909-12.
- von Mach MA, T Hansen, W Ehrenthal, O Sauer eLS Weilemann. [Fulminant pulmonary edema in falciparum malaria [corrected]]. *Dtsch Med Wochenschr* 2003.128:874-6.
- Wang H, D Lim eCE Rudd. Immunopathologies linked to integrin signalling. *Semin Immunopathol* 2010.32:173-82.
- Ware LB eMA Matthay. Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2001.163:1376-83.
- Weiss LA, LA Lester, JE Gern, RL Wolf, R Parry, RF Lemanske, J Solway eC Ober. Variation in ITGB3 is associated with asthma and sensitization to mold allergen in four populations. *Am J Respir Crit Care Med* 2005.172:67-73.
- Welbourn R, G Goldman, L Kobzik, IS Paterson, CR Valeri, D Shepro eHB Hechtman. Role of neutrophil adherence receptors (CD 18) in lung permeability following lower torso ischemia. *Circ Res* 1992.71:82-6.
- Wenisch C, H Wenisch, B Parschalk, S Vanijanonta, H Burgmann, M Exner, K Zedwitz-Liebenstein, F Thalhammer, A Georgopoulos, W Graninger eS Looareesuwan. Elevated levels of soluble CD14 in serum of patients with acute Plasmodium falciparum malaria. *Clin Exp Immunol* 1996.105:74-8.
- Whengang Youdom S, A Samson, LK Basco eJC Thalabard. Multiple treatment comparisons in a series of anti-malarials trials with an ordinal primary outcome and repeated treatment evaluations. *Malar J* 2012.11:147.
- White NJ. Qinghaosu (artemisinin): the price of success. *Science* 2008.320:330-4.
- Wiley SR, VS Raman, A Desbien, HR Bailor, R Bhardwaj, AR Shakri, SG Reed, CE Chitnis eD Carter. Targeting TLRs expands the antibody repertoire in response to a malaria vaccine. *Sci Transl Med* 2011.3:93ra69.
- Wong DA, EM Davis, M LeBeau eTA Springer. Cloning and chromosomal localization of a novel gene-encoding a human beta 2-integrin alpha subunit. *Gene* 1996.171:291-4.
- Wu Y, T Szeszak, M Stins eAG Craig. Amplification of P. falciparum Cytoadherence through induction of a pro-adhesive state in host endothelium. *PLoS One* 2011.6:e24784.
- Yakubenko VP, N Belevych, D Mishchuk, A Schurin, SC Lam eTP Ugarova. The role of integrin alpha D beta2 (CD11d/CD18) in monocyte/macrophage migration. *Exp Cell Res* 2008.314:2569-78.

- Yakubenko VP, SP Yadav eTP Ugarova. Integrin alphaDbeta2, an adhesion receptor up-regulated on macrophage foam cells, exhibits multiligand-binding properties. *Blood* 2006.107:1643-50.
- Yamaguchi T, Y Miyata, K Hayamizu, J Hashizume, T Matsumoto, H Tashiro eH Ohdan. Preventive effect of G-CSF on acute lung injury via alveolar macrophage regulation. *J Surg Res* 2012.
- Yamamoto T, O Kajikawa, TR Martin, SR Sharar, JM Harlan eRK Winn. The role of leukocyte emigration and IL-8 on the development of lipopolysaccharide-induced lung injury in rabbits. *J Immunol* 1998.161:5704-9.
- Yang G, J Hamacher, B Gorshkov, R White, S Sridhar, A Verin, T Chakraborty eR Lucas. The Dual Role of TNF in Pulmonary Edema. *J Cardiovasc Dis Res* 2010.1:29-36.
- Ye F, C Kim eMH Ginsberg. Reconstruction of integrin activation. *Blood* 2012.119:26-33.
- Yeh CC, SJ Kao, CC Lin, SD Wang, CJ Liu eST Kao. The immunomodulation of endotoxin-induced acute lung injury by hesperidin in vivo and in vitro. *Life Sci* 2007.80:1821-31.
- Yeo TW, DA Lampah, E Tjitra, K Piera, R Gitawati, E Kenangalem, RN Price eNM Anstey. Greater endothelial activation, Weibel-Palade body release and host inflammatory response to *Plasmodium vivax*, compared with *Plasmodium falciparum*: a prospective study in Papua, Indonesia. *J Infect Dis* 2010.202:109-12.
- Zanini GM, P Cabrales, W Barkho, JA Frangos eLJ Carvalho. Exogenous nitric oxide decreases brain vascular inflammation, leakage and venular resistance during *Plasmodium berghei* ANKA infection in mice. *J Neuroinflammation* 2011.8:66.
- Zhang Y, K Miura, J Li, G Tullo, F Zhu, L Hong, T Lin, XZ Su eC Long. Macrophage migration inhibitory factor homolog from *Plasmodium yoelii* modulates monocyte recruitment and activation in spleen during infection. *Parasitol Res* 2012a.110:1755-63.
- Zhang Y eH Wang. Integrin signalling and function in immune cells. *Immunology* 2012b.135:268-75.
- Zheng W, QH Wang, YJ Liu, J Liu, H Feng, JJ Wu eYM Cao. Distinct host-related dendritic cell responses during the early stage of *Plasmodium yoelii* infection in susceptible and resistant mice. *Parasite Immunol* 2010.32:324-34.
- Zhu X, Y Pan, Y Li, Y Jiang, H Shang, DC Gowda, L Cui eY Cao. Targeting Toll-like receptors by chloroquine protects mice from experimental cerebral malaria. *Int Immunopharmacol* 2012.13:392-7.

