

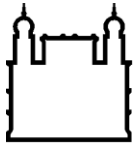
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO LIPOSSOMO-CLODRONATO NO CURSO DA
INFECÇÃO DE PRIMATAS NEOTROPICAIS *Saimiri sciureus*
POR *Plasmodium falciparum***

JANAIARA ARAUJO CUNHA

Rio de Janeiro
Agosto de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

JANAÍARA ARAUJO CUNHA

Avaliação do efeito do lipossomo-clodronato no curso da infecção de primatas neotropicais *Saimiri sciureus* por *Plasmodium falciparum*

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária

Orientadores: Professor Doutor Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro
Professor Doutor Leonardo José de Moura Carvalho

RIO DE JANEIRO

Agosto de 2014

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

C972 Cunha, Janaiara Araujo

Avaliação do efeito do Lipossomo-clodronato no curso da infecção de primatas neotropicais *Saimiri sciureus* por *Plasmodium falciparum* / Janaiara Araujo Cunha. – Rio de Janeiro , 2014.

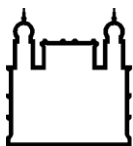
xix, 115 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2014.

Bibliografia: f. 105-112

1. Malária. 2. *Plasmodium falciparum*. 3. *Saimiri sciureus*. 4. Lipossomo-clodronato. 5. Modelo experimental. I. Título.

CDD 616.9362027



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTORA: JANAIARA ARAUJO CUNHA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO LIPOSSOMO-CLODRONATO NO CURSO DA
INFECÇÃO DE PRIMATAS NEOTROPICAIS *Saimiri sciureus*
POR *Plasmodium falciparum***

**ORIENTADORES: Professor Doutor Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro
Professor Doutor Leonardo José de Moura Carvalho**

Aprovada em: 22/08/2014

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Joseli de Oliveira Ferreira - Presidente (IOC-Fiocruz)

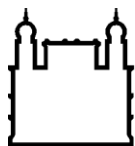
Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto - Membro e revisor (IOC-Fiocruz)

Prof. Dr. Francisco Acácio Alves - Membro (UFPA)

Prof. Dr. Josué da Costa Lima Júnior - Suplente (IOC-Fiocruz)

Prof. Dr. Marcelo Torres Bozza - Suplente (UFRJ)

Rio de Janeiro, 22 de agosto de 2014.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.

**Dedico este trabalho à minha família,
em especial, aos meus pais
Ana Carla e Maurício,
por todo o apoio e incentivo.**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Doutor Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro, por ter acreditado em mim quando o procurei pela primeira vez e ter me admitido em seu laboratório. Agradeço pela oportunidade, pela orientação, pelos ensinamentos e por toda confiança depositada em mim.

Ao meu co-orientador Doutor Leonardo José de Moura Carvalho por todo o apoio, disponibilidade, dedicação, orientação e ensinamentos que me dispensou.

Ao Cesare Bianco Jr., pela sua constante disponibilidade, paciência e amizade e por todo o apoio em todas as etapas experimentais.

À médica veterinária Doutora Márcia Andrade (Centro de Criação de Animais de Laboratório - Cecal) pelo seu bom humor, simpatia, disponibilidade, transmissão de conhecimentos e colaboração nos procedimentos com os animais.

Ao médico veterinário Felipe Resende pela disponibilidade e apoio nos procedimentos com os animais.

Às Doutoras Lilian e Evelyn Pratt Riccio do Laboratório de Pesquisas em Malária (LPM) pela simpatia, disponibilidade, pelos conselhos, bem como pelo apoio valioso durante os ensaios *in vitro*.

Às estagiárias Bárbara Baptista e Vanessa Torres pela generosidade e auxílio durante o ensaio de citocinas.

À equipe do Laboratório de Histotecnologia do IOC, Doutor Marcelo Pelajo, Igor José da Silva, Jéssica Ferro, Luzia Caputo, Pedro Paulo, Yuli Maia e Everton Rodrigues pela colaboração com os procedimentos de histopatologia, pelas horas agradáveis e pela grande disposição em ajudar.

À equipe do Centro de Criação de Animais de Laboratório (Cecal)/ IOC, na pessoa da diretora, a Doutora Carla Campos, e à equipe do Serviço de Primatologia do IOC, na pessoa dos chefes, Fábio Silva e Markus Juno, por todo o apoio e pelo fornecimento de animais.

Aos técnicos do contêiner de experimentação em primatas, Maurílio, Marcos, Paulo e Maria Alice pela paciência e auxílio durante os procedimentos com os animais.

À Doutora Fátima Cruz por sua simpatia, objetividade e auxílio sempre que eu recorria à ela.

Ao Doutor Paulo Totino pelo apoio, pelas sugestões e pelos conselhos.

Aos amigos que fazem ou já fizeram parte do LPM, Aline Moreira, Beatriz Moraes, Caroline Gress, Elsa Daniel, Laetitia Pellicer, Larissa Gomes, Luana Santos, Nathália Ketrin, Paulo, Raquel Curtinhas, Suellen, pelo companheirismo, incentivo e solidariedade. Um abraço especial a Tatiana Sobral, Aline Lavigne e Luanda Neto pela amizade e incentivo nos momentos mais difíceis.

À querida secretária do LPM, Cláudia Castro, por ser muito prestativa e competente, pelos momentos de descontração e pelas caronas.

Ao Doutor Marcelo Pinto, pelas críticas construtivas e sugestões no seminário discente e por aceitar ser revisor deste trabalho.

Aos estatísticos Dr. Claudio Struchnner, Dr. Francisco Inácio, Dr. Guilherme Werneck e Dra. Neilane Bertoni pelo valioso auxílio com a análise estatística.

Aos membros da banca por aceitarem o convite.

Ao curso de Pós-graduação em Biologia Parasitária do IOC, nas pessoas da coordenadora do programa e da coordenadora adjunta, Professora Doutora Ana Maria Coimbra Gaspar e Professora Doutora. Mirian Cláudia de Souza Pereira e dos atuais coordenadores, Professor Doutor Rafael Maciel de Freitas e Professora Doutora Luzia Maria de Oliveira Pinto.

Aos professores das disciplinas da Pós-graduação pela forma como lecionaram e por terem transmitido o interesse por diversos assuntos. Deixo também uma palavra de agradecimento aos colegas de grupo que me acompanharam na Pós-graduação nos momentos de tensão e de descontração, pelas consultorias nos momentos de dúvida e palavras de incentivo nos momentos de desânimo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj), à Fiocruz e ao Programa de Apoio a Núcleos de Excelência - PRONEX (DECIT/ CNPq/ Faperj) - pelo auxílio financeiro.

Agradeço a Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

Sou, como sempre e mais uma vez, grata a toda a minha família, pelo apoio, carinho e paciência, em especial aos meus pais, pelo apoio incondicional, por valorizarem a trajetória que escolhi seguir, pelos conselhos sensatos e pela motivação para superar os mais diversos obstáculos.

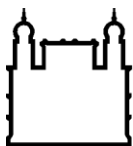
Agradeço a meus amigos: Jilder Peña pela ajuda com a construção dos gráficos, pela companhia, pela paciência e pelo apoio nos últimos meses; Victor Lima, João Júlio e Felipe Guedes pelas divertidas conversas filosóficas, momentos de descontração e compreensão com a minha ausência; Max Thiebot pela amizade, incentivo nos momentos de desânimo e prestatividade em me ajudar; Paula Daniela e Klaus Magno por toda compreensão e palavras de ânimo.

Muito obrigada ao Professor Cláudio Maurício, que me acolheu no final da faculdade orientando minha monografia, pelos bons conselhos e pelo incentivo para me candidatar e ingressar no mestrado.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram ao longo da execução deste trabalho: **Muito obrigada!**

“Se não houver frutos valeu a beleza das flores. Se não houver flores, valeu a sombra das folhas. Se não houver folhas valeu a intenção da semente.”
(Henfil)

“A esperança é o último remédio que a natureza deixou a todos os males”.
(Pe. Antônio Vieira)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

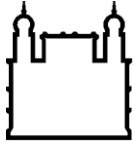
AValiação DO EFEITO DO LIPOSSOMO-CLODRONATO NO CURSO DA INFECÇÃO DE PRIMATAS NEOTROPICAIS *Saimiri sciureus* POR *Plasmodium falciparum*

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Janaíara Araujo Cunha

Os primatas neotropicais dos gêneros *Saimiri* e *Aotus* são modelos recomendados pela OMS para estudos experimentais da malária humana, pois são susceptíveis à infecção por plasmódios humanos e reproduzem de forma relativamente confiável a patologia e a imunidade observadas em humanos. Eles apresentam, entretanto, uma importante limitação: a necessidade de se esplenectomizar o animal para que as parasitemias sejam elevadas e consistentes. O objetivo desse estudo foi avaliar a influência da administração de lipossomo-clodronato (LC), utilizado para depletar monócitos/macrófagos em vários modelos experimentais, na infecção por *Plasmodium falciparum* em *Saimiri sciureus*. Realizou-se um experimento *in vitro* utilizando cultivo de esplenócitos de *Saimiri*, incubados em presença ou não de LC, quantificando-se a depleção de macrófagos por citometria de fluxo. Primeiro experimento: foram utilizados seis animais não esplenectomizados divididos em dois grupos que receberam 1mL PBS ou de LC (5mg/mL) a partir do dia 0 de infecção com inóculo contendo 10^6 hemácias parasitadas com *P. falciparum* (cepa FUP). Segundo experimento: foram utilizados 14 animais não esplenectomizados divididos em seis grupos - três grupos não infectados, com dois animais cada, que receberam 1mL PBS, ou 0,5mL ou 1mL de LC e três grupos infectados no dia 0 que receberam as mesmas administrações; sendo que o grupo que recebeu PBS tinha dois animais e os grupos que receberam LC tinham três animais cada. Em ambos os experimentos as administrações foram por via intravenosa duas vezes por semana a partir de dia 0. Após eutanásia, foram realizados exames histopatológicos e ensaio de expressão de citocinas em células esplênicas. No ensaio *in vitro* o LC induziu uma citotoxicidade dose-dependente de monócitos/macrófagos. No primeiro experimento o grupo tratado com LC apresentou aumento na parasitemia alcançando valores superiores a 20% no d11 e requerendo tratamento. O grupo tratado com PBS apresentou parasitemia de 0,029% a 8,15% e foi capaz de controlar espontaneamente a infecção no d18. No segundo experimento os animais infectados que receberam 0,5mL LC apresentaram parasitemias mais elevadas (pico entre 16,1% e 26,7% entre d10 e d14) do que os outros grupos (grupo PBS - picos entre 6,3% e 17,7% entre d12 e d13, e grupo 1mL LC - pico entre 4,8% e 8,8% entre d11 e d15). Em todos os animais infectados, a temperatura foi relacionada com a presença de parasitemia e a hemoglobina e o hematócrito diminuíram alcançando valores mínimos quando parasitos já não são mais detectáveis na circulação. Os animais toleraram clinicamente a administração de LC, mas apresentaram sinais histopatológicos de toxicidade hepática. Em conclusão, o LC é capaz de promover parasitemias mais altas em infecções de *P. falciparum* em primatas *S. sciureus*. A infecção esteve associada a evidências de depleção parcial de macrófagos como diferenças no tamanho dos baços e menor presença de ferro nos baços e fígados dos animais que receberam LC. Ensaio ainda precisam ser realizados para se estabelecer volumes mínimos funcionais e superar o problema da aparente toxicidade hepática.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EVALUATION OF THE EFFECT OF CLODRONATE-LIPOSOMES INJECTIONS IN THE COURSE OF INFECTION IN NEOTROPICAL PRIMATES *Saimiri sciureus* BY *Plasmodium falciparum*

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

Janaíara Araujo Cunha

The WHO recommends the Neotropical primates of the genus *Saimiri* and *Aotus* as models for experimental studies of human malaria. These monkeys are susceptible to infection by human *Plasmodia* and reproduce relatively reliably the pathology and immunity observed in man. However, the model has as limitation the need of splenectomy for the obtention of high and consistent parasitemias. The aim was to evaluate the influence of administration of clodronate-liposome (CL), used to deplete monocytes/macrophages in several experimental models, in *Plasmodium falciparum* infected *Saimiri sciureus*. We conducted an experiment using *in vitro* culture of spleen cells from *Saimiri* incubated in the presence or absence of CL and quantifying the depletion of macrophages by flow cytometry. Other experiments were: Exp. 1: six non splenectomized animals were divided into two groups receiving 1 mL of PBS or 1 mL of CL (5mg/mL) from the day 0 of infection with 10^6 *P. falciparum* (FUP strain) parasitized erythrocytes. Exp. 2: 14 non-splenectomized animals were divided in six groups - three non-infected groups, with two animals each, receiving 1mL PBS, 0.5 mL or 1 mL CL; and three infected groups receiving the same injections. The group that received PBS had two animals each; and the groups that received CL had three animals each. In both experiments the injections were intravenous, two times a week from d0. After euthanasia, histopathological examination and testing of cytokine expression in splenic cells were performed. *In vitro* assay: the CL induced a dose-dependent monocyte / macrophage cytotoxicity. In Exp 1, the CL treated group showed an increase in parasitemia reaching values higher than 20% at d11 and required treatment. The group treated with PBS showed parasitemia from 0.029% to 8.15% and was able to spontaneously control the infection by d18. In Exp 2, the infected animals receiving 0.5 ml CL showed higher parasitaemia (peaks between 16.1% and 26.7% between d10 and d14) than the other groups (PBS group - peaks between 6.3% and 17.7% between d12 and d13, and 1mL CL group - peak between 4.8% and 8.8% between d11 and d15). In all infected animals, the temperature was related to the presence of parasitaemia and hemoglobin and hematocrit decreased, reaching minimum values during or after clearance of the parasite. The animals tolerated clinically the CL administration but showed histopathological signs of liver toxicity. Animals receiving CL showed less iron in the spleen, suggesting a decreased erythrophagocytosis. In conclusion, the CL is capable of promoting higher parasitemia in *P. falciparum* infected *S. sciureus* primates. The infection was associated with evidences of partial depletion of macrophages, such as differences in the spleen sizes and decreased presence of iron in the spleens and livers of animals receiving CL. However, more tests still need to be conducted to define the lower volumes of LC that are still functional, to overcome the problem of the apparent liver toxicity.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Uso de lipossomo-clodronato em estudos de depleção de macrófagos em malária	31
1.2	Justificativa.....	38
2	OBJETIVOS	39
2.1	Objetivo Geral.....	39
2.2	Objetivos Específicos	39
3	MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1	Animais	40
3.2	Lipossomo-clodronato (LC).....	40
3.3	Parasitas	40
3.4	Desenho experimental	41
3.4.1	Ensaio do efeito do LC <i>in vitro</i>	41
3.4.2	Experimento piloto do efeito do LC em <i>S. sciureus</i> e no curso da infecção plasmodial.....	41
3.4.3	Efeito da administração de LC no curso da infecção de <i>S. sciureus</i> por <i>P. falciparum</i> e na contagem de células CD14.....	42
3.5	Aspectos éticos da pesquisa	45
3.6	Inóculos de <i>P. falciparum</i>	47
3.7	Manejo e anestesia.....	47
3.8	Acompanhamento e avaliação durante infecção.....	48
3.8.1	Parasitemia.....	48
3.8.2	Hematócrito	48
3.8.3	Hemoglobina.....	48
3.8.4	Leucograma diferencial.....	48
3.8.5	Quantificação de monócitos por citometria de fluxo	49
3.9	Tratamento.....	49
3.10	Eutanásia e coleta de órgãos	50
3.11	Procedimentos histopatológicos	50
3.11.1	Preparação das amostras.....	50
3.11.2	Coloração H&E	51

3.11.3	Coloração de Perls ou azul da Prússia	51
3.11.4	Análise das lâminas e captação de imagens	51
3.12	Ensaio laboratoriais	52
3.12.1	Cultivo de <i>P. falciparum</i> (cepa FUP).....	52
3.12.2	Isolamento, quantificação, congelamento e descongelamento de esplenócitos.....	52
3.12.3	Ensaio de expressão de citocinas	53
3.13	Análise estatística	54
4	RESULTADOS	56
4.1	Efeito do lipossomo-clodronato (LC) sobre a contagem de macrófagos/monócitos <i>in vitro</i>	56
4.2	Experimento piloto do efeito do LC em <i>S. sciureus</i> e no curso da infecção plasmodial	57
4.3	Efeito da administração de LC no curso da infecção de <i>S.</i> <i>sciureus</i> por <i>P. falciparum</i> e na contagem de células CD14	61
4.3.1	Parasitemia.....	61
4.3.2	Anemia.....	64
4.3.3	Temperatura	67
4.3.4	Variação nos níveis de leucócitos.....	69
4.3.5	Variação em outros parâmetros.....	74
4.3.6	Alterações na estrutura do baço e do fígado	74
4.3.6.1	Análise histopatológica do baço e do fígado – Experimentos 1 e 2.....	76
4.3.7	Investigação da expressão de citocinas em células de baço de <i>S. sciureus</i> infectados e não infectados por <i>P.</i> <i>falciparum</i>	84
5	DISCUSSÃO	98
6	CONCLUSÕES	103
7	PERSPECTIVAS	104
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
9	ANEXOS	113

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Mosquito do gênero <i>Anopheles</i> realizando repasto sanguíneo.	20
Figura 1.2: Ciclo de transmissão da malária por <i>P. falciparum</i>	21
Figura 1.3: Áreas de transmissão de malária no mundo, 2010.	24
Figura 1.4: Mapa do Brasil destacando as áreas de risco para malária pelos diferentes níveis de IPA, 2012.	25
Figura 1.5: Primatas não-humanos neotropicais dos gêneros <i>Saimiri</i> (A) e <i>Aotus</i> (B).	29
Figura 1.6: Esquema da estrutura do LC.	31
Figura 1.7: Estrutura geral dos bisfosfonatos (à esquerda) e do pirofosfato (à direita).	32
Figura 1.8: Os LC atuam como "cavalos de Troia".	33
Figura 1.9: Comparação do funcionamento normal da enzima ADP/ATP translocase (A) e do possível mecanismo do clodronato na mitocôndria (B)...	34
Figura 1.10: Esquema mostrando os alvos do LC quando administrado por via intravenosa (IV).	35
Figura 3.1: Esquema de administrações de LC ou PBS a partir do dia 0 de infecção – Experimento piloto.	42
Figura 3.2: Esquema de administrações de LC ou PBS a partir do dia 0 de infecção – Experimento 1 (E1).	43
Figura 3.3: Esquema de administrações de LC ou PBS a partir do dia 0 de infecção – Experimento 2 (E2).	45
Figura 3.4: Resumo esquemático do trabalho.	46
Figura 4.1: (A) <i>Dot plot</i> mostrando o <i>gate</i> de população de células analisadas. (B) Histograma representando a população de células que expressam CD14-APC.	56
Figura 4.2: Efeito <i>in vitro</i> do LC sobre a depleção de macrófagos de macacos, marcados com CD14-APC.	57
Figura 4.3: Variação de temperatura retal nos dias de administração de LC ou PBS durante a primeira série de administrações.	58
Figura 4.4: Contagem diferencial de leucócitos – experimento piloto.	59
Figura 4.5: Curso da parasitemia de macacos <i>S. sciureus</i> não esplenectomizados após a infecção com 10 ⁶ HP – experimento piloto.	60

Figura 4.6: Variação do hematócrito durante o curso da parasitemia – experimento piloto.	60
Figura 4.7: Variação da temperatura durante o curso da parasitemia – experimento piloto.	61
Figura 4.8: Curso da parasitemia após a infecção com 10^6 HP/mL pela cepa FUP de <i>P. falciparum</i> - Experimento 1.....	62
Figura 4.9: Curso da parasitemia após a infecção com 10^6 HP/mL pela cepa FUP de <i>P. falciparum</i> - Experimento 2.....	63
Figura 4.10: Média do curso da parasitemia após a infecção com 10^6 HP/mL pela cepa FUP de <i>P. falciparum</i> – Experimentos 1 e 2.....	64
Figura 4.11: Variação dos níveis de hemoglobina (média) – Experimento 1.	65
Figura 4.12: Variação dos níveis de hematócrito (média) – Experimento 1.....	65
Figura 4.13: Variação dos níveis de hemoglobina (média) - Experimento 2.....	66
Figura 4.14: Variação dos níveis de hematócrito (média) - Experimento 2.....	67
Figura 4.15: Variação da temperatura (média) - Experimento 1.....	68
Figura 4.16: Variação da temperatura (média) - Experimento 2.....	69
Figura 4.17: Etapas realizadas no programa Summit para análise da quantificação de CD14-APC nas amostras de sangue coletadas.	70
Figura 4.18: Variação de CD14-APC, quantificada por citometria de fluxo - Experimento 1.....	70
Figura 4.19: Variação de monócitos, quantificados por leucograma diferencial - Experimento 1.....	71
Figura 4.20: Variação de leucócitos (exceto monócitos), quantificados por leucograma diferencial - Experimento 1.....	72
Figura 4.21: Variação de CD14-APC, quantificados por citometria de fluxo (média) - Experimento 2.....	73
Figura 4.22: Variação de CD14-APC, quantificados por citometria de fluxo (média) – Experimentos 1 e 2.....	73
Figura 4.23: Análise histopatológica de baços de <i>S. sciureus</i> com coloração H&E.....	77
Figura 4.24: Análise histopatológica de baços de <i>S. sciureus</i> com coloração de Perls.	79
Figura 4.25: Análise histopatológica de fígados de <i>S. sciureus</i> com coloração H&E.....	81

Figura 4.26: Análise histopatológica de baços de <i>S. sciureus</i> com coloração de Perls.	83
Figura 4.27: Expressão de IL2 em células do baço de seis animais infectados por <i>P. falciparum</i> e de três animais controles não infectados QUE RESPONDERAM ao estímulo <i>in vitro</i> por mitógeno (PMA).	85
Figura 4.28: Expressão de IL6 em células do baço de seis animais infectados por <i>P. falciparum</i> e de três animais controles não infectados QUE RESPONDERAM ao estímulo <i>in vitro</i> por mitógeno (PMA).	86
Figura 4.29: Expressão de IL10 em células do baço de seis animais infectados por <i>P. falciparum</i> e de três animais controles não infectados QUE RESPONDERAM ao estímulo <i>in vitro</i> por mitógeno (PMA).	87
Figura 4.30: Expressão de IL17A em células do baço de seis animais infectados por <i>P. falciparum</i> e de três animais controles não infectados QUE RESPONDERAM ao estímulo <i>in vitro</i> por mitógeno (PMA).	88
Figura 4.31: Expressão de IFNG1 em células do baço de seis animais infectados por <i>P. falciparum</i> e de três animais controles não infectados QUE RESPONDERAM ao estímulo <i>in vitro</i> por mitógeno (PMA).	89
Figura 4.32: Expressão de IFNB1 em células do baço de seis animais infectados por <i>P. falciparum</i> e de três animais controles não infectados estimuladas <i>in vitro</i> pela presença de mitógeno, HP ou HNP de <i>Saimiri</i>	90
Figura 4.33: Expressão de LTA em células do baço de seis animais infectados por <i>P. falciparum</i> e de três animais controles não infectados estimuladas <i>in vitro</i> pela presença de mitógeno, HP ou HNP de <i>Saimiri</i>	91
Figura 4.34: Expressão de TNF em células do baço de seis animais infectados por <i>P. falciparum</i> e de três animais controles não infectados estimuladas <i>in vitro</i> pela presença de mitógeno, HP ou HNP de <i>Saimiri</i>	92
Figura 4.35: Expressão de IL1A em células do baço de seis animais infectados por <i>P. falciparum</i> e de três animais controles não infectados estimuladas <i>in vitro</i> pela presença de mitógeno, HP ou HNP de <i>Saimiri</i>	93
Figura 4.36: Expressão de IL4 em células do baço de seis animais infectados por <i>P. falciparum</i> e de três animais controles não infectados estimuladas <i>in vitro</i> pela presença de mitógeno, HP ou HNP de <i>Saimiri</i>	94
Figura 4.37: Expressão de IL5 em células do baço de seis animais infectados por <i>P. falciparum</i> e de três animais controles não infectados estimuladas <i>in vitro</i> pela presença de mitógeno, HP ou HNP de <i>Saimiri</i>	95

Figura 4.38: Expressão de IL12B em células do baço de seis animais infectados por <i>P. falciparum</i> e de três animais controles não infectados estimuladas <i>in vitro</i> pela presença de mitógeno, HP ou HNP de <i>Saimiri</i>.....	96
Figura 4.39: Expressão de citocinas – comparação das áreas sob a curva.	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Distribuição dos animais nos grupos de acordo com as injeções administradas – Experimento 1 (E1).....	43
Tabela 3.2: Distribuição dos animais nos grupos de acordo com as injeções administradas – Experimento 2 (E2).....	44
Tabela 3.3: Iniciadores diretos e reversos, usados na detecção de transcritos e desenhados a partir de sequências de macacos Saimiri.	54
Tabela 4.1: Peso dos baços removidos após eutanásia e sua relação com o peso corporal na última pesagem – Experimento 1.....	74
Tabela 4.2: Peso dos baços removidos após eutanásia e sua relação com o peso corporal na última pesagem – Experimento 2.....	75

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADP – Difosfato de Adenosina (“Adenosine Diphosphate”)

APC - Aloficocianina (“Allophycocyanin”)

ATP – Trifosfato de Adenosina (“Adenosine Triphosphate”)

BD – Becton, Dickinson and Company

°C – Graus Celsius

CD – Grupamento de diferenciação (“Cluster of differentiation”)

cDNA - DNA complementar

Cecal – Centro de Criação de Animais de Laboratório

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

cm – centímetro

CO₂ – Dióxido de carbono

d – dia

DALYs - Anos de vida ajustados por incapacidade (“disability-adjusted life-years”)

DMSO – Dimetilsulfóxido

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima (“Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay”)

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

FS – Parâmetro de tamanho (“Forward Scatter”)

FUP – *Plasmodium falciparum* cepa Uganda/Palo Alto

h – hora

H&E – Hematoxilina-Eosina

HNP - Hemácias não parasitadas

HP - Hemácias parasitadas

HSPGs - Proteoglicanos de sulfato heparina

GLURP – Proteína Rica em Glutamato

g – grama

IFNG – Interferon gama

IFNB1 – Interferon beta 1

IL - Interleucina

IP - Intraperitoneal

IV - Intravenoso

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

kg – quilograma

LC – Lipossomo-clodronato
LTA - Ácido lipoteicoico
mg – miligrama
min - minuto
µL – microlitro
mL – mililitro
mM – milimolar
MS – Ministério da Saúde
MSP3 – Proteína 3 da superfície do merozoíto (“Merozoite Surface Protein-3”)
ng – nanograma
PBMC – Células mononucleares do sangue periférico (“Peripheral Blood Mononuclear Cells”)
PBS – Tampão Fosfato-Salino (“Phosphate Buffered Saline”)
PCR - Reação em cadeia da polimerase (“Polymerase chain reaction”)
PDTIS – Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
PMA - Acetato Miristato de Forbol (“Phorbol 12-myristate 13-acetate”)
RNA – Ácido ribonucleico (“Ribonucleic acid”)
mRNA – RNA mensageiro
RPM – Rotações por minuto
RPMI – Meio de Cultura do Instituto Roswell Park Memorial (“Roswell Park Memorial Institute”)
RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (“Reverse transcription polymerase chain reaction”)
SCPrim – Serviço de Criação de Primatas Não-humanos
SCQA – Serviço de Controle de Qualidade Animal
SFB – Soro Fetal Bovino
spp – espécies
SS – Parâmetro de granulosidade (“Side scatter”)
SVS – Serviço de Vigilância em Saúde
TNF – Fator de Necrose Tumoral (“Tumoral Necrosis Factor”)
U – unidade
WHO – Organização Mundial de Saúde (“World Health Organization”)

1 INTRODUÇÃO

A malária, também conhecida como paludismo, febre palustre, maleita e sezão, é uma das protozooses mais conhecidas e antigas do mundo, e seu histórico de febres intermitentes antecede a era cristã. É provável que ela tenha surgido na África há milhões de anos e posteriormente se disseminado para as regiões tropicais, subtropicais e temperadas favoráveis ao agente transmissor desta infecção. Admite-se que a evolução do parasito tenha antecedido em muito, e acompanhado, a evolução humana (França *et al*, 2008).

Os vetores são mosquitos fêmeas pertencentes à ordem dos dípteros, família *Culicidae*, gênero *Anopheles*, que abrange mais de 400 espécies (Figura 1.1). O principal vetor no Brasil é a espécie *Anopheles darlingi*, que se destaca na transmissão da doença pela distribuição geográfica, antropofilia e receptividade à infecção por diversas espécies de plasmódios (Ministério da Saúde, MS, 2008).



Figura 1.1: Mosquito do gênero *Anopheles* realizando repasto sanguíneo.

Fonte: <http://www.icb.usp.br/~marcelcp/Imagens/f-zzz18.jpg>

Dentre as cerca de 120 espécies de protozoários causadores da malária (Warrel, Gilles, 2002), cinco são capazes de causar malária no homem. O *Plasmodium falciparum* é considerado a espécie de maior impacto na saúde pública devido às altas taxas de morbimortalidade e a sua associação com as formas mais graves e letais da doença (Rowe *et al*, 2009; Quintero *et al*, 2011), além de apresentar multirresistência aos fármacos antimaláricos. O *P. vivax* é a espécie mais amplamente distribuída no mundo. Ainda que a malária vivax seja considerada benigna, pode ser muito debilitante e mesmo apresentar ocasionalmente formas mais graves (Price *et al*, 2007; Douglas *et al*, 2012). Também causam doença no

homem o *P. malariae*, o *P. ovale* e o *P. knowlesi*, esse último, um parasito classicamente simiano, recentemente identificado como capaz de infectar e causar malária em humanos (Singh *et al*, 2004; Vythilingam *et al*, 2006; White, 2008; Sabbatani *et al*, 2010; Lee *et al*, 2011).

O *Plasmodium* é um parasito intracelular obrigatório. Seu ciclo é di-heteroxeno e possui dois tipos de reprodução: assexuada no hospedeiro vertebrado e sexuada no hospedeiro invertebrado (Figura 1.2).

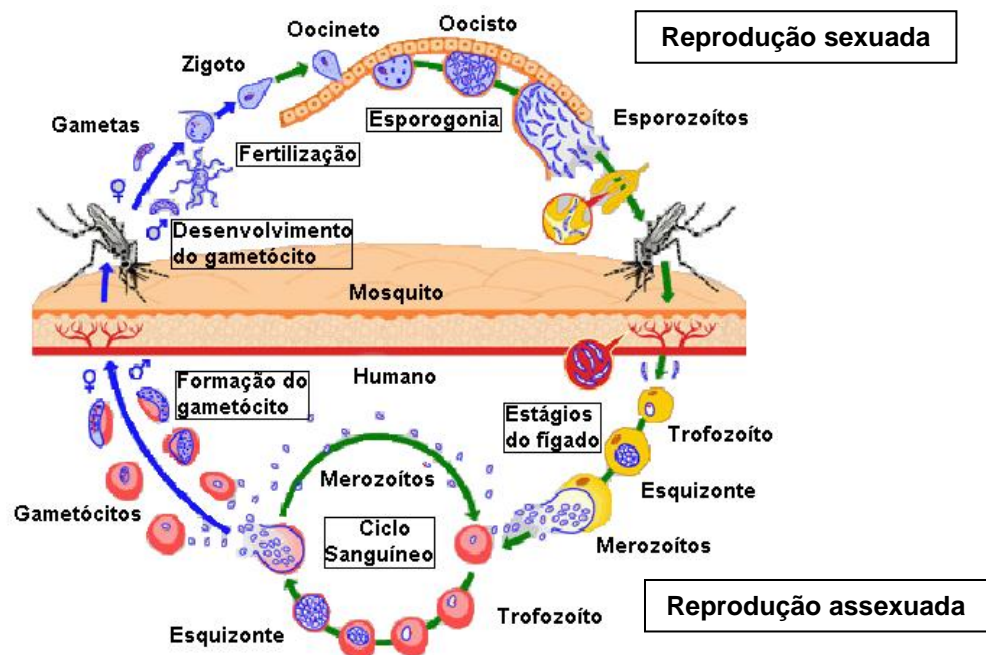


Figura 1.2: Ciclo de transmissão da malária por *P. falciparum*.

Fonte: Modificado de http://www.virtual.unifesp.br/unifesp/malaria/restrito/pop_agt_ciclo.htm.

A infecção por transmissão natural inicia-se quando o vetor inocula os parasitos (esporozoítos) na pele do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. Entre 30 minutos a 2 horas, essas formas alcançam os hepatócitos, infectando-os.

Estudos recentes mostram que os esporozoítos inoculados na derme de camundongos se mantêm viáveis nos folículos durante algumas semanas. Os esporozoítos podem se desenvolver na pele e nos folículos ou migrar para os vasos linfáticos e invadir ativamente os linfonodos, em ambos os casos, desenvolvendo-se e gerando merozoítas infectantes para os eritrócitos, liberados através de merossomos. Os esporozoítos também podem migrar para os vasos sanguíneos atingindo a circulação sanguínea e dando continuidade ao ciclo biológico no fígado (Gueirard *et al*, 2010; Ménard *et al*, 2013).

Os esporozoítos que chegam ao fígado aderem a células endoteliais dos sinusoides hepáticos, ligam-se a proteoglicanos de sulfato heparina (HSPGs) e deslizam pelo endotélio antes de atravessar a parede do capilar através de células de Kupffer. Uma vez no parênquima hepático, esses parasitos migram através de diversos hepatócitos antes de iniciarem a formação de um vacúolo parasitóforo, multiplicam-se e dão origem a entre 10 e 30 mil merozoítos para cada um esquizonte hepático (esquizogonia extra-eritrocítica) que são liberados através de merossomos na corrente sanguínea (Baer *et al*, 2007a; Baer *et al*, 2007b; Ménard *et al*, 2013). Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, alguns parasitos se desenvolvem rapidamente, enquanto outros ficam em estado de latência no hepatócito. São os chamados hipnozoítos que são responsáveis pelas recaídas da doença, que ocorrem após períodos variáveis de incubação (Markus, 2011). Além disso, formas merozoítas encontrados no baço podem ser uma fonte não-hipnozoíta de recaídas de malária vivax ocasionada por parasitos genotipicamente semelhantes aos que causaram a primeira infecção. Os merozoítos de *P. falciparum* também podem persistir longos períodos nas células do baço, sendo uma possível causa de recrudescências ou infecção primária após longos períodos após a picada do mosquito infectado (Markus, 2011b; Markus, 2012).

Uma vez na circulação sanguínea, os parasitos iniciam a fase eritrocítica da doença chamada esquizogonia sanguínea. É na fase sanguínea que surgem os sintomas típicos da malária. Cada merozoíto, após multiplicação dentro do eritrócito, origina 18 a 32 novos merozoítos sanguíneos prontos para continuar a invasão de novos eritrócitos. No vacúolo parasitóforo, o parasito se diferencia em trofozoíto jovem (anel), posteriormente, em trofozoíto maduro, reiniciando um processo de reprodução assexuada gerando esquizontes sanguíneos, repletos de merozoítos que rompem as hemácias e invadem outras, em ciclos repetitivos de multiplicação eritrocitária. Esse momento coincide com as manifestações clínicas da doença, classicamente, o paroxismo febril caracterizado por calafrio, febre e sudorese, devido às toxinas e fatores pirogênicos liberados no momento da hemólise. Esses ciclos eritrocitários repetem-se a cada 48 horas nas infecções por *P. vivax* e *P. falciparum*, a cada 72 horas nas infecções por *P. malariae* e a cada 24 horas por *P. knowlesi*. A cefaleia, embora menos clássica, é em muitos estudos, o segundo sintoma mais presente, depois da febre (Rey, 2002; Warrel & Gilles, 2002; White, 2008; Ministério da Saúde, MS, 2009).

Após algumas gerações de merozoítos nas hemácias, alguns trofozoítos jovens, estimulados por mecanismos ainda desconhecidos, passam a se diferenciar nas formas sexuadas: os macrogametócitos (feminino) e microgametócitos (masculino). Esses gametas no interior das hemácias (gametócitos) não se dividem no hospedeiro vertebrado, mas ao serem ingeridos pelos insetos vetores, fecundam-se para dar origem ao ciclo sexuado do parasito.

No interior do anofelino, os gametócitos irão encaminhar-se para o estômago do inseto e os microgametócitos sofrem o processo de exoflagelação liberando microgametas que penetram nos macrogametócitos dando origem ao ovo ou zigoto. O zigoto se diferencia em uma forma móvel (ocineto) que penetra na membrana peritrófica do intestino médio do anofelino transformando-se em oocisto. Nessa fase, inicia-se o processo de multiplicação celular que resulta na formação de diversos esporozoítos; parte destes migra para as glândulas salivares do mosquito. A fêmea do anofelino, ao realizar um novo repasto sanguíneo, inoculará essas formas no homem reiniciando o ciclo (Rey, 2002).

O ciclo de vida do *Plasmodium* requer a expressão de proteínas especializadas nos dois hospedeiros. Essas proteínas também são requeridas para possibilitar a invasão de diferentes tipos celulares e facilitar a evasão do sistema imune do hospedeiro (Pradhan & Ghosh, 2013).

Além da transmissão natural, principal forma de transmissão, por meio da picada do mosquito vetor, a malária pode ser transmitida de forma acidental por transfusão de sangue (contaminado com plasmódio), pelo compartilhamento de seringas (usuários de drogas injetáveis) ou por acidente com agulhas e/ou lancetas contaminadas. Há também o risco de transmissão neonatal (Kitchen & Chiodini, 2006; MS, 2011; Mohan *et al*, 2010; Tao *et al*, 2014).

Em 2012, cerca de 3,4 bilhões de pessoas (quase metade da população mundial) estava sob risco de malária. Nesse mesmo ano foram estimados em 207 milhões os casos de malária e em 627 mil mortes. A ameaça é maior na África sub-saariana, onde uma em cada cinco (20%) mortes infantis é devida aos efeitos da doença. No entanto, América Latina, Ásia e em menor grau Oriente Médio e partes da Europa também são afetados (Figura 1.3). Em 2013, a malária estava presente em 104 países e territórios. Cerca de metade destes países, dentre estes o Brasil, estão a caminho de cumprir a meta da Organização Mundial de Saúde de atingir em 2015 uma redução de 50-75% na taxa de incidência de casos de malária em relação aos níveis de 2000 (World Health Organization, WHO, 2013). Segundo Murray

(2012), os números seriam ainda maiores - o número de mortes por malária no mundo teria aumentado de 995.000 (711.000 - 1.412.000) em 1980 para 1.817.000 (1.430.000 - 2.366.000) óbitos em 2004 e diminuído para 1.238.000 mortes (929.000 - 1.685.000) no ano de 2010.



Figura 1.3: Áreas de transmissão de malária no mundo, 2010.

Fonte: WHO, 2011.

O número de casos e de mortes por malária no Brasil correspondem, respectivamente a 52% e 59% da totalidade das Américas (Pan American Health Organization, PAHO, 2014; WHO, 2013). No ano de 2013 foram notificados 178.525 casos e 36 mortes. Embora esses dados ainda não sejam definitivos, eles representam uma queda de 26,5% no número de casos e de 40% de mortes em relação a 2012, 242.761 e 60, respectivamente (Costa *et al*, 2014). A quase totalidade de casos no país (99,6%) é registrada na região Amazônica (Figura 1.4), cujos fatores biológicos, ecológicos, geográficos e sociais favorecem a expansão da transmissão (MS, 2009). A maioria dos casos notificados está concentrada nos estados do Pará, Amazonas, Rondônia, Acre, Amapá e Roraima. Dos 807 municípios da Região Amazônica, 37 municípios notificaram 80,38% dos casos, sendo que cinco deles (Cruzeiro do Sul - AC, Porto Velho - RO, Itaituba - PA,

Eirunepé - AM e Manaus - AM) relataram 30% dos casos. No Brasil, há transmissão de *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. Sendo que as infecções causadas por *P. vivax* correspondem a cerca de 85% dos casos e as por *P. malariae* correspondem a de 1% do total (MS, 2008; WHO, 2013; MS, 2014).

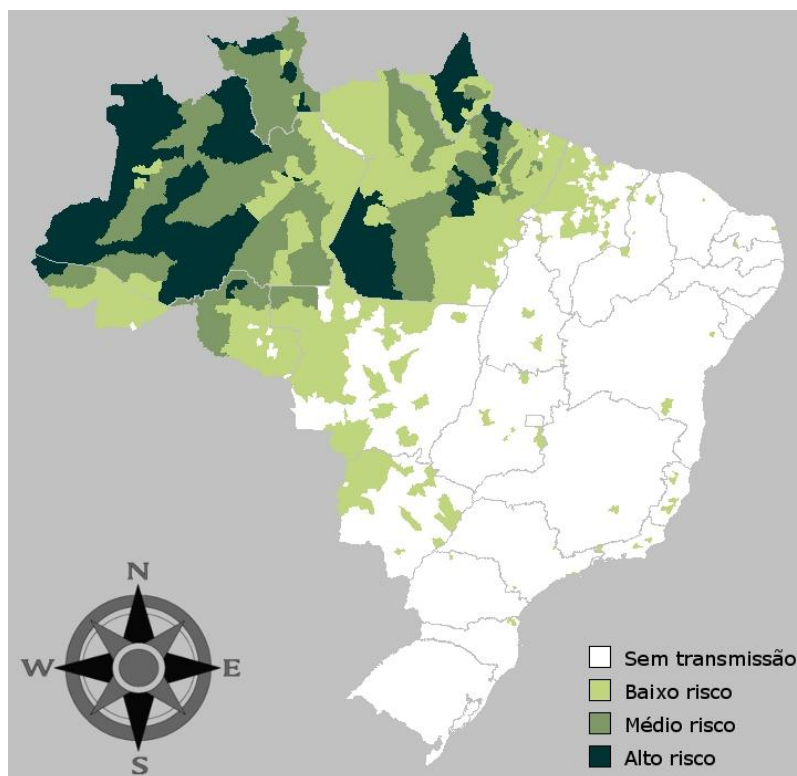


Figura 1.4: Mapa do Brasil destacando as áreas de risco para malária pelos diferentes níveis de IPA, 2012.

Fonte: SVS/ MS Brasil.

Fora da Amazônia, a maior parte dos casos registrados (88%, MS, 2014) corresponde a casos importados dos estados que pertencem à área endêmica e dos continentes africano, americano (Central e Sul) e asiático. Ocorrem casos autóctones esporádicos em áreas restritas destacando-se os municípios localizados às margens do lago da usina hidrelétrica de Itaipu; áreas cobertas pela Mata Atlântica nos estados do Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná. Também são detectados casos autóctones na região Centro-oeste, estados de Goiás e Mato Grosso do Sul; e a região Nordeste, estados do Piauí e Bahia (MS, 2011). Na região extra-amazônica ocorre a maior propensão de casos de doença grave e óbito devido a retardos no diagnóstico e tratamento. Os sintomas iniciais da malária podem ser inespecíficos, e por isso, confundidos com de outras síndromes febris agudas (Costa *et al*, 2010).

A malária, além de afetar diretamente o bem-estar das pessoas durante a infecção aguda, pode resultar em baixo desempenho de crianças em idade escolar e na perda de motivação (Vitor-Silva *et al*, 2009). O impacto da doença na qualidade de vida tem sido medido em unidades DALYs (“disability-adjusted life-years”), um indicador do tempo vivido com a doença e do tempo perdido devido à morte prematura. A malária possui um DALY elevado, pois afeta um grande número de pessoas e atinge, em áreas hiper e holoendêmicas, preferencialmente, pessoas mais jovens (devido à aquisição de imunidade protetora pelos adultos como consequência das exposições repetidas). A malária causa importantes perdas econômicas, e pode retardar o crescimento econômico anual em até 1,3% em países de alta transmissão (OMS, 2011). Como afeta desproporcionalmente os mais pobres, vivendo em precárias condições de saúde e higiene, e baixa possibilidade de evitar a doença, cria-se uma espiral descendente de pobreza nessas comunidades, além de prejudicar o aprendizado. O custo econômico da malária na África é estimado em US\$ 12 bilhões por ano. No Brasil, é a doença que mais dificulta o desenvolvimento na Região Amazônica, prejudicando o nível de saúde da população e o desenvolvimento econômico da região (MS, 2005). Logo, diminuir tanto a morbidade quanto a mortalidade causadas pela doença é de suma importância para os países afetados.

As atuais estratégias de controle da doença são o combate ao vetor e o diagnóstico e tratamento oportunos (Oliveira-Ferreira *et al*, 2010). No entanto, com a possibilidade de crescente resistência aos fármacos antimaláricos derivados de artemisinina, última linha de tratamento, e inseticidas disponíveis atualmente (Chrubasik *et al*, 2010; Dondorp *et al*, 2010; Kawada *et al*, 2011; WHO, 2013), o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a malária tem sido uma das principais prioridades de pesquisa para enfrentar esse problema.

Atualmente não há vacinas aprovadas contra malária. Considerando a complexidade do parasita e de seu ciclo de vida, a busca de vacinas eficazes contra malária tem sido realizada em muitos alvos: esporozoítos, estágios hepáticos, estágios sanguíneos assexuados, hemácias parasitadas, toxinas do parasito e as formas sexuadas (Carvalho *et al*, 2002).

De acordo com a OMS (2013), há mais de 20 projetos de pesquisa em ensaios clínicos vacinais e dentre estes, uma vacina conhecida como RTS, S/AS01, está em estágio mais avançado. Trata-se de uma vacina desenvolvida utilizando-se uma proteína recombinante baseada na sequência da proteína de circumsporozoito

(CSP), expressa em esporozoítos e esquizontes pré-eritrocíticos, produzida em levedura. Essa proteína recombinante consiste de 189 aminoácidos (207 a 395) da proteína CS fusionada ao antígeno S da superfície do vírus da hepatite B. Essa proteína de fusão foi denominada RTS (recombinantly transformed) e seu gene assim como o que codifica o antígeno S foram expressos em *Saccharomyces cerevisiae*. A preparação tem ainda um adjuvante químico (AS01) para impulsionar a resposta do sistema imune. Esta candidata vacinal, desenvolvida em parceria entre a indústria farmacêutica GlaxoSmithKline e o PATH (Program for Appropriate Technology in Health) com fundos da Fundação Bill & Melinda Gates para o MVI (Malaria Vaccine Initiative), está sendo avaliada em um grande ensaio clínico de fase 3 em sete países africanos (Agnandji *et al*, 2011; Schwartz *et al*, 2012) e a recomendação da OMS para seu uso depende dos resultados finais do grande ensaio clínico, que são esperados para o final de 2014 e apontam para uma capacidade vacinal de cerca de 50% dos imunizados.

Dentre os antígenos de *P. falciparum* expressos na fase sanguínea, a proteína 3 da superfície do merozoíto (MSP3) e a proteína rica em glutamato (GLURP) demonstraram potencial vacinal (Oeuvray *et al*, 1994, 2000). A MSP-3 é sintetizada na fase de esquizonte como um precursor de peso molecular variável entre diversos isolados de *P. falciparum* (McColl *et al.*, 1997) e então é liberada no vacúolo parasitóforo onde sofre ação proteolítica. Alguns dos fragmentos aparentemente estão associados à superfície do merozoíto, porém a maioria é liberada no sobrenadante de culturas *in vitro* em decorrência da ruptura do esquizonte. A GLURP é expressa em todas as formas das fases pré-eritrocítica e eritrocítica estando presente no vacúolo parasitóforo dos esquizontes hepáticos e eritrocíticos, na superfície dos merozoítos e no citoplasma dos eritrócitos parasitados com gametócitos, sugerindo que é liberada na corrente sanguínea após a ruptura dos esquizontes (Borre *et al.*, 1991; Dziegiel *et al.*, 1991). O Laboratório de Pesquisas em Malária vem realizando ensaios pré-clínicos com diferentes construções dessas proteínas combinadas a diferentes adjuvantes (Carvalho *et al*, 2004, 2005). A proteína MSP3 também teve um desempenho promissor em crianças africanas em estudo preliminar em fase 1 (Sirima *et al*, 2011), porém há necessidade de confirmação da eficácia desta vacina potencial em estudos de fase 2.

Ainda que os dados dos ensaios clínicos aumentem as esperanças de termos em breve uma vacina licenciada disponível para uso em países endêmicos, a eficácia da vacina em fase mais avançada de testes em humanos ainda é

relativamente baixa (Riley, Stewart, 2013). Por isso é necessária a avaliação continuada de vacinas potenciais. Para isso, existe a necessidade de dispor de modelos experimentais para que possam ser realizados os testes em fase pré-clínica.

Os resultados obtidos com o uso de modelos experimentais animais são importantes para preencher lacunas na compreensão da biologia da interação parasito-hospedeiro e para avaliar a imugenicidade, segurança e eficácia de qualquer candidata vacinal antes dos ensaios clínicos. Modelos murinos têm ajudado a elucidar mecanismos envolvidos na resposta imune. Existem quatro espécies (*P. berghei*, *P. chabaudi*, *P. yoelli* e *P. vinckei*) capazes de infectar os roedores, mas os agentes etiológicos da malária humana não são capazes de fazê-lo. A isso somam-se as diferenças importantes no tipo de resposta imune entre humanos e camundongos e a frequente natureza isogênica dos animais utilizados, que apesar de oferecerem resultados consistentes não refletem a hererogeneidade genética dos humanos (Teixeira & Gomes, 2013). Essas limitações justificam a utilização de primatas não humanos que são susceptíveis ao ciclo assexuado, total ou parcial, de espécies de *Plasmodium* humanos (Contamin *et al*, 2000). Os modelos primatas preferenciais seriam os chimpanzés por serem mais próximos filogeneticamente ao homem e totalmente suscetíveis aos agentes da malária humana e passíveis de investigações imunológicas detalhadas dos candidatos vacinais em diversos estágios (estágio hepático, fases sanguíneas assexuadas e sexuadas). No entanto, o risco de extinção, o alto custo de criação e as fortes restrições éticas inviabilizam sua utilização. Atualmente, os modelos de primatas neotropicais não humanos dos gêneros *Aotus* e *Saimiri* (Figura 1.5) são recomendados pela OMS para testar diretamente o potencial imunogênico de vacinas contra a malária antes dos testes em voluntários humanos (WHO, 2004), pois além de serem susceptíveis ao *P. vivax* e ao *P. falciparum* (Gysin, Fandeur, 1983; Contamin *et al*, 2000; Herrera *et al*, 2002; Carvalho *et al*, 2000, 2002, 2004, 2005; Collins *et al*, 2005) são abundantes na natureza e podem ser mais facilmente manuseados em cativeiro e com um custo menor, devido ao seu tamanho relativamente pequeno.



Figura 1.5: Primatas não-humanos neotropicais dos gêneros *Saimiri* (A) e *Aotus* (B).

Fontes: <http://mundozoologia.wordpress.com/2012/02/17/monos-simios-y-tarseros/#jp-carousel-195>
<http://wikivillage.co.za/blog/douroucouli-northern-owl-monkey-aotus-trivirgatus>.

No entanto, esses modelos também apresentam desvantagens, sendo a principal delas a necessidade da realização de esplenectomia dos animais, para que as parasitemias sejam mais elevadas e consistentes (Collins, 1992). Nem *Saimiri* nem *Aotus* spp. esplenectomizado é capaz de controlar o crescimento da parasitemia, o que exige tratamento rápido da infecção (Carvalho *et al*, 2000, 2003). A necessidade de esplenectomia prévia constitui uma importante diferença em relação ao estado imunológico de voluntários humanos e, portanto, deveria ser evitada. Além disso, a resposta imune contra as formas pré-eritrocíticas ou eritrocíticas do parasito é mediada por células residentes no baço (Achtman *et al*, 2003; Criswell *et al*, 1971; Leisewitz *et al*, 2004). Por outro lado, animais não-esplenectomizados podem manter baixa parasitemia por períodos mais longos. Além disso, são capazes de reproduzir manifestações clínicas e patológicas da malária humana como a trombocitopenia, alterações na contagem de leucócitos e anemia sendo um modelo apropriado ao estudo da imunopatogenia da malária (Contamin *et al*, 2000). No entanto, para a avaliação da eficácia de vacinas é importante a obtenção de altas parasitemias e, fazê-lo em animais intactos (não esplenectomizados) seria essencial.

Desse modo, o desenvolvimento de estratégias que permitam que a esplenectomia não se faça necessária nas infecções por *P. falciparum* será uma grande evolução em relação ao modelo atual, e poderá permitir a obtenção de dados mais consistentes em experimentos de imunização. Para superar a atual obrigatoriedade de esplenectomia em *Saimiri*, consideramos a possibilidade de substituir a cirurgia por um fármaco imunomodulador utilizando a injeção de clodronato encapsulado em lipossomos (lipossomo-clodronato – LC), preparação

largamente utilizada em estudos em imunologia por causar depleção de macrófagos em tecidos específicos. Foi demonstrado em diversos modelos animais, incluindo camundongos, cães e porcos (van Rooijen, van Nieuwmegen, 1984; Mathes *et al*, 2006; Kim *et al*, 2008) que os macrófagos capturam avidamente as partículas por fagocitose e são destruídos ou tornam-se funcionalmente inativados. O baço é um importante local para a ingestão de lipossomos (Van Rooijen, van Nieuwmegen, 1984; van Rooijen, van Nieuwmegen, 1989; van Rooijen *et al*, 1990) e destruição de microorganismos sanguíneos e hemácias senescentes através da ação de macrófagos residentes (Abbas *et al*, 2008).

1.1 Uso de lipossomo-clodronato em estudos de depleção de macrófagos em malária

A depleção de macrófagos em estudos *in vitro* e *in vivo* é uma abordagem importante para se estudar o papel dessas células em diversos fenômenos fisiológicos e patológicos. Os primeiros métodos para a depleção de macrófagos foram baseados na administração de sílica e carragena, dentre outros tratamentos. No entanto, apresentavam desvantagens como esgotamento incompleto, ativação dos macrófagos, bem como efeito indesejado sobre células não fagocíticas, além da necessidade de altas doses (van Rooijen, Sanders, 1997; van Rooijen, Kesteren-Hendrikx, 2003).

Os lipossomos são vesículas esféricas constituídas por uma ou mais camadas compostas por fosfolípidios e esteróis que geralmente contém compartimento(s) de solução aquosa (Figura 1.6). São conhecidos por sua capacidade de melhorar as propriedades farmacocinéticas dos agentes terapêuticos como aumentar a solubilidade, diminuir possíveis efeitos tóxicos, prolongar o tempo de meia-vida e permitir uma liberação intracelular eficaz. Os lipossomos são derivados de compostos de ocorrência natural como lípidos biodegradáveis e não tóxicos, e se formam espontaneamente quando a porção hidrofóbica do fosfolípido entra em contato com a solução aquosa em que é disperso constituindo uma esfera com bicamada(s) fechada(s). A região hidrofóbica da membrana é capaz de encapsular fármacos lipossolúveis, enquanto o(s) compartimento(s) central(is) pode(m) incorporar os fármacos hidrossolúveis (van Rooijen, Sanders, 1994; Wilczewska *et al*, 2012).

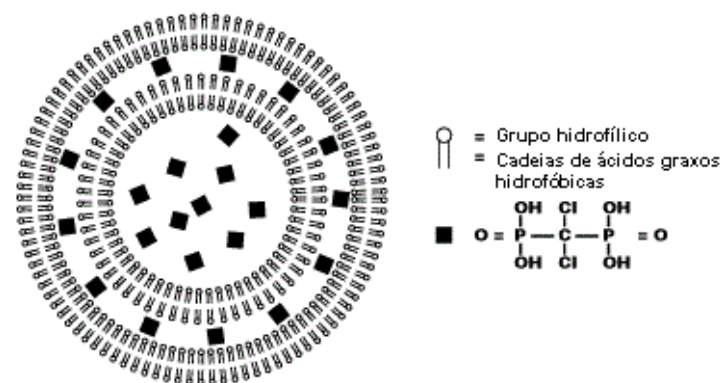


Figura 1.6: Esquema da estrutura do LC.

Os lipossomos são esferas artificiais constituídas por bicamadas fosfolípídicas concêntricas, separadas por compartimentos aquosos. São formados quando moléculas fosfolípídicas são dispersas em água. Parte da solução aquosa, assim como moléculas hidrófilas dissolvidas na

mesma, como o clodronato (representados por quadrados pretos e por sua fórmula estrutural) são encapsulados durante a formação dos lipossomos.

Fonte: <http://clodronateliposomes.org/>

Assim, essas estruturas foram propostas como veículo de liberação controlada de fármacos para células e tecidos em estudos médicos e biomédicos, pois ao serem internalizadas por células fagocíticas do fígado ou do baço, por exemplo, constituiriam um reservatório do fármaco evitando a ação deste em outras células (van Rooijen, van Nieuwmegen, 1984; van Rooijen, Sanders, 1994). Além disso, os macrófagos são capazes de fagocitar os lipossomos, mas não moléculas pequenas, como o clodronato.

O clodronato, também conhecido como ácido clodrônico ou difosfonato de diclorometileno, é um fármaco bisfosfonato não-nitrogenado, pouco lipofílico com tempo de meia vida curto (2 horas), estabelecido como tratamento de escolha para doenças de reabsorção óssea, como a doença de Paget, complicações ósseas de tumores malignos e osteoporose. Esses medicamentos, que são análogos ao pirofosfato (Figura 1.7), atuam sobre os osteoclastos, células derivadas de colônias de células formadoras de macrófagos cuja função básica é a reabsorção óssea, induzindo a apoptose. Além disso, os bisfosfonados possuem aplicações potenciais em diversas outras áreas da medicina incluindo estudos de efeitos imunológicos e de medicamentos anti-parasitários (Rang *et al*, 2001; Snoeys *et al* 2006; Russel, 2011).

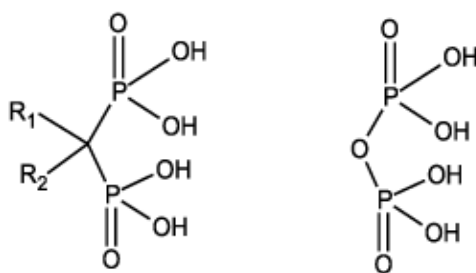


Figura 1.7: Estrutura geral dos bisfosfonatos (à esquerda) e do pirofosfato (à direita).
Fonte: <http://www.scielo.br/img/revistas/qn/v27n3/20174f1.gif>

Como método de depleção de células fagocíticas, os lipossomos atuam como “cavalos de Troia”. Uma vez ingerido pelos macrófagos e em menor proporção por células dendríticas, as bicamadas de fosfolípidos dos lipossomos são rompidas sob a influência das fosfolipases lisossomais e o clodronato é liberado no interior da célula, mas por serem fortemente hidrofílicos não atravessam facilmente as membranas celulares. Com isso, a concentração do clodronato aumenta a medida que mais lipossomos são ingeridos e digeridos (Figura 1.8). Em uma determinada

concentração, é gerado um dano irreversível provocando rápida apoptose da célula (van Rooijen, van Nieuwmegen, 1984; van Rooijen, Sanders, 1994; Naito *et al*, 1996; van Rooijen, Kesteren-Hendrikx, 2003).

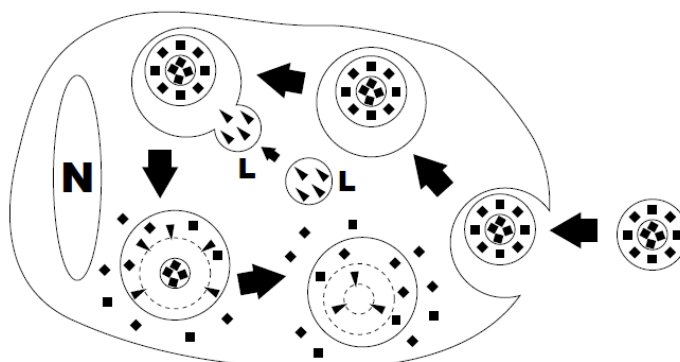


Figura 1.8: Os LC atuam como "cavalos de Troia".

Os lipossomos encapsulando as moléculas de clodronato (representadas como quadrados pretos), são ingeridos por macrófagos via endocitose. Após a fusão com os lisossomos (L) contendo fosfolipases (representadas como pontas de seta), ocorre o rompimento das bicamadas de lipossomos e liberação do clodronato dentro da célula. As células são mortas por apoptose induzida pelo clodronato. (N = núcleo do macrófago).

Fonte: <http://clodronateliposomes.org/>

Isso provavelmente ocorre, pois uma vez no citosol, o clodronato é reconhecido equivocadamente como um pirofosfato celular e acabam produzindo um análogo de ATP não hidrolisável, a adenosina 5'-(β,γ - diclorometileno) trifosfato. O mecanismo exato como esse metabólito provoca a morte celular não é ainda bem esclarecido. Lehenkari e colaboradores (2002) propuseram que a adenosina 5'-(β,γ - diclorometileno) trifosfato atravessa a membrana mitocondrial externa e se liga irreversivelmente à enzima ATP/ADP translocase, levando a abertura de poros da membrana interna mitocondrial e acarretando na despolarização (Figura 1.9). Isso permitiria que os sinais moleculares liberados da mitocôndria iniciassem o processo de apoptose.

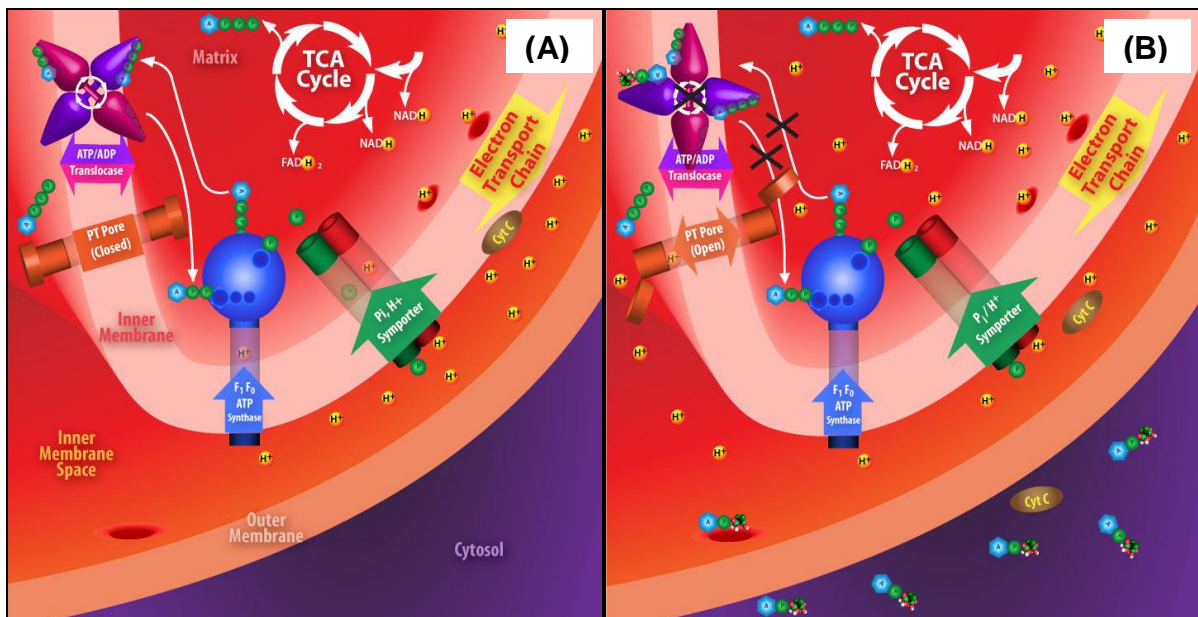


Figura 1.9: Comparação do funcionamento normal da enzima ADP/ATP translocase (A) e do possível mecanismo do clodronato na mitocôndria (B).

(A) ADP/ATP translocase normalmente transporta uma ADP, do citosol (através do espaço interno da membrana) para a matriz mitocondrial, para cada ATP transportado a partir da matriz em que se difunde através da membrana interna para o espaço do citosol. (B) A inibição irreversível da ADP/ATP translocase interrompe a cadeia de transporte de elétrons devido à despolarização da membrana interna. Alguns componentes da cadeia transportadora de elétrons interrompida, tal como o citocromo C, migram para o citosol e iniciam o processo de apoptose.

Fonte: <http://www.clodrosome.com/other-info/mechanism-of-depletion/>

Para obter êxito com essa abordagem, os LC devem ser capazes de alcançar os macrófagos a serem eliminados nos tecidos em que estão localizados. Deve ser considerado que o LC não atravessa barreiras vasculares - paredes capilares, porém lipossomos inferiores a 200nm podem escapar dos vasos sanguíneos em áreas onde mediadores inflamatórios induziram o endotélio a permitir extravasamento de proteínas grandes e células inflamatórias. Dependendo do local da administração, os macrófagos podem ser depletados no fígado (células de Kupffer), baço (diferentes subpopulações de macrófagos), pulmão (somente os alveolares), cavidade peritoneal, linfonodos, articulações (células de revestimento sinovial fagocíticas), testículo, vagina, etc (van Rooijen, 2006).

Dentre as diversas vias de administração utilizadas, a intravenosa é usada em quase metade dos estudos publicados sobre LC, de acordo com levantamento realizado pela empresa *Encapsula Nano Science* (<http://www.clodrosome.com/>). A administração sistêmica de LC por via intravenosa pode induzir à depleção muito eficiente de macrófagos esplênicos e hepáticos (figura 1.10) dentro de 24 horas e duas administrações consecutivas em um intervalo de dois dias foram suficientes para conseguir uma depleção quase total dos macrófagos da medula óssea (van

Rooijen, van Nieuwmegen, 1984; van Rooijen, Kesteren-Hendriks, 2003). Quando cessadas as administrações, a repopulação dos macrófagos nos órgãos varia: células de Kupffer inicia em 5 dias, já os macrófagos do baço dependem da região, macrófagos da polpa vermelha levam de sete a dez dias, macrófagos metalofílicos marginais de duas a três semanas e macrófagos da zona marginal mais de um mês (van Rooijen, van Nieuwmegen, 1989; van Rooijen *et al*, 1990; Biewenga *et al*, 1995).

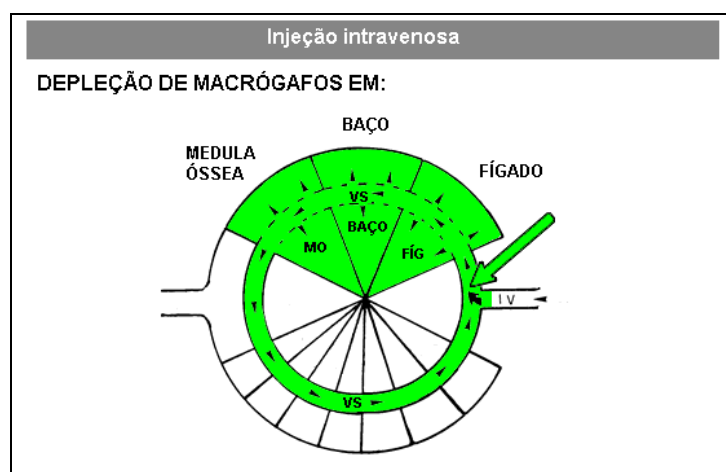


Figura 1.10: Esquema mostrando os alvos do LC quando administrado por via intravenosa (IV). O LC por meio da circulação sanguínea (VS – vasos sanguíneos) chega aos órgãos alvos e afeta macrófagos do baço, fígado (FIG) e medula óssea (MO).
Fonte: Modificado de <http://www.clodronateliposomes.org/>.

Trabalhos realizados ao longo de mais de duas décadas demonstraram as propriedades da redução de macrófagos por meio do LC em estudos de modelos de desordem mediadas por autoanticorpos como anemia hemolítica autoimune, artrite reumatoide, doenças oculares, rejeição de transplante, desordens neurológicas como a esclerose múltipla, terapia gênica, investigação das atividades do macrófago *in vivo*, dentre outros (van Rooijen, Kesteren-Hendriks, 2002; van Rooijen, Kesteren-Hendriks, 2003; Kim *et al*, 2008; Mathes *et al*, 2006; Honda *et al*, 2013; Nikbakht *et al*, 2013).

Por outro lado, não há muitos estudos utilizando a abordagem de depleção de macrófagos com uso de LC em modelos de malária. Em busca realizada no Pubmed na primeira semana de abril do presente ano, foram encontrados apenas três trabalhos.

Baer e colaboradores (2007b) utilizaram o modelo camundongo op/op homocigóticos (conhecidos por terem poucas células de Kupffer) / *P. yoelii* comparando ao uso de LC (doses de LC, LPBS - lipossomo-PBS - e PBS por via intraperitoneal ou intravenosa) a fim de auxiliar a elucidar a relação da célula de

Kupffer com a passagem e permanência do esporozoítio no fígado. Os resultados obtidos sugeriram que a infecção por esporozoítios no fígado normal ocorreria por células de Kupffer. Em camundongos op/op, a redução drástica do número de células de Kupffer prejudicaria a entrada de esporozoítios. Nos animais que receberam LC, a remoção de células de Kupffer facilitaria a entrada de esporozoítios para o fígado por meio da criação de aberturas na camada de células sinusoidais. Segundo os pesquisadores, os dados fornecem apoio para a hipótese de que as células de Kupffer podem atuar como porta de entrada aos esporozoítios e possuem papel crítico para a infecção.

Arnold e colaboradores (2010, 2011), otimizaram um modelo murino para *P. falciparum*. Já havia sido demonstrado que é possível a obtenção de um crescimento de *P. falciparum* em camundongos com deficiência genética utilizando enxertos de eritrócitos humanos (Badell *et al*, 2000; Moreno *et al*, 2001).

Com o objetivo de obterem maior reprodutibilidade nos resultados em testes de novos medicamentos e vacinas contra a malária, Arnold e colaboradores (2010) conduziram um estudo para otimização do modelo. Foi avaliada a via intravenosa para para inoculação de hemácias humanas e *P. falciparum* em vez da via intraperitoneal. Para isso, foram testados vários imunossupresores, incluindo o LC, utilizando camundongos imunodeprimidos como os NSG (com deficiência de IL - 2Rc). Os resultados mostraram que o modelo camundongos NSG injetados com LC e inoculação de hemácias parasitadas humanas por via intravenosa produziu um modelo confiável e relevante para pesquisa em malária.

Em estudo realizado em 2011, camundongos NOD/SCID foram submetidos a um protocolo imunomodulador que incluía LC para depleção de macrófagos e anticorpos anti-células polimorfonucleares. Os animais foram enxertados com hemácias humanas parasitadas e *P. falciparum*. Foi realizada uma análise sistemática e cinética da imunidade inata que inclui a contagem e fenotipagem de leucócitos do sangue periférico e citocinas inflamatórias/quimiocinas lançados na circulação periférica. A resposta inata ao *P. yoelii* foi utilizada como controle. Apesar da utilização do um tratamento imunomodulador, camundongos NOD/SCID imunodeficientes ainda foram capazes de mobilizar respostas inatas substanciais oferecendo novas perspectivas sobre a capacidade da reposta inata de animais imunodeficientes para controlar xenotransplantes de células e patógenos humanos.

Os três trabalhos envolviam modelos murinos, que podem ser usados em estudos de interação parasito-hospedeiro e mecanismo de defesa inclusive contra o *P. falciparum* em camundongos humanizados.

Não foi encontrado nenhum trabalho com o uso de LC em estudos em modelos de primatas não humanos em busca realizada no PubMed com os descritores: “clodronate liposome saimiri”, “clodronate liposome aotus”, “clodronate liposome rhesus”, “clodronate liposome macaca”, “clodronate liposome non human primates” e “clodronate liposome monkey”, os dois últimos limitando o período de busca nos últimos 10 anos.

1.2 Justificativa

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2004), a infecção experimental de macacos *Saimiri* spp e *Aotus* spp. por plasmódios humanos corresponde ao melhor modelo disponível na atualidade para a avaliação de vacinas antimaláricas em fase pré-clínica. Esses primatas, filogeneticamente próximos ao homem, toleram a infecção experimental por plasmódios humanos, embora necessitem, para isso, serem esplenectomizados. Assim, a administração de lipossomo-clodronado (LC), capaz de induzir à depleção de macrófagos em outros modelos experimentais, poderia dispensar a esplenectomia de primatas neotropicais *S. sciureus* permitindo a avaliação pré-clínica de vacinas antimaláricas em modelo ainda mais próximo da situação humana e proporcionando a seleção de formulações aperfeiçoadas para posteriores ensaios clínicos em humanos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do lipossomo-clodronato (LC) no curso da infecção plasmodial em primatas neotropicais *Saimiri sciureus*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a sensibilidade dos macrófagos de *S. sciureus* ao LC;
- Avaliar o efeito da administração de LC (“esplenectomia química”) no curso da infecção plasmodial de primatas *S. sciureus* para estabelecer infecções reprodutíveis;
- Estudar o efeito da administração de LC na resposta imune de primatas *S. sciureus* infectados ou não pelo *Plasmodium falciparum*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Neste trabalho foram utilizados primatas neotropicais da espécie *Saimiri sciureus* com idade superior a três anos de idade. Os animais foram fornecidos pelo Serviço de Criação de Primatas Não-Humanos (SCPrim)/ Centro de Criação de Animais de Laboratório (Cecal) – Fiocruz, e mantidos no Infectório de Experimentação de Primatas do Cecal. Os macacos foram oriundos da colônia de reprodução da própria instituição. Todos os animais passaram pelo teste cutâneo para tuberculose e tiveram seu sangue testado por imunofluorescência indireta e ELISA para a presença de anticorpos antiplasmodiais. Os animais permaneceram em gaiolas individuais em ambiente com controle de iluminação e temperatura. A água foi *ad libitum* e a comida ofertada duas vezes ao dia durante todo o período do experimento, exceto nos dias de administração de lipossomo-clodronato em que os animais passavam por período de jejum de cerca de 12 horas antes das mesmas para evitar efeitos adversos da anestesia geral. Os animais foram mantidos sob as mesmas condições de manejo durante todo o experimento.

3.2 Lipossomo-clodronato (LC)

A suspensão de LC em PBS (5 mg clodronato/ mL suspensão) foi obtida da ClodronateLiposome.com (Department of Molecular Cell Biology and Immunology of the Vrije Universiteit Medisch Centrum - University Amsterdam, VUmc - Holanda).

3.3 Parasitos

A cepa FUP de *Plasmodium falciparum* (cedida gentilmente pelo Doutor Thierry Fandeur, Instituto Pasteur da Guiana Francesa - IPG) foi utilizada nos experimentos. Esta cepa (FUP-IPG) foi adaptada em *S. sciureus*, em 1997 no Instituto Evandro Chagas, em Belém, onde foi nomeada FUP-IEC. Para realizar a passagem, esta cepa foi utilizada sistematicamente em animais esplenectomizados “naives”. A cepa FUP-IEC foi recebida no Instituto Oswaldo Cruz onde encontra-se

disponível e mantida à -196°C no Laboratório de Pesquisas em Malária do IOC, Fiocruz.

3.4 Desenho experimental

3.4.1 Ensaio do efeito do LC *in vitro*

Para avaliar o efeito *in vitro* do LC em monócitos/macrófagos de *Saimiri* foram utilizados esplenócitos criopreservados obtidos de uma esplenectomia prévia de três animais “naive” (animais 24, 149 e PA51). As células foram descongeladas, lavadas duas vezes com RPMI puro (Gibco), ressuspensas em RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, W.L. Imunoquímica), e a contagem feita em hemocítmetro (Bright Line, Electron Microscopy Sciences) com auxílio do microscópio Olympus BH2 (Olympus). As células foram ressuspensas a uma concentração de 5×10^5 células/500 μ L e incubadas em tubos para cultura de 14 mL (Falcon, BD) em meio RPMI [contendo 15 mM de glutamina (Gibco), 10 mM HEPES, 200 U/mL penicilina (Gibco), 200 μ g/mL estreptomicina (Gibco), 3 mg/mL de gentamicina (Sigma) e 2 g/L de bicarbonato de sódio (Grupo Química) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (W.L. Imunoquímica)] com suspensão de LC nas concentrações de 1 μ g/mL, 10 μ g/mL e 100 μ g/mL diluído no meio de cultura ou somente em meio de cultura (branco) de 4 a 24 horas à 37°C e 5% CO₂. As células foram marcadas 0 (*ex vivo*), 4, 8, 16, 24 h após cultura, e quantificadas por citometria de fluxo usando CD14-APC (clone 61D3, EBioscience), marcador de macrófagos e monócitos, no equipamento Cyan (Dako Cytomation) e os dados foram analisados usando o “software” Summit (Dako Cytomation).

3.4.2 Experimento piloto do efeito do LC em *S. sciureus* e no curso da infecção plasmoidal

Em um primeiro experimento foram utilizados dois *S. sciureus* não esplenectomizados (intactos), fêmeas, com cerca de três anos de idade. A fim de avaliar a inocuidade do LC, foi inoculado, em um dos animais, 1 mL de suspensão de LC e, no outro, 1 mL de PBS (controle), via intraperitoneal nos dias 0, 3, 7 e 10, (primeira série de administrações). A via intraperitoneal foi usada, pois mostrou-se eficaz para depleção de macrófagos peritoneais, hepáticos e esplênicos em outros modelos animais, como ratos e camundongos (Soesatyo *et al*, 1991; Biewenga *et al*,

1995; Arnold *et al*, 2010) e por ser uma via mais prática que a intravenosa. O acompanhamento foi realizado pela aferição da temperatura retal basal periódica, observação clínica diária e leucograma diferencial para acompanhar principalmente o nível de monócitos/macrófagos.

Após um mês, o curso da infecção plasmodial foi avaliado, nos mesmos animais. No dia 0, os animais foram infectados com inóculo contendo 10^6 hemácias parasitadas com cepa FUP de *P. falciparum*. Em um dos animais foi inoculado 1mL de suspensão de LC e no outro 1 mL de PBS (1x) (Sigma), via intraperitoneal nos dias 0, 3, 7, 10, 14, 17 e 21 após infecção (segunda série de administrações), conforme Figura 3.1. O acompanhamento foi realizado através da observação clínica, aferição do peso e da temperatura retal basal, verificação da parasitemia e do hematócrito. Após três semanas de infecção, os animais foram tratados com mefloquina (dose única 15 mg/kg). Os animais foram eutanasiados quatro dias após a última administração.

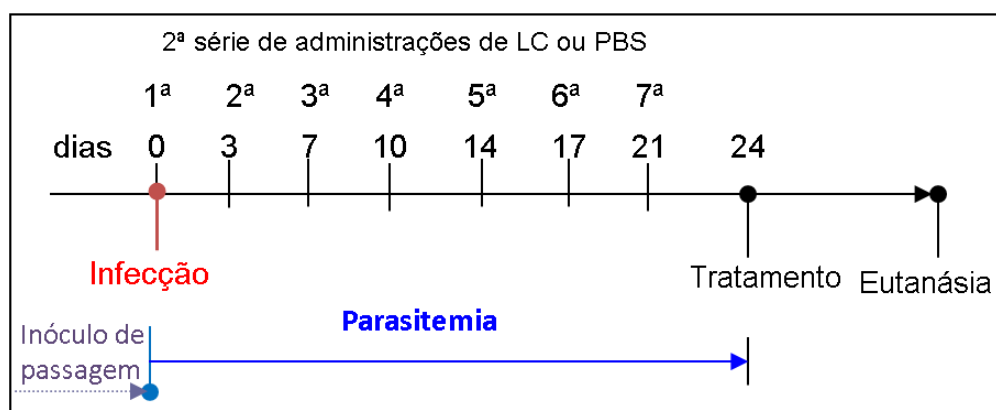


Figura 3.1: Esquema de administrações de LC ou PBS a partir do dia 0 de infecção – Experimento piloto.

3.4.3 Efeito da administração de LC no curso da infecção de *S. sciureus* por *P. falciparum* e na contagem de células CD14

Com o intuito de avaliar o efeito da administração de lipossomo-clodronato no curso da infecção de *P. falciparum* foram realizados dois experimentos. As administrações de LC foram feitas pela via intravenosa.

EXPERIMENTO 1 (E1)

No primeiro experimento, foram utilizados **seis animais** adultos intactos divididos em dois grupos grupos de três animais: **grupo I (1 mL PBS – controle, Pf-PBS)** e **grupo II (1 mL LC, Pf-LC1)** (Tabela 3.1). Os animais foram infectados com

inóculo de 10^6 hemácias parasitadas com cepa FUP de *P. falciparum* no dia 0. Foram administradas seis injeções de 1 mL por via intravenosa (veia femoral ou safena, alternando as pernas) nos dias 0, 3, 7, 10, 14 e 17, como pode ser observado na Figura 3.2.

O acompanhamento foi realizado por meio de observação clínica, aferição do peso e da temperatura retal basal, verificação da parasitemia, do hematócrito, do nível de hemoglobina, além de leucograma diferencial e citometria de fluxo de sangue total com marcação CD14-APC (clone 61D3, EBioscience) para avaliar a depleção de monócitos.

Tabela 3.1: Distribuição dos animais nos grupos de acordo com as injeções administradas – Experimento 1 (E1).

GRUPOS	CÓDIGO	SEXO	IDADE (anos)
Grupo I (controle) – PBS (Pf-PBS)	141	Masculino	15
	216	Feminino	15
	212	Feminino	17
Grupo II - suspensão LC (Pf-LC1)	161	Masculino	15
	272	Feminino	12
	184	Feminino	18

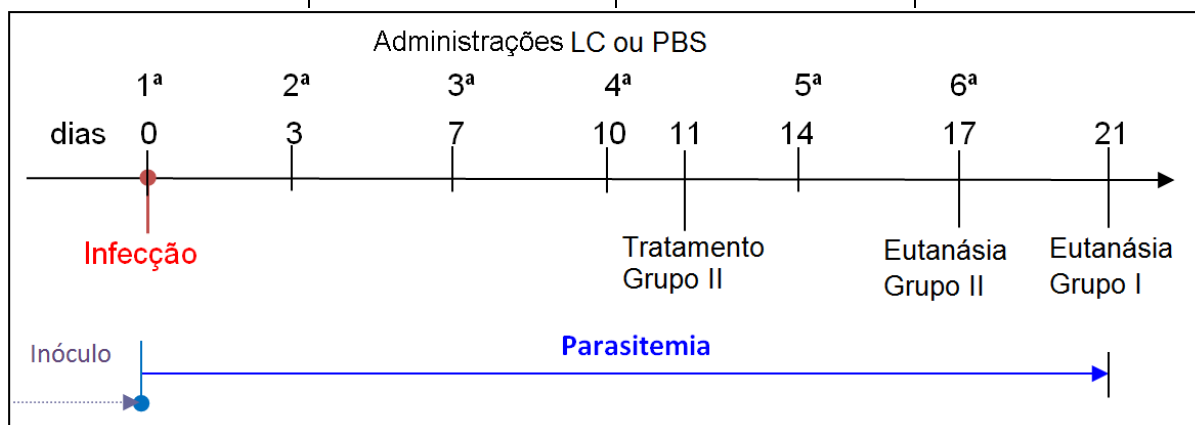


Figura 3.2: Esquema de administrações de LC ou PBS a partir do dia 0 de infecção – Experimento 1 (E1).

Após o tratamento ou a cura espontânea, os animais receberam mais uma injeção de PBS ou LC e três ou quatro dias após a última administração foram eutanasiados e tiveram o baço e o fígado coletados. O fígado e metade do baço foram conservados em formalina em tampão *Millonig* para realização de exames histológicos a fim de estimar a depleção de macrófagos e alterações teciduais. A outra porção do baço foi armazenada em tubo de 50 mL com meio RPMI (Gibco) + 10% SFB (W.L. Imunoquímica) para isolamento e criopreservação de esplenócitos.

As células isoladas, além de esplenócitos criopreservados obtidos de esplenectomias anteriores de animais “naives” (controles), foram utilizadas em experimento *in vitro* de expressão de citocinas após estimulação com mitógenos e antígenos a fim de avaliar a reatividade de células esplênicas de animais inoculados com LC.

EXPERIMENTO 2 (E2)

Um segundo experimento foi conduzido para avaliar a reprodutibilidade do primeiro e para testar um volume menor de LC. Foram utilizados **catorze animais** intactos divididos em seis grupos (Tabela 3.2) sendo três **não infectados (NInf)** – **grupo I (1 mL PBS, Ninf-PBS)**, **grupo II (0,5 mL LC, Ninf-LC0,5)**, **grupo III (1 mL LC, Ninf-LC1)** – e três grupos **infectados (Pf)** com inóculo de 10^6 de cepa FUP de *P. falciparum* no dia 0: **grupo IV (1 mL PBS, Pf-PBS)**, **grupo V (0,5 mL LC, Pf-LC0,5)**, **grupo VI (1 mL LC, Pf-LC1)**, conforme tabela 3.2. As administrações de PBS ou LC (0,5 mL diluído para 1 mL, ou 1 mL) foram realizadas nos dias 0, 3, 7, 10, 14, 17 e 21 (Figura 3.3).

Tabela 3.2: Distribuição dos animais nos grupos de acordo com as injeções administradas – Experimento 2 (E2).

	GRUPOS	CÓDIGO	SEXO	IDADE (anos)
NÃO-INFECTADOS	Grupo I – PBS (Ninf-PBS)	PA11	Masculino	4
		PA67	Masculino	4
	Grupo II – 0,5 mL LC (Ninf-LC0,5)	V3	Masculino	5
		PB43	Masculino	3
	Grupo III – 1,0 mL LC (Ninf-LC1)	PA75	Masculino	4
		R11	Masculino	8
INFECTADOS	Grupo IV – PBS (Pf-PBS)	PA3	Masculino	4
		PA65	Masculino	4
	Grupo V – 0,5 mL LC (Pf-LC0,5)	PA111	Masculino	4
		PA37	Masculino	4
		PA97	Masculino	4
	Grupo VI – 1,0 mL LC (Pf-LC1)	V17	Masculino	5
		PA47	Masculino	4
		PA5	Masculino	4

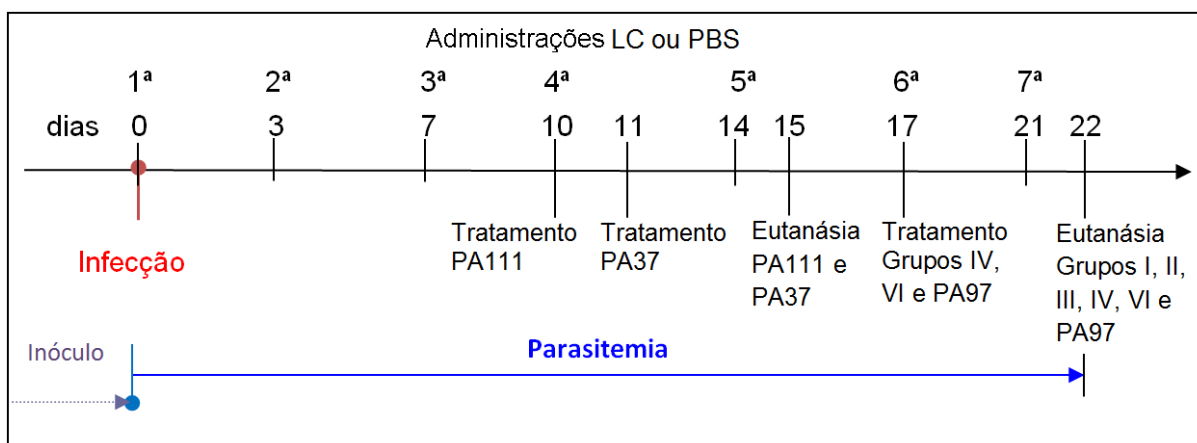


Figura 3.3: Esquema de administrações de LC ou PBS a partir do dia 0 de infecção – Experimento 2 (E2).

O acompanhamento foi realizado por meio de observação clínica, aferição do peso e da temperatura retal basal, verificação da parasitemia, hematócrito, nível de hemoglobina, além de citometria de fluxo com marcação CD14-APC (clone 61D3, EBioscience) para avaliar a depleção de monócitos.

Após o tratamento ou cura espontânea, os animais receberam mais uma injeção de PBS ou LC e vinte e quatro horas depois da última administração, foram eutanasiados e tiveram o baço e o fígado coletados. A maior parte do fígado e um terço do baço foram conservados em formalina em tampão *Millonig* para realização de exames histológicos a fim de determinar a depleção de macrófagos e alterações teciduais. Uma pequena porção do fígado e um terço do baço foram criopreservados em nitrogênio líquido. A outra porção do baço foi armazenada em tubo de 50 mL com meio RPMI (Gibco) + 10% SFB (W.L. Imunoquímica) para isolamento e criopreservação de esplenócitos.

3.5 Aspectos éticos da pesquisa

O projeto foi aprovado pelo CEUA da Fiocruz pelas Licenças de números 62/2008 e 9/2014 (Anexos 1 a 3).

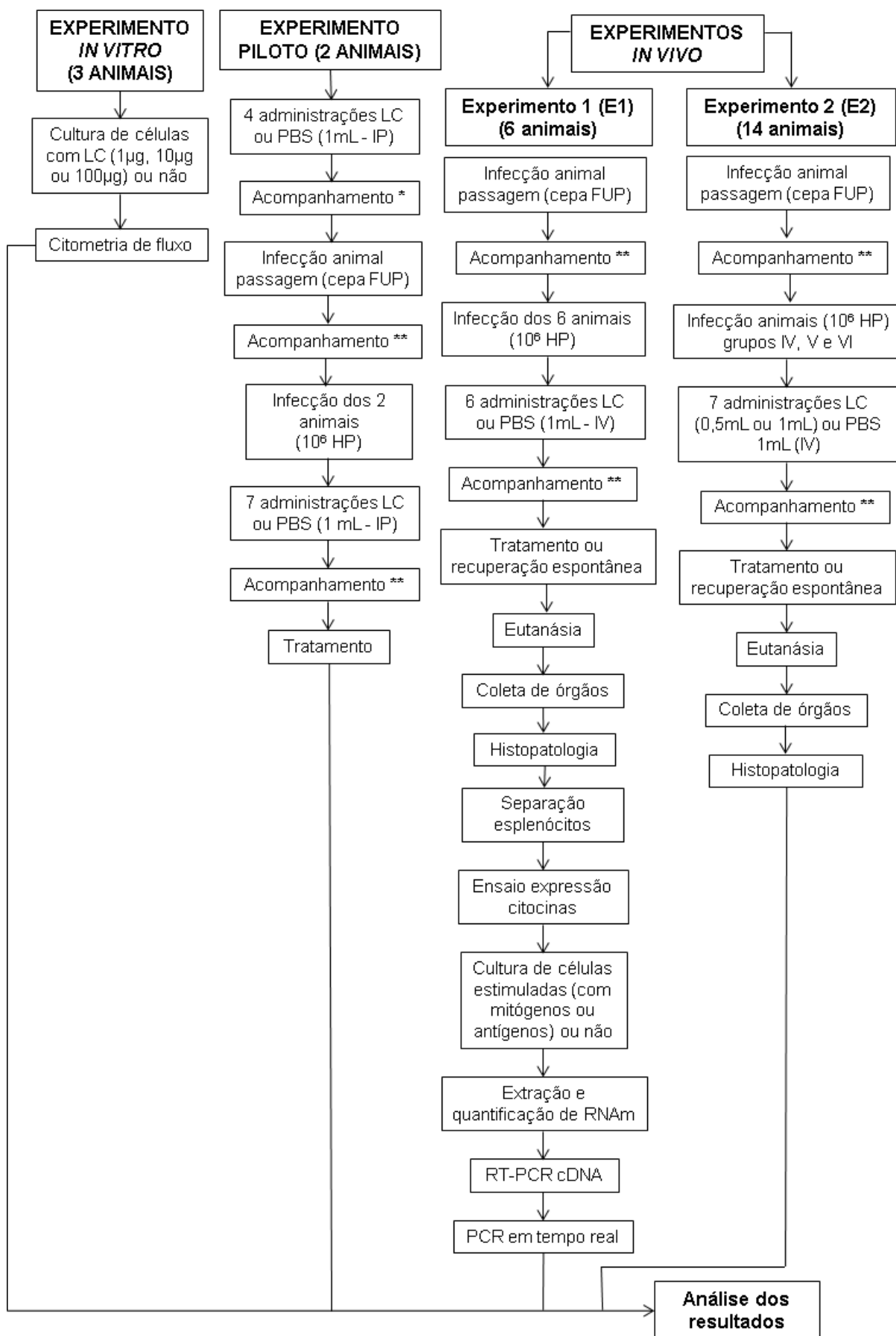


Figura 3.4: Resumo esquemático do trabalho.

* Acompanhamento do quadro clínico e hematológico.

** Acompanhamento da parasitemia e do quadro clínico e hematológico.

IP – intraperitoneal; IV – intravenoso.

3.6 Inóculos de *P. falciparum*

Para cada experimento de infecção, uma alíquota de hemácias parasitadas pela cepa FUP de *P. falciparum* foi retirada do nitrogênio líquido e colocada em banho-maria a 37°C por 5min para descongelamento. A alíquota foi transferida para um tubo de 15 mL, adicionada de 100 µL de solução de NaCl 12%, homogeneizada suavemente e deixada em repouso por 5 min. Adicionou-se, em seguida, 9 mL de solução de NaCl 1,6% gota a gota lentamente com agitação suave dos tubos. Centrifugou-se o tubo por 10 min a 1500 RPM. O sobrenadante foi retirado e adicionou-se a solução de NaCl a 0,9% + 0,2% glicose da mesma forma que a solução anterior. Centrifugou-se o tubo por 10 min a 1500 RPM. O sobrenadante foi retirado e ressuspendeu-se as hemácias com 0,5 mL de PBS.

Um animal esplenectomizado, devidamente anestesiado e foi infectado com a alíquota descongelada e, após cerca de dez dias de infecção ou quando a parasitemia atingiu cerca de 10%, com predominância dos estágios em anel e trofozoítos jovens, 3 mL de sangue do animal foi colhido por punção cardíaca, com o animal devidamente submetido à anestesia profunda. Em seguida, a papa de hemácias foi separada e lavada com PBS (1x) (Sigma). Foi calculada a parasitemia e a hematimetria em câmara de Neubauer de modo a ajustar a concentração de hemácias parasitadas contidas nos inóculos desejados em 500 µL ou 800 µL de salina estéril. As infecções foram feitas por via intravenosa (veia femoral) com agulha 25x7.

3.7 Manejo e anestesia

Antes das colheitas de sangue e/ou inoculações, foi feita a antissepsia do local com gaze e álcool 70%. O sangue para acompanhamento de parasitemia, hematócrito, hemoglobina e contagem de CD14 foi colhido, algumas gotas, diretamente da planta do pé do animal com uma lanceta estéril, alternando os pés em cada coleta. Nos dias em que os animais receberam LC e/ou inóculo de *P. falciparum*, estes foram anestesiados com cloridrato de cetamina (10 mg/kg) e midazolam (0,2 mg/kg) administrados no músculo externo da coxa do animal (região vasto lateral), em volume de 100 µL, com agulha 20x5,5. Após a anestesia dos animais, o manejo foi realizado sobre colchões térmicos para evitar hipotermia. Os procedimentos de inoculação, infecção, colheita de sangue, eutanásia e colheita de

órgãos foram realizados no contêiner de experimentação de primatas não-humanos do SCPrim. O manejo dos animais foi realizado sempre sob supervisão da médica veterinária Doutora Márcia Cristina Ribeiro Andrade, que realizou os procedimentos invasivos (anestesia, inoculações, coleta de sangue intravenoso, esplenectomia, eutanásia,...).

3.8 Acompanhamento e avaliação durante infecção

3.8.1 Parasitemia

A infecção foi comprovada e monitorada por meio de exame microscópico em distensão sanguínea. A distensão foi corada com kit Panótico Rápido (Laborclin). A parasitemia foi quantificada pelo método de avaliação pelo percentual de hemácias parasitadas adaptado do Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária, página 51 (MS, 2009). Foi contado o número de campos até alcançar ou ultrapassar o número de 1000 hemácias (geralmente 5 campos) e simultaneamente o número de hemácias parasitadas. Calculou-se, então, uma regra de três simples para obter a parasitemia percentual. As colheitas e os exames foram realizados a partir do dia 3 pós-infecção, inicialmente três vezes por semana, mas com aumento da parasitemia (a partir de 3%), passou a ser examinada diariamente.

3.8.2 Hematócrito

Para avaliar o hematócrito, o sangue capilar foi colhido diretamente do pé do animal em tubos capilares para microhematócrito. Esses tubos foram centrifugados em microcentrífuga modelo SH120-1 (Coleman) por 10 min a 12000 RPM. A leitura foi realizada com a régua que acompanha o equipamento.

3.8.3 Hemoglobina

Para avaliar a variação no nível de hemoglobina, foi utilizado o sistema HemoCue Hb301. O sangue capilar foi colhido diretamente do pé do animal na microcuveta que era inserida no aparelho para leitura, conforme instruções do fabricante.

3.8.4 Leucograma diferencial

Os exames de leucograma eram realizados por meio de distensão sanguínea corada utilizando a solução Giemsa (Laborclin). Após fixação das lâminas com metanol, as distensões foram cobertas com a solução durante 20 min e o excesso retirado com água corrente. As lâminas foram encaminhadas para o SCQA/Cecal, via plataforma PDTIS, para leitura.

3.8.5 Quantificação de monócitos por citometria de fluxo

O sangue total foi colhido em uma micropipeta (cerca de 200 μ L), transferido para tubo Eppendorf com 500 μ L de PBS (Sigma) e homogeneizado. Posteriormente, os tubos foram centrifugados por 10 min a 1500 RPM (Centrifuge 5417R, Eppendorf). O sobrenadante foi retirado, mas era deixada uma pequena quantidade para ressuspender o “pellet”. O anticorpo CD14-APC (clone 61D3, EBioscience) foi adicionado aos tubos em quantidade previamente estabelecida e homogeneizados em vortex por 5 segundos em velocidade média. Os tubos foram incubados por 30 min em temperatura ambiente, no escuro. Foram adicionados 1000 μ L de solução de lise de hemácias (BD FACS Lysing solution, 1/10) e homogeneizados em vortex por 5 segundos em velocidade média. Os tubos foram incubados por 30 min em temperatura ambiente, no escuro. O conteúdo dos tubos foi lavado duas vezes adicionando-se 1 mL de PBS (1x), homogeneizado em vortex por 5 segundos em velocidade média, centrifugado por 10 min a 1500 RPM e retirado o sobrenadante. Após as lavagens, foram adicionados 300 μ L de solução de paraformaldeído 1% para ressuspender o “pellet” e a amostra foi mantida a 4°C até o momento da leitura. As aquisições foram realizadas no equipamento FACSAria (BD) no experimento I e no equipamento Cyan (Dako Cytomation) no experimento II. Os dados foram analisados no “software” Summit v.4.3 (Dako Cytomation).

3.9 Tratamento

Os animais que apresentaram parasitemia igual ou superior a 20% e/ou hematócrito inferior a 20% foram tratados com mefloquina (15 mg/kg), gentilmente fornecida pela Doutora Núbia Boechat (Farmanguinhos), por via oral (gavagem) em dose única, e acompanhados clínica e parasitologicamente até plena recuperação. Para monitorar cura laboratorial, avaliou-se a parasitemia, até a eliminação completa do parasito.

3.10 Eutanásia e colheita de órgãos

Os animais receberam medicação anestésica, sendo sedados com 10 mg/kg de cloridrato de cetamina + 0,2 mg/kg de midazolam por via intramuscular. Uma vez induzida a anestesia, foi feita a punção cardíaca com a utilização de uma seringa de 20 mL e agulha (40x12) heparinizadas. Uma vez coletados pelo menos 10 mL de sangue, o animal foi eutanasiado com 5-7 mg/kg de tiopental inoculado diretamente no músculo cardíaco. O único método recomendado para eutanásia de primatas não-humanos recomendado é a *overdose* de anestésicos. Pentobarbital sódico intravenoso é o agente mais indicado, sendo a dose usual recomendada de 25 mg/kg. Esse procedimento está de acordo com as recomendações do guia: "Laboratory Animals: recommendations for euthanasia of experimental animals" (Close *et al*, 1997). Após a morte do animal, foi realizada a colheita de órgãos (fígado e baço), sendo os mesmos encaminhados para processamentos diversos, como para histopatologia ou para obtenção de células para experimentos *in vitro*.

3.11 Procedimentos histopatológicos

Os procedimentos histopatológicos foram realizados em colaboração com o Laboratório de Patologia – IOC, sob a supervisão do Doutor Marcelo Pelajo Machado.

3.11.1 Preparação das amostras

O material foi clivado em seções de cerca de 0,5 cm e colocado em cassetes devidamente identificados e fixados em formalina por 24 horas. Após a fixação, os cassetes foram lavados por cerca de 1 hora em água corrente e processados manual ou automaticamente. O processamento automático foi realizado no processador de tecido do tipo transferência de fluidos modelo Excelsior ES (ThermoScientific). Em ambos os métodos, foi utilizado álcool etílico em concentrações crescentes (50%, 70%, 95% e absoluto) para desidratação, xilol para clarificação e cera de parafina para infiltração. Concluído o processamento, os cassetes foram transferidos para central de inclusão modelo Histocentre 2 (Shandon) onde foram preparados os blocos de parafina, que - após resfriamento -

foram retirados das formas. Posteriormente foi realizada microtomia dos blocos (Leica RM2125 RT, Leica Biosystems Nussloch GmbH) e preparação das lâminas.

3.11.2 Coloração H&E

A coloração de H&E foi realizada pra análise da morfologia dos tecidos. As lâminas foram desparafinizadas com auxílio de xilol (três banhos de 3 min cada) e gradualmente hidratadas com álcool etílico em concentrações decrescentes (100%, 90%, 70% - 3 min cada) até a água destilada. As lâminas foram imersas em hematoxilina de Mayer por 20 min e lavadas em água corrente por 25 min. Iniciou-se a desidratação em álcool a 70% por 3 min, e em seguida, as lâminas foram imersas em eosina-floxina por 2 min. As lâminas foram lavadas em álcool etílico em concentrações crescentes e em xilol, para desidratar e clarificar novamente, e foram montadas.

3.11.3 Coloração de Perls ou azul da Prússia

A coloração de Perls foi realizada para marcação de ferro nas células na forma de ferritina ou hemossiderina, pois o corante azul da Prússia se liga aos sais ferrosos dos tecidos (valência Fe^{2+}) aparecendo em azul, mas não ao pigmento malárico (hemozoína, valência Fe^{3+}), que aparece em castanho na leitura ao microscópio. Isso ajuda a avaliar o metabolismo do ferro e, indiretamente, a identificar a presença de macrófagos. Após a desparafinização e hidratação, as lâminas foram imersas em solução de ferrocianeto de potássio 5% por 5 min, e depois em solução de ferrocianeto de potássio 5% - ácido clorídrico 10% por 20 min. As lâminas foram lavadas em água destilada por 3 min com duas trocas. Em seguida, as lâminas foram coradas com vermelho rápido nuclear ou solução Kernechtrot (Sigma) por 5 min e lavadas em água destilada. As lâminas foram lavadas em álcool etílico em concentrações crescentes e em xilol, para desidratar e clarificar novamente, e foram montadas.

3.11.4 Análise das lâminas e captação de imagens

As lâminas foram analisadas com auxílio de Microscópio Axiolmager A2 (Zeiss) e as imagens foram captadas utilizando a câmera Axiocam HRm (Zeiss) e o “software” Axionvision Release 4.8.2 (Zeiss).

3.12 Ensaios laboratoriais

3.12.1 Cultivo de *P. falciparum* (cepa FUP)

Para obtenção de hemácias parasitadas, para a utilização posterior no cultivo de esplenóticos, a cepa FUP de *P. falciparum* foi cultivada de acordo com o método de Trager & Jensen (1976). O cultivo foi realizado em eritrócitos de um *Saimiri* “naive”, a partir de 4 mL de sangue total coletado por punção venosa (veia femoral) em heparina. O concentrado de hemácias foi separado por gradiente de histopaque-1077 (Sigma), lavado três vezes em RPMI puro (Gibco) a 1500 RPM por 10 min e ressuspenso para 10 mL em RPMI puro. Os parasitos foram cultivados em um hematócrito de 6% em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco), tamponado com 25 mM de HEPES (Sigma), suplementado com 0,2% de glicose (Sigma), 0,18 mM de hipoxantina (Sigma), 23 mM de bicarbonato de sódio e 40 µg/L de gentamicina (Gibco) e enriquecido com 10% de soro humano normal tipo AB e fator Rh⁺, inativado a 56°C durante 30 min (meio completo). Os parasitos foram cultivados a 37°C em garrafas de cultura (Corning), contendo uma mistura ideal de gases (5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂ – White Martins). A avaliação do percentual de hemácias parasitadas e a troca do meio de cultura foram realizadas diariamente.

3.12.2 Isolamento, quantificação, congelamento e descongelamento de esplenócitos

Na capela de fluxo laminar, a porção do baço coletada em meio RPMI (Gibco) + 10% SFB (um terço do órgão) foi transferida para outro tubo de 50 mL contendo meio RPMI-1640 + 10% SFB estéril para realizar a lavagem do órgão. O meio foi desprezado e o baço colocado sobre “peneira” (*cell strainer*, BD) devidamente encaixada em um tubo de 50 mL. O fragmento foi esmagado com a parte interna de uma seringa estéril. Adicionou-se aos poucos meio RPMI + 10% SFB sobre o macerado para facilitar a passagem das células pela “peneira”. Repetiu-se esse passo até que não houvesse mais pedaços do órgão. Adicionou-se meio à suspensão de células até completar 20 mL. A suspensão foi centrifugada à 1500 RPM por 10 min a 4°C (centrífuga Megafuge 2.0R, Heraeus Instruments). O meio foi desprezado deixando somente o “pellet”. Foi adicionado 3 mL de solução de lise de hemácias (BD) e incubado durante 5 min à 37°C. Lavou-se três vezes em RPMI-1640 ou PBS (1x) (Sigma). As células foram ressuspendidas para um volume de 1 mL.

Após lavagem, as células foram contadas da seguinte maneira: uma solução estoque de 1 mg/mL do corante azul de tripan (Gibco) foi preparada e armazenada à temperatura ambiente até o momento de uso. Cinco microlitros da suspensão celular foram adicionados a 95 µL da solução corante (45 µL azul de tripan + 50 µL de PBS 1x ou RPMI puro), sendo a diluição celular final de 1:20. Dessa diluição, 10 µL foram aplicados em um hemocitômetro (câmara de Neubauer – Bright Line, Electron Microscopy Sciences) e procedeu-se a contagem das células com auxílio do microscópio óptico com lente de 40x (Olympus BH2, Olympus). Após contagem, o número de células foi multiplicado pelo fator da câmara (10^4) e pelo fator de diluição resultando no número total de células/mL de suspensão.

As células foram ressuspensas e criopreservadas em alíquotas contendo 1×10^7 células em 1 mL da solução de criopreservação (90% SFB + 10% DMSO). Os tubos foram colocados em criocontêiner, deixados por 3 horas a -20°C , 24 horas a -80°C e, após esse período, armazenados em nitrogênio líquido até o momento de uso.

O descongelamento foi realizado pela imersão dos tubos em banho-maria a 37°C , seguindo-se duas lavagens em meio RPMI 1640 a 4°C a 1500 RPM por 10 min.

3.12.3 Ensaio de expressão de citocinas

Os esplenócitos foram descongelados, contados, ressuspensos a uma concentração de $2,5 \times 10^5$ células/poço e cultivados em meio RPMI (contendo 15 mM de glutamina (Gibco), 10 mM HEPES, 200 U/mL penicilina (Gibco), 200 µ/mL estreptomicina (Gibco), 3 mg/mL de gentamicina (Sigma) e 2 g/L de bicarbonato de sódio (Grupo Química) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (W.L. Imunoquímica) em placas de 96 poços em triplicata incubadas a 37°C em atmosfera de 5% CO_2 . Para estudo da ativação, as células foram estimuladas ou não nas seguintes condições: a) 50-100 ng/mL PMA/ionomicina (Sigma), b) cultivo de cepa FUP de *P. falciparum* em hemácias de *S. sciureus* (20 hemácias parasitadas/célula), e c) hemácias de *S. sciureus* (o mesmo volume total usado em “b”). As células foram coletadas após 3 h, 6 h, 12 h, 24 h e 48 h de cultura.

O ensaio de expressão de citocinas foi realizado por meio da análise da expressão gênica por PCR em tempo real utilizando sistema “TaqMan Array Human Cytokine Plates” (Life Technologies) sob a supervisão das Doutoras Evelyn Kety Pratt Riccio e Lilian Rose Pratt Riccio.

Após a coleta, as células foram ressuspensas em solução de RNA “later” (Ambion), armazenadas a 4°C “overnight” e, em seguida, à temperatura de -20°C até a extração de RNA. O RNA foi extraído utilizando “PureLink RNA Mini Kit” (Ambion) de acordo com as instruções do fabricante. A partir do RNA foi realizada a síntese de cDNA correspondente, utilizando o kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription” (Applied Biosystems). A análise da expressão do gene foi realizada por PCR em tempo real utilizando placas de 96 poços (“TaqMan plates Human Cytokine Array 96 well” - Applied Biosystems) e o sistema “7500 Real Time PCR” (Applied Biosystems). As reações de PCR em tempo real foram realizadas com iniciadores diretos e reversos para detecção de: TNF, IL1A, IL2, IL10, IL12B, IL17A, IFNB1 (“primers” humanos – o fabricante não forneceu a sequência dos “primers” inventoriados) e IL4, IL5, IL6, IFNG1, LTA (“primers” de *Saimiri* – Tabela 3.3).

O controle interno das reações (controle endógeno) utilizado foi o transcrito do gene 18S.

Tabela 3.3: Iniciadores diretos e reversos, usados na detecção de transcritos e desenhados a partir de sequências de macacos *Saimiri*.

TRANSCRITO	INICIADORES	
IL4	Direto	GTCTCACCTCCCAACTGCTT
	Reverso	GCCGGCGCATGCTAAC
IL5	Direto	CAGCTGTGCACTGAAGAAATCTTTC
	Reverso	CCCTTGACAGTTTGGTTCTC
IL6	Direto	AGATGGATGCTTCCAATCTGGATTG
	Reverso	CAAACCCAAAAGACCAAGTGGTG
IFNG1	Direto	GGAGAGAGGAGGGTGACAGAAA
	Reverso	TCTTTTGGATGCTCTGGTTGTCTTT
LTA	Direto	TCTTCTCTGGGAAAGCCTACTCT

3.13 Análise estatística

Na análise dos resultados do experimento *in vitro* foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e análise *post hoc* pelo teste de Dunn. Para análise dos resultados do experimento 1 isoladamente (parasitemia, hematócrito, hemoglobina, temperatura, contagem de CD14 e tamanho dos baços) foram

utilizados os testes não paramétricos de Wilcoxon e Mann-Whitney. Para análise dos resultados do experimento 2 isoladamente (parasitemia, hematócrito, hemoglobina, temperatura, contagem de CD14 e tamanho dos baços), dos experimentos 1 e 2 agrupados e do ensaio de citocinas foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e análise de *post hoc* pelo teste de Dunn. Em todas as análises, foi considerado o nível de significância de 5% e os valores de área sob a curva dos gráficos.

Os programas utilizados para preparação dos gráficos e análise dos dados foram o OriginPro 8 (OriginLab) e GraphPad Prism 6 (GraphPad Software).

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do lipossomo-clodronato (LC) sobre a contagem de macrófagos/monócitos *in vitro*

O LC tem sido utilizado como indutor de apoptose rápida de monócitos/macrófagos *in vivo* e *in vitro*, principalmente em camundongos, mas ainda não há dados disponíveis sobre o efeito do LC em macrófagos de macacos.

No nosso estudo, os esplenócitos de primatas neotropicais *Saimiri sciureus* “naives” (animais 24, 49 e PA51) foram cultivados com PBS (controle) ou com diferentes diluições de LC, marcados com CD14-APC (marcador de superfície de macrófagos e monócitos), e avaliados por citometria de fluxo conforme descrito anteriormente. Foram analisados 60.000 eventos e a contagem de CD14-APC foi feita excluindo o “gate” de linfócitos a fim de aumentar a quantificação e descartar marcação inespecífica (Figura 4.1).

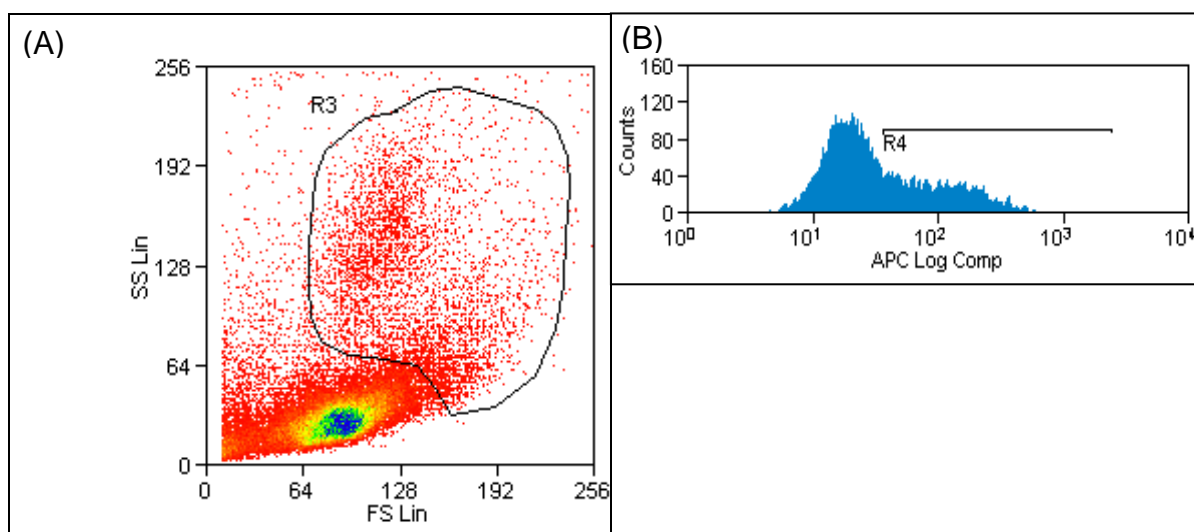


Figura 4.1: (A) “Dot plot” mostrando o “gate” de população de células analisadas. (B) Histograma representando a população de células que expressam CD14-APC.

No “dot plot”, a região de aquisição é identificada utilizando os parâmetros de tamanho (dispersão frontal da luz – SS) e de granulidade (dispersão lateral da luz – FS).

A adição de LC induziu uma citotoxicidade dose-dependente de monócitos/macrófagos induzindo uma depleção aparente em todas as concentrações, mas devido ao pequeno número de amostras a diferença foi significativa apenas na concentração de 100 µg/mL em relação ao branco em

qualquer dos tempos pesquisados - 4 h ($p= 0,0003$), 8 h ($p= 0,007$), 16 h ($p= 0,011$) e 24 h ($p= 0,0006$), conforme Figura 4.2.

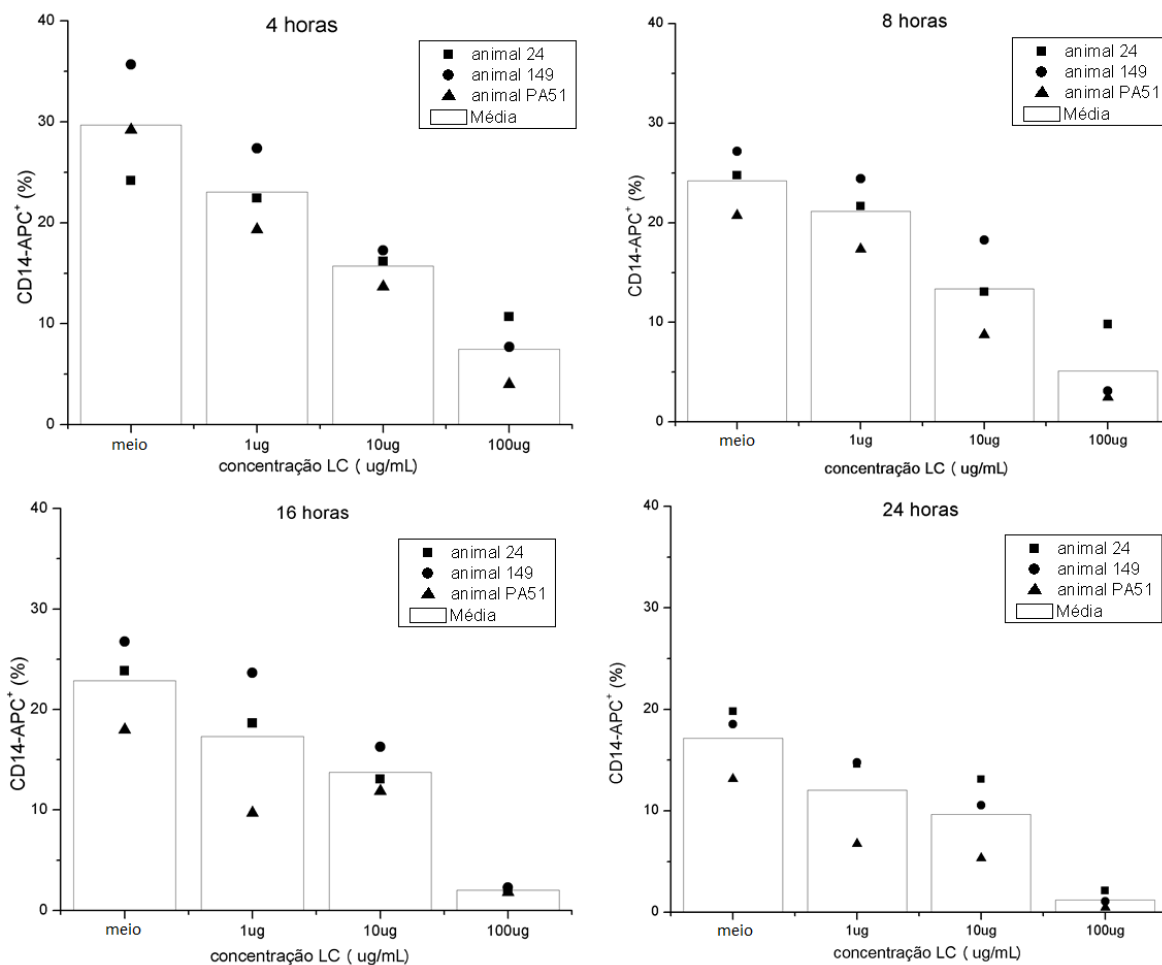


Figura 4.2: Efeito *in vitro* do LC sobre a depleção de macrófagos de macacos, marcados com CD14-APC.

A incubação de células esplênicas de *S. sciureus* em LC induziu um decréscimo do número de macrófagos dependente da dose.

4.2 Experimento piloto do efeito do LC em *S. sciureus* e no curso da infecção plasmodial

Em um experimento piloto, administramos uma série de quatro injeções de 1 mL da suspensão (5 mg clodronato), ou PBS (controle), via intraperitoneal em dois macacos *Saimiri*. Avaliamos a variação de temperatura antes e após as administrações, sinais clínicos de toxicidade e leucograma diferencial dos animais.

Os gráficos da Figura 4.3 mostram a variação da temperatura cinco minutos antes, durante e até trinta minutos depois da administração de LC. Os resultados mostraram uma queda de temperatura inicial (diminuição média máxima de 1,45 °C)

em ambos os animais, sugerindo que a hipotermia transitória é dependente da anestesia e não dos LC. De modo geral, observou-se recuperação da temperatura após trinta minutos coincidindo com a recuperação da anestesia.

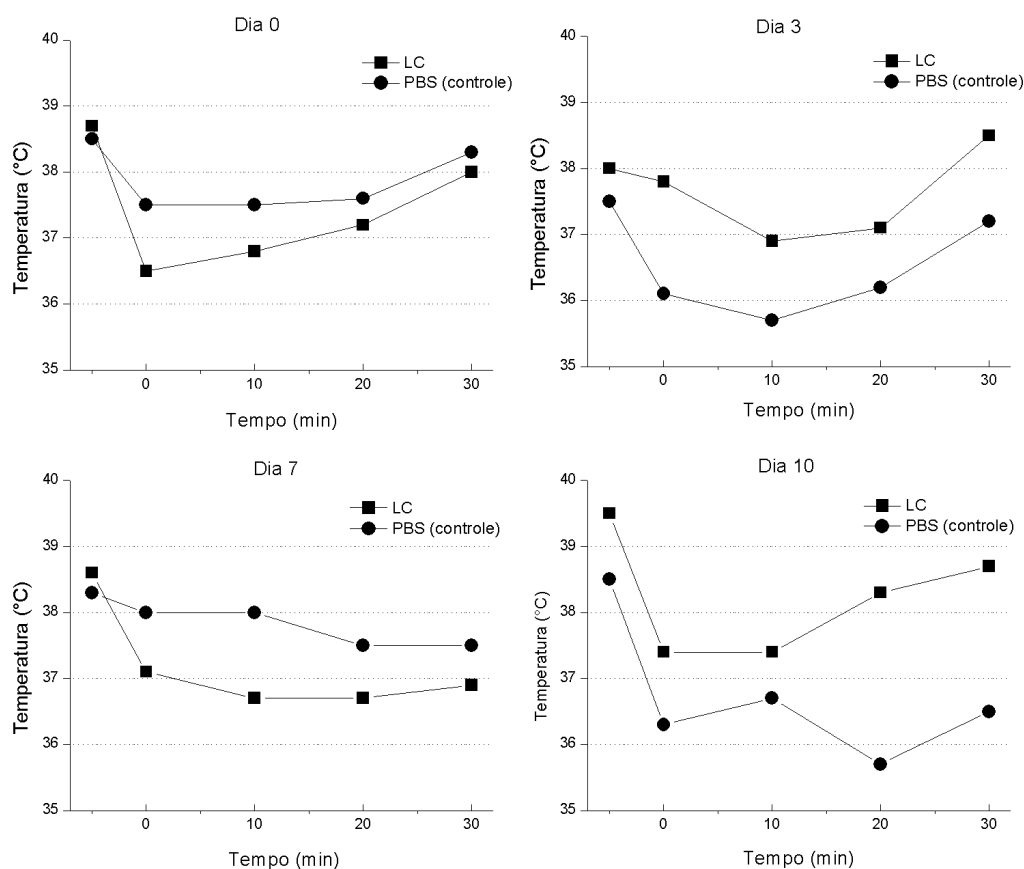


Figura 4.3: Variação de temperatura retal nos dias de administração de LC ou PBS durante a primeira série de administrações.

Nos leucogramas (Figura 4.4) pode-se observar que, apesar da variação nas diversas populações de leucócitos, houve uma aparente queda de monócitos circulantes do animal que recebeu LC, contudo não foi significativo em relação ao controle. Além disso, a partir do dia 10 observou-se nos dois animais discreta anisocitose, policromasia e, no dia 13, eritroblastose (1%) no macaco que recebeu LC.

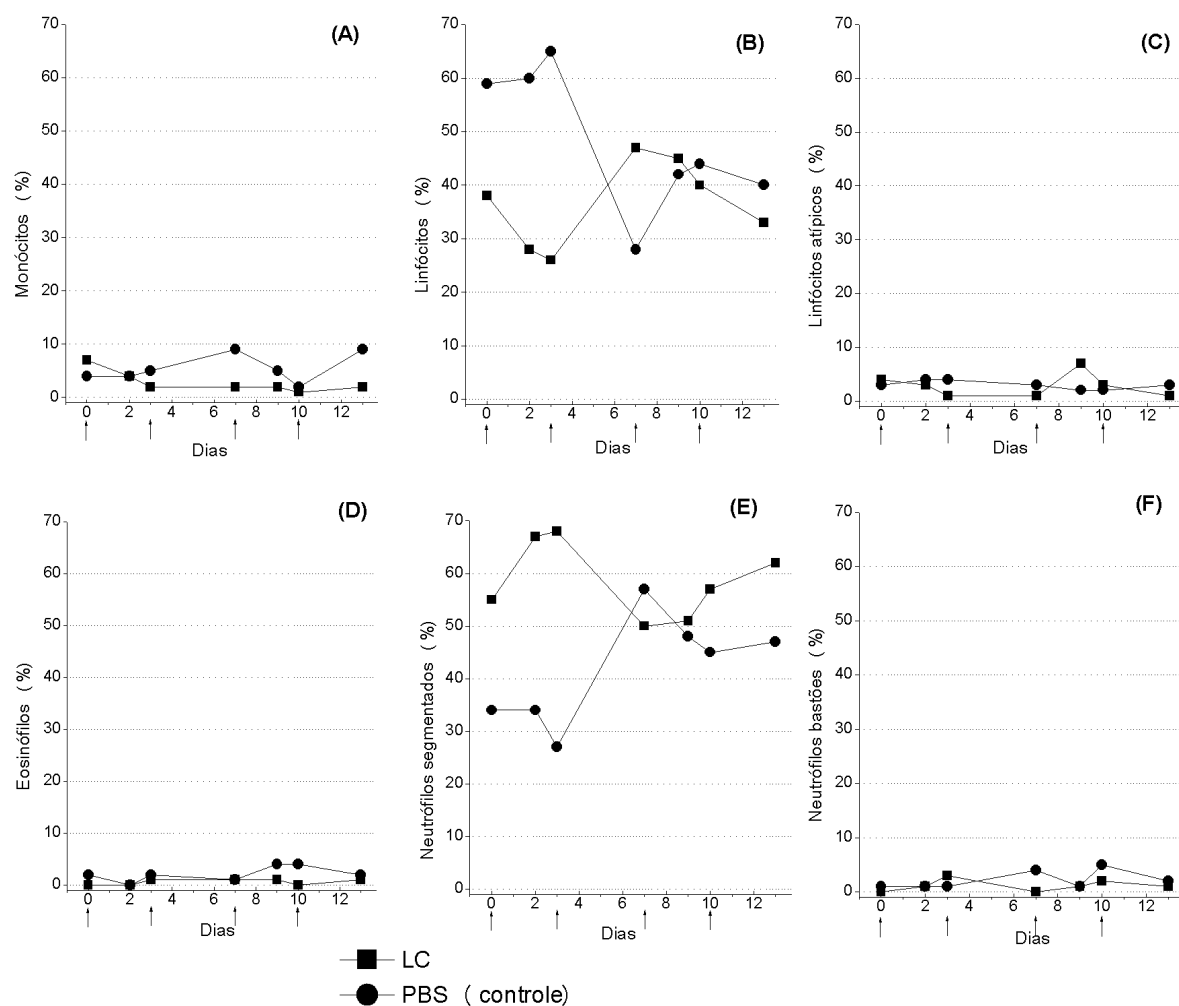


Figura 4.4: Contagem diferencial de leucócitos – experimento piloto.

(A) Monócitos, (B) Linfócitos, (C) Linfócitos atípicos, (D) Eosinófilos, (E) Neutrófilos segmentados, (F) Neutrófilos bastões. As setas mostram os dias em que foram administradas LC ou PBS (0, 3, 7 e 10). Os exames foram realizados nos dias 0, 2, 3, 7, 9, 10, 13.

Não foram observados sinais clínicos de toxicidade como prostração, perda de peso ou hipotermia durante o experimento.

A seguir, foi realizado um experimento preliminar para se avaliar o efeito do LC no curso da infecção de *P. falciparum*. Um *Saimiri* recebeu 1mL de suspensão de LC (5 mg clodronato) e o outro animal recebeu 1mL de solução PBS por via intraperitoneal na segunda série de administrações. No primeiro dia de administração da suspensão, ambos os animais foram infectados com 10^6 HP (hemácias parasitadas) com cepa FUP de *P. falciparum* e acompanhou-se o curso de infecção.

Ao contrário do esperado, a parasitemia foi, ainda que discretamente, maior no animal que recebeu PBS do que naquele que recebeu LC alcançando máximo de 1,83% (PBS) e 0,85% (LC) no dia 12 (Figura 4.5). Ambos se curaram

espontaneamente, mas foram tratados no dia 24 para garantir a eliminação do parasito.

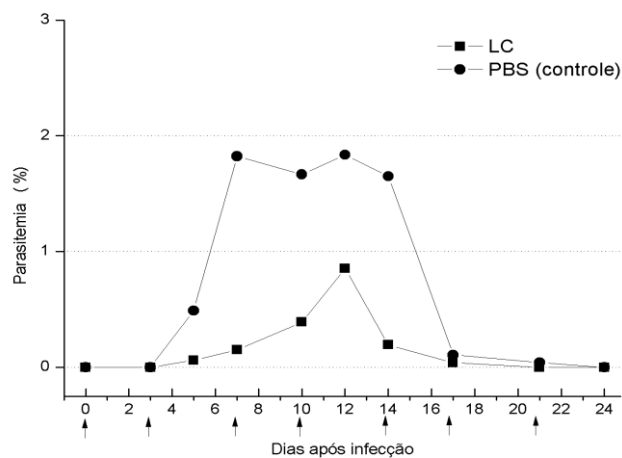


Figura 4.5: Curso da parasitemia de macacos *S. sciureus* não esplenectomizados após a infecção com 10^6 HP – experimento piloto.

Os animais foram tratados com mefloquina no dia 24 após infecção. As setas mostram os dias em que foram administradas LC ou PBS.

O hematócrito apresentou reduções nos dois animais: o animal que recebeu LC sofreu redução de 9,0% com recuperação a partir do dia 17, o macaco que recebeu PBS sofreu redução de 8,5% e apresentou recuperação no dia 24 (Figura 4.6).

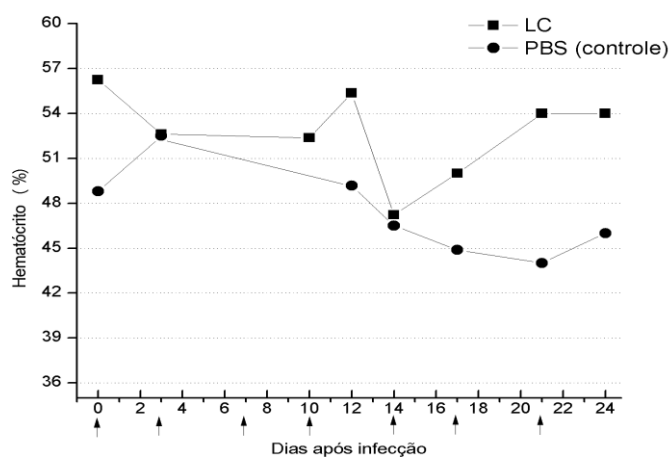


Figura 4.6: Variação do hematócrito durante o curso da parasitemia – experimento piloto.

As setas mostram os dias em que foram administradas LC ou PBS. Os exames foram realizados duas a três vezes por semana.

A variação da temperatura mostrou-se associada à existência da parasitemia, conforme Figura 4.7.

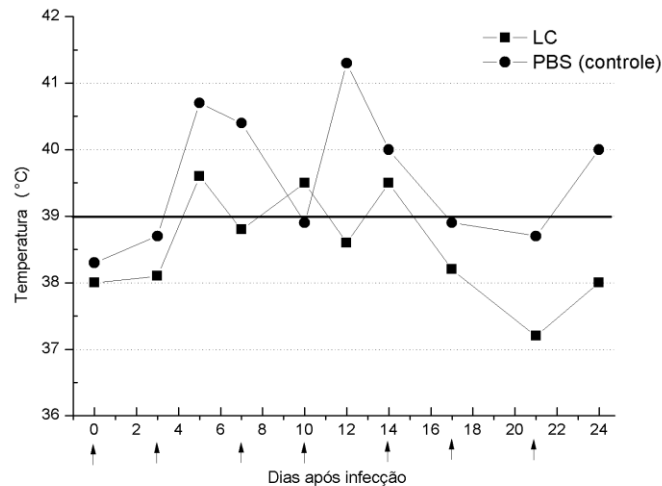


Figura 4.7: Variação da temperatura durante o curso da parasitemia – experimento piloto.

As setas mostram os dias em que foram administradas LC ou PBS. A linha contínua horizontal mostra a linha de base para febre, segundo Stitt (1971).

4.3 Efeito da administração de LC no curso da infecção de *S. sciureus* por *P. falciparum* e na contagem de células CD14

Para avaliar o efeito do LC no curso da infecção e na resposta imune ao *P. falciparum* em primatas não humanos *S. sciureus* foram realizados dois experimentos. No experimento 1 foram utilizados seis animais em dois grupos: **grupo I (1 mL PBS – controle, Pf-PBS)** e **grupo II (1 mL LC, Pf-LC1)**. No experimento 2 foram utilizados catorze animais em seis grupos: três **não infectados (NInf)** – **grupo I (1 mL PBS, NInf-PBS)**, **grupo II (0,5 mL LC, NInf-LC0,5)**, **grupo III (1 mL LC, NInf-LC1)** – e três grupos **infectados – (Pf) grupo IV (1 mL PBS, Pf-PBS)**, **grupo V (0,5 mL LC, Pf-LC0,5)**, **grupo VI (1 mL LC, Pf-LC1)**. Em ambos os experimentos foram realizadas as avaliações clínica, parasitológica e hematológica, além da análise histopatológica do fígado e baço após eutanásia e coleta dos órgãos cinco dias após o tratamento. A resposta imune foi investigada por meio da expressão de citocinas de esplenócitos, dos animais do experimento 1 e de um grupo controle, após cultivo com mitógeno e antígenos.

4.3.1 Parasitemia

EXPERIMENTO 1 (E1)

O grupo Pf-PBS apresentou variação de parasitemia entre 0,03% e 8,15%, sendo que dois dos animais alcançaram o pico de parasitemia no dia 11, e foram

capazes de controlar espontaneamente a infecção no dia 18 (Figura 4.8). O grupo Pf-LC1, apresentou aumento na parasitemia a partir do d7 alcançando valores maiores que 20% (entre 22% e 31%) no d11, quando foram tratados. Nos dois grupos, o curso da parasitemia foi altamente reprodutível em relação ao período pré-patente (sete dias) e pico de parasitemia (onze dias em cinco dos seis animais). Nos animais que receberam LC (Pf-LC1), houve rápido aumento da parasitemia atingindo valores altos e exigindo tratamento, o que é semelhante ao que é usualmente observado em animais esplenectomizados.

Dessa, forma, o objetivo da intervenção foi alcançado de maneira bastante categórica. Apesar disso, ao calcular a área sob a curva entre os dias 0 e 11 (dia de tratamento do grupo Pf-LC1), a diferença entre os dois grupos não foi significativa. Isso certamente foi devido ao número reduzido de animais em cada grupo.

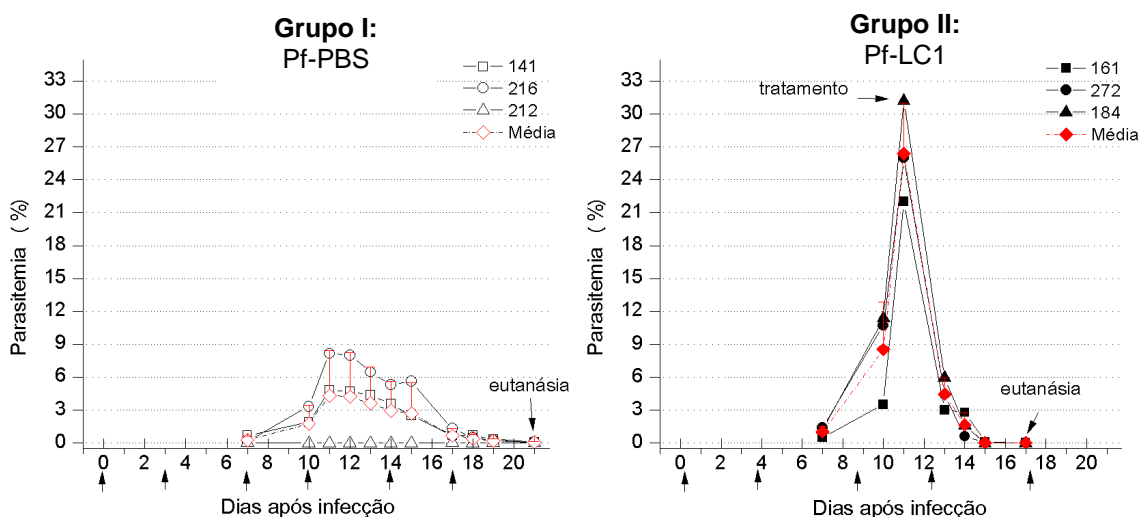


Figura 4.8: Curso da parasitemia após a infecção com 10^6 HP/mL pela cepa FUP de *P. falciparum* - Experimento 1.

Os animais do grupo Pf-PBS se curaram espontaneamente e foram eutanasiados no dia 21. Os animais do grupo Pf-LC1 foram tratados no dia 11 e eutanasiados no dia 17. As setas abaixo do eixo X mostram os dias em que foram administrados LC ou PBS.

EXPERIMENTO 2 (E2)

Com o objetivo de avaliar reprodutibilidade e também testar um volume menor de LC, foi realizado o experimento 2. Neste experimento, novamente o grupo que recebeu PBS (Pf-PBS) foi capaz de controlar a infecção sem tratamento, mas um dos animais apresentou pico elevado de parasitemia (PA65 - 17,7%) no dia 13. Dos três animais tratados com 0,5mL de LC (grupo Pf-LC0,5), novamente dois deles foram tratados por alta parasitemia (PA111 - 26,68% em d10 e PA37 - 19,5% em d11) e o terceiro atingiu o pico de parasitemia de 16,7% (d14), mas controlou a

parasitemia sem necessidade de tratamento. Esses dados tendem a corroborar o primeiro experimento.

Entretanto, de maneira inesperada, os animais que receberam 1 mL de LC (Pf-LC1) fizeram parasitemias relativamente baixas (picos de 4,8% a 8,8%) e controlaram espontaneamente a parasitemia. Nos três grupos, o curso da parasitemia foi reprodutível em relação ao período pré-patente (três dias), porém o período para alcançar o pico de parasitemia foi heterogêneo (de dez a quinze dias). Os animais dos grupos Pf-PBS, Pf-LC1 e o animal PA97 foram tratados no dia 17 para garantir que os parasitos já não seriam mais detectáveis na circulação. Em todos os casos, os animais foram eutanasiados e o baço e fígado colhidos cinco dias após o tratamento.

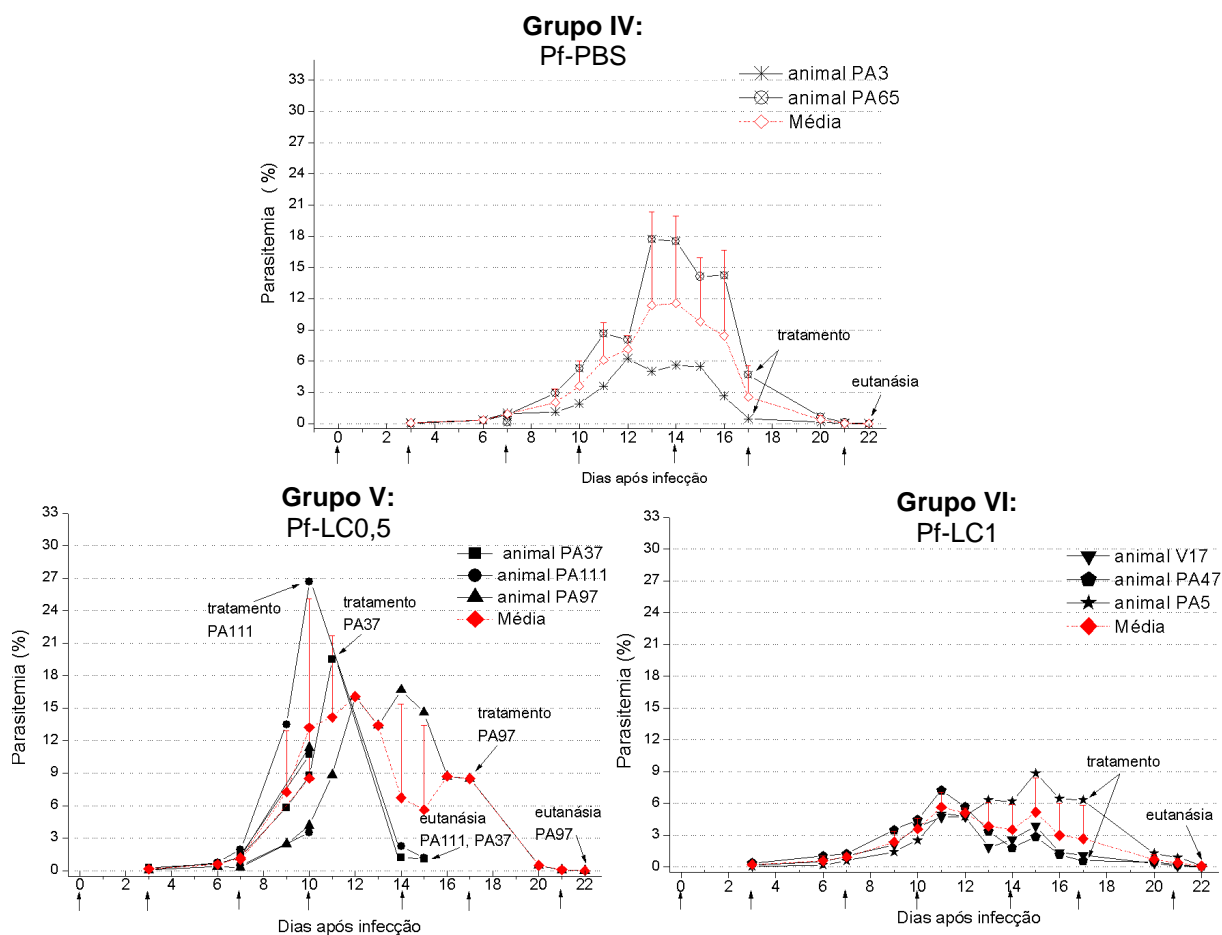


Figura 4.9: Curso da parasitemia após a infecção com 10^6 HP/mL pela cepa FUP de *P. falciparum* - Experimento 2.

Os animais PA111 e PA37 (grupo Pf-LC0,5) foram tratados nos dias 10 e 11, respectivamente e a eutanásia realizada no dia 15. Os animais dos grupos Pf-PBS, Pf-LC1 e o animal PA97 (grupo Pf-LC0,5) foram tratados no dia 17 e eutanasiados no dia 22. As setas abaixo do eixo X mostram os dias em que foram administrados LC ou PBS.

Nas figuras 4.8 e 4.9 foram mostrados os dados de parasitemia de cada animal. Na Figura 4.10 são mostradas as curvas de parasitemias médias e desvio padrão dos experimentos 1 e 2 deixando claro que as administrações de 1 mL de LC resultaram em curvas não reprodutíveis, mas ainda sim mostrando que de modo geral a administração de LC gera parasitemias mais elevadas.

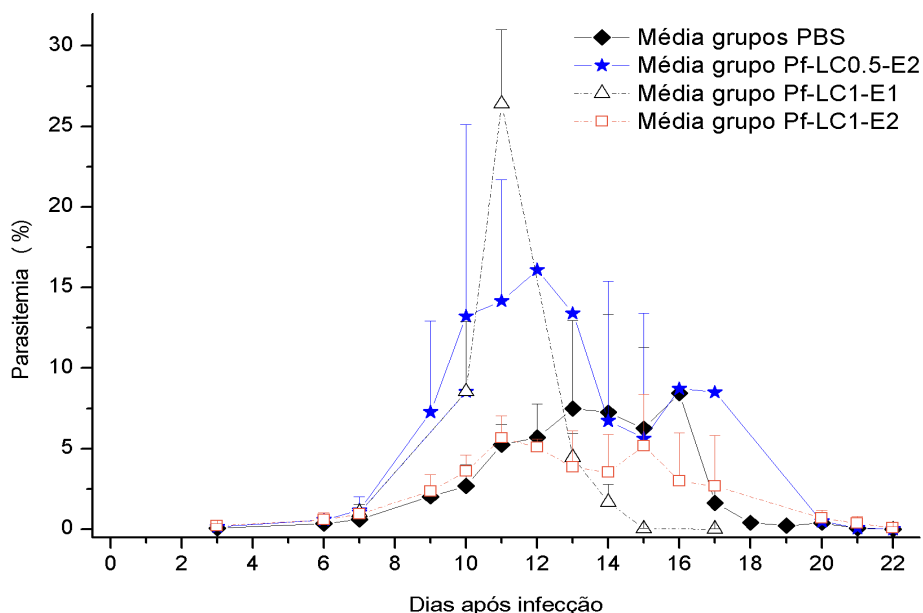


Figura 4.10: Média do curso da parasitemia após a infecção com 10^6 HP/mL pela cepa FUP de *P. falciparum* – Experimentos 1 e 2.

Média dos grupos que receberam PBS (Pf-PBS-E1 e Pf-PBS-E2) representado em preto, média do grupo que recebeu 0,5 mL de LC (Pf-LC0,5-E2) em azul e média dos grupos que receberam 1,0 mL de LC - Pf-LC1-E1 (representado por triângulos pretos) e Pf-LC1-E2 (representado por quadrados laranjas)

4.3.2 Anemia

EXPERIMENTO 1 (E1)

O grupo Pf-PBS apresentou diminuição de hematócrito e hemoglobina (34% e 10,4g/dL, respectivamente) com tendência à estabilização dos valores a partir de d14 (Figura 4.11 e Figura 4.12). O grupo Pf-LC1 apresentou diminuição de hematócrito e hemoglobina alcançando valores mínimos no d14 (20% e 5g/dL, respectivamente) mostrando recuperação em d17. Os níveis de hemoglobina e hematócrito diminuíram gradualmente durante o período de aumento da parasitemia e apresentou os valores mais baixos durante resolução da infecção ou quando os parasitos já não eram mais detectáveis na circulação.

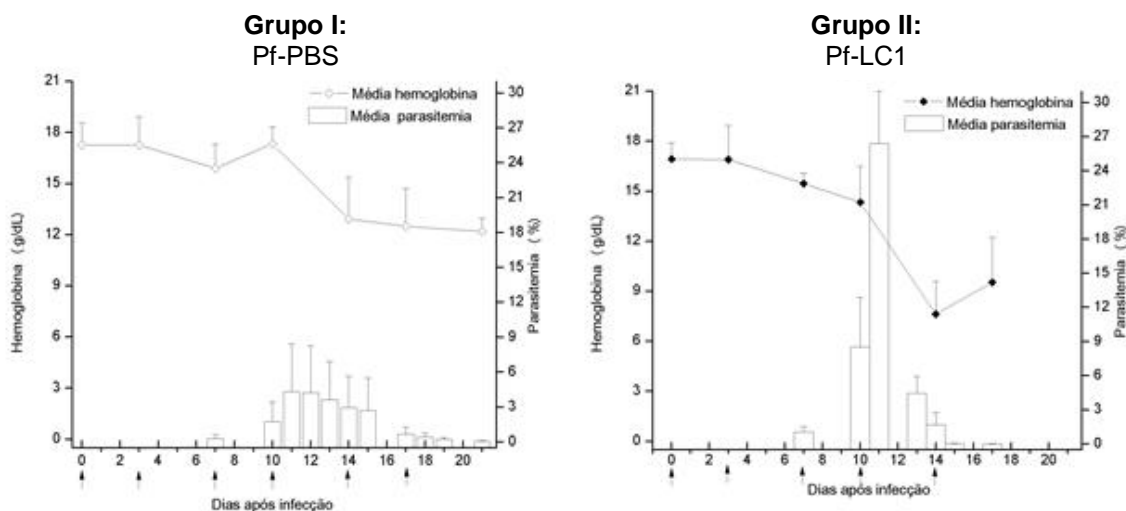


Figura 4.11: Variação dos níveis de hemoglobina (média) – Experimento 1.

Grupos que receberam PBS (Pf-PBS) e LC (Pf-LC1) após a infecção com 10^6 HP/mL pela cepa FUP de *P. falciparum*. As setas mostram os dias em que foram administrados LC ou PBS. As médias das parasitemias estão representadas por histogramas.

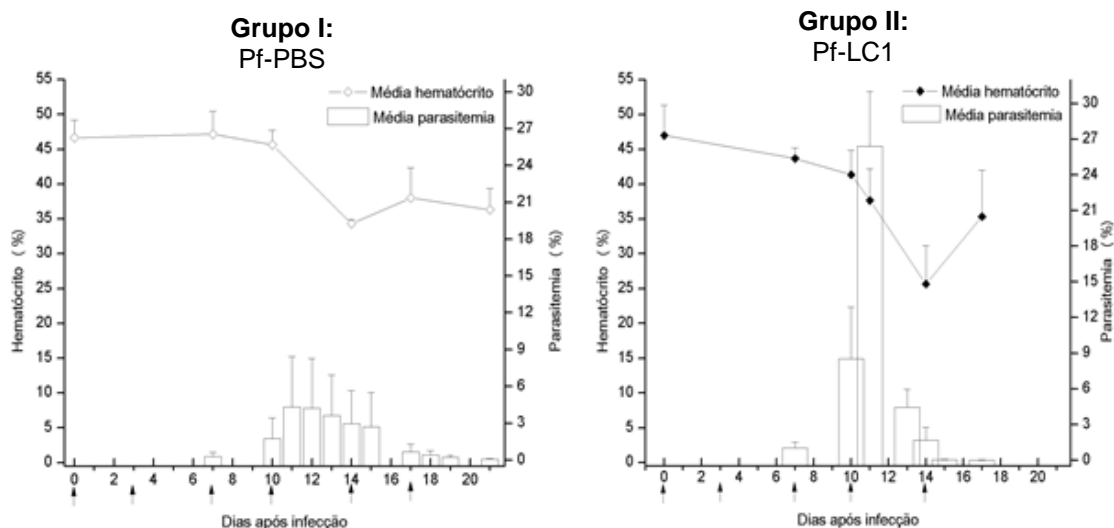


Figura 4.12: Variação dos níveis de hematócrito (média) – Experimento 1.

Grupos que receberam PBS (Pf-PBS) e LC (Pf-LC1) após a infecção com 10^6 HP/mL pela cepa FUP de *P. falciparum*. As setas mostram os dias em que foram administrados LC ou PBS. As médias das parasitemias estão representadas por histogramas.

EXPERIMENTO 2 (E2)

Nos grupos não infectados (Ninf-PBS, Ninf-LC0,5 e Ninf-LC1), a hemoglobina variou entre 12,8 - 19,3 g/dL, e o hematócrito entre 36 e 49% (Figura 4.13 e Figura 4.14). Nos animais infectados (grupos Pf-PBS, Pf-LC0,5 e Pf-LC1) os níveis de hemoglobina e hematócrito diminuíram gradualmente durante o período de aumento da parasitemia e apresentou os valores mais baixos durante a resolução da infecção ou quando os parasitos já não eram mais detectáveis na circulação (hemoglobina entre 8,1 e 10,1g/dL e hematócrito entre 22 e 25%) entre os dias 14 e 21.

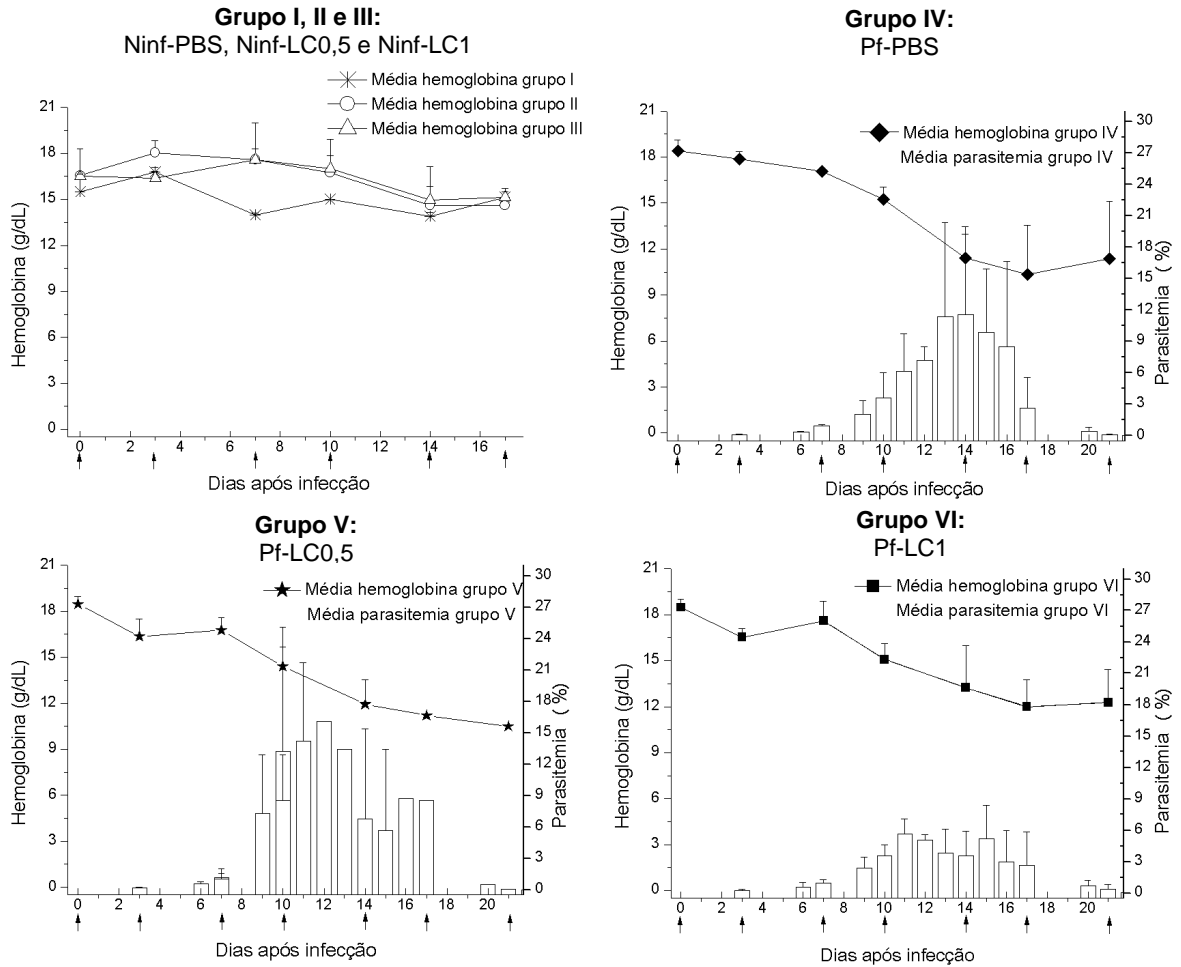


Figura 4.13: Variação dos níveis de hemoglobina (média) - Experimento 2.

Grupos não infectados (Ninf-PBS, Ninf-LC0,5 e Ninf-LC1) e dos grupos infectados (Pf-PBS, Pf-LC0,5 e Pf-LC1) com 10^6 HP/mL pela cepa FUP de *P. falciparum*. As setas mostram os dias em que foram administrados LC ou PBS. As médias das parasitemias estão representadas por histogramas.

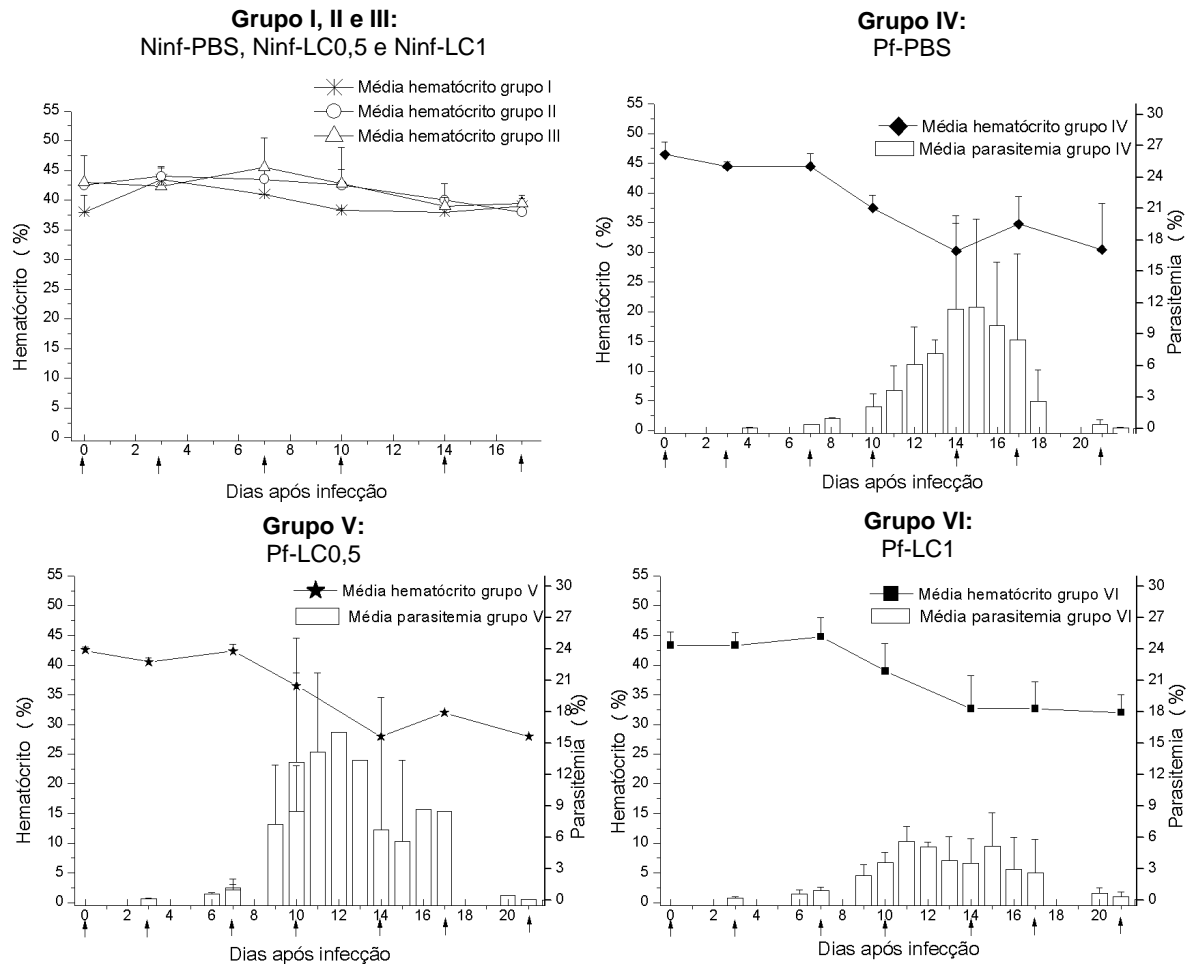


Figura 4.14: Variação dos níveis de hematócrito (média) - Experimento 2.

Grupos não infectados (Ninf-PBS, Ninf-LC0,5 e Ninf-LC1) e dos grupos infectados (Pf-PBS, Pf-LC0,5 e Pf-LC1) com 10^6 HP/mL pela cepa FUP de *P. falciparum*. As setas mostram os dias em que foram administrados LC ou PBS. As médias das parasitemias estão representadas por histogramas.

4.3.3 Temperatura

Em todos os animais infectados, a temperatura, embora tenha oscilado, manteve-se ligeiramente mais elevada do que no dia 0.

EXPERIMENTO 1 (E1)

Em ambos os grupos a temperatura variou cerca $2,2^{\circ}\text{C}$. A variação da temperatura tendia a se correlacionar com a presença de parasitemia (Figura 4.15). O grupo Pf-PBS apresentou estado febril entre os dias 12 e 18. Os animais do grupo Pf-LC1 apresentaram estado febril entre os dias 10 e 13.

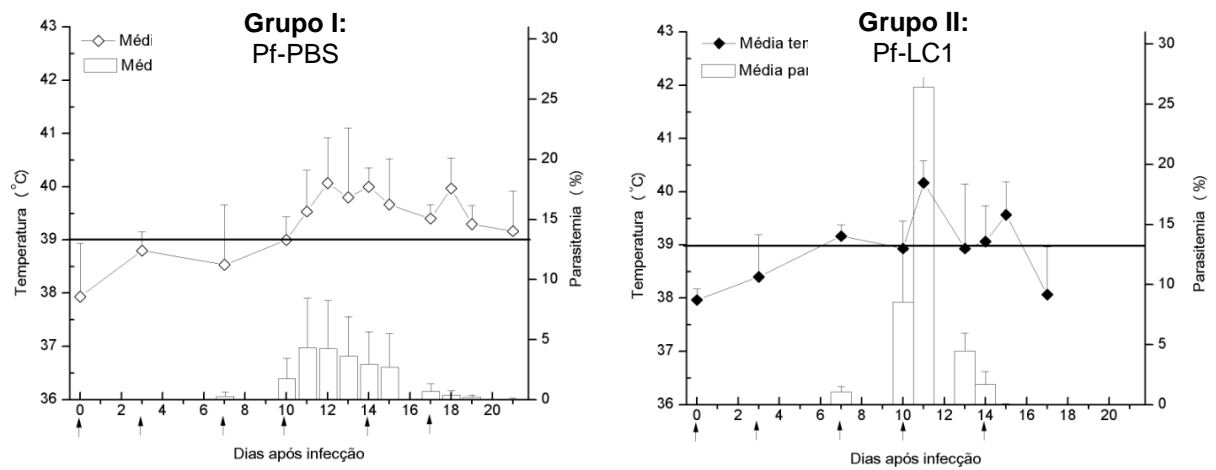


Figura 4.15: Variação da temperatura (média) - Experimento 1.

Grupos que receberam PBS (Pf-PBS) e LC (Pf-LC1) após a infecção com 10^6 HP/mL pela cepa FUP de *P. falciparum*. As setas mostram os dias em que foram administrados LC ou PBS. As médias das parasitemias estão representadas por histogramas. A linha contínua horizontal mostra a linha de base para febre.

EXPERIMENTO 2 (E2)

Nos grupos não infectados (Ninf-PBS, Ninf-LC0,5 e Ninf-LC1) a temperatura variou entre 37 – 40°C. Os grupos infectados (Pf-PBS, Pf-LC0,5 e Pf-LC1), assim como no experimento 1 apresentaram variação de temperatura aparentemente em função da presença e da variação da parasitemia (Figura 4.16). Os animais do grupo Pf-PBS apresentaram febre entre os dias 7 e 17, os animais dos grupos Pf-LC0,5 e Pf-LC1 entre os dias 6 e 17.

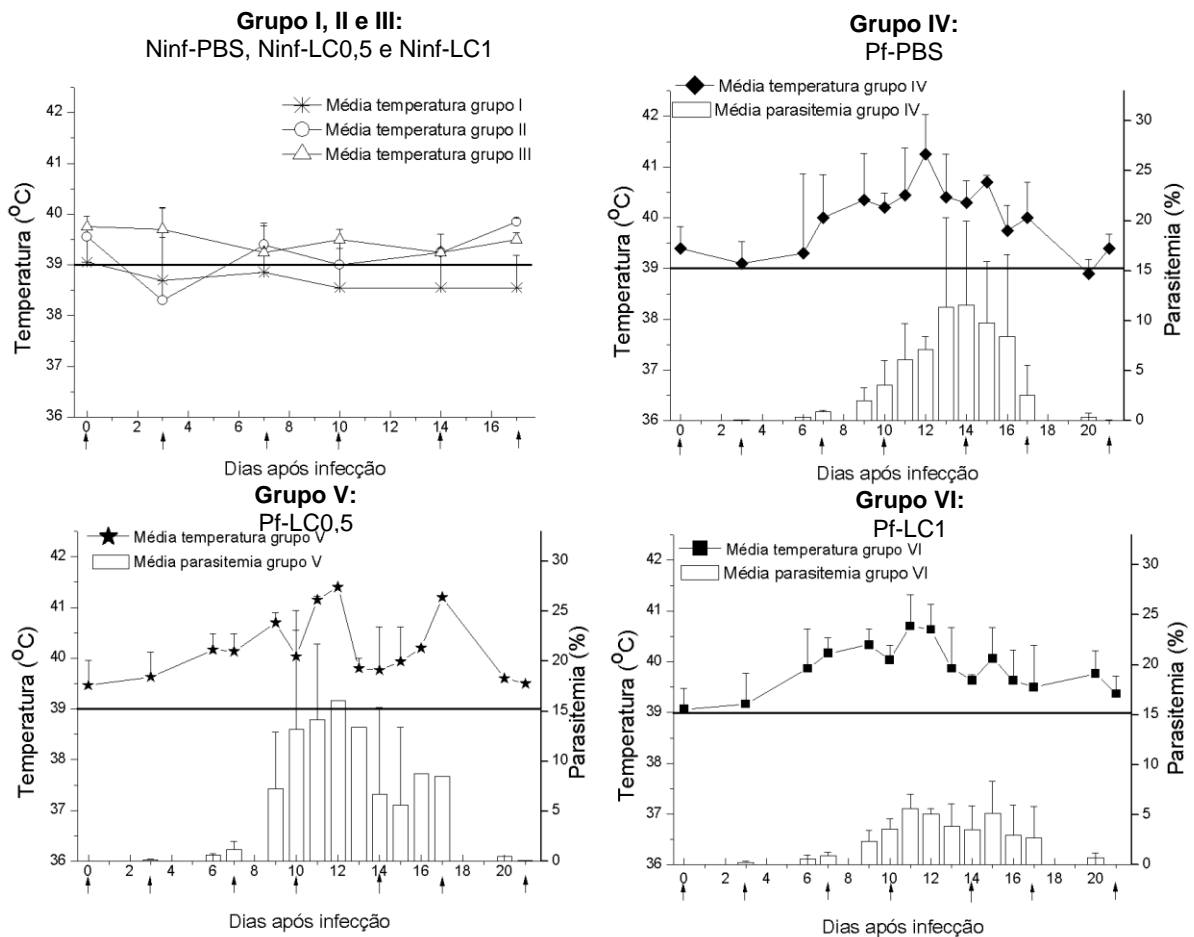


Figura 4.16: Variação da temperatura (média) - Experimento 2.

Grupos não infectados (Ninf-PBS, Ninf-LC0,5 e Ninf-LC1) e dos grupos infectados (Pf-PBS, Pf-LC0,5 e Pf-LC1) com 10^6 HP/mL pela cepa FUP de *P. falciparum*. As setas mostram os dias em que foram administrados LC ou PBS. As médias das parasitemias estão representadas por histogramas. A linha contínua horizontal mostra a linha de base para febre.

4.3.4 Variação nos níveis de leucócitos

Nos dois experimentos de avaliação de LC no curso da infecção por *P. falciparum* foi feita a quantificação de monócitos em sangue total hemolisado através da marcação com anticorpo CD14-APC e análise por citometria de fluxo, conforme descrito anteriormente. Foram analisados 60.000 eventos e a contagem de CD14-APC foi feita a partir do “gate” de leucócitos (Figura 4.17).

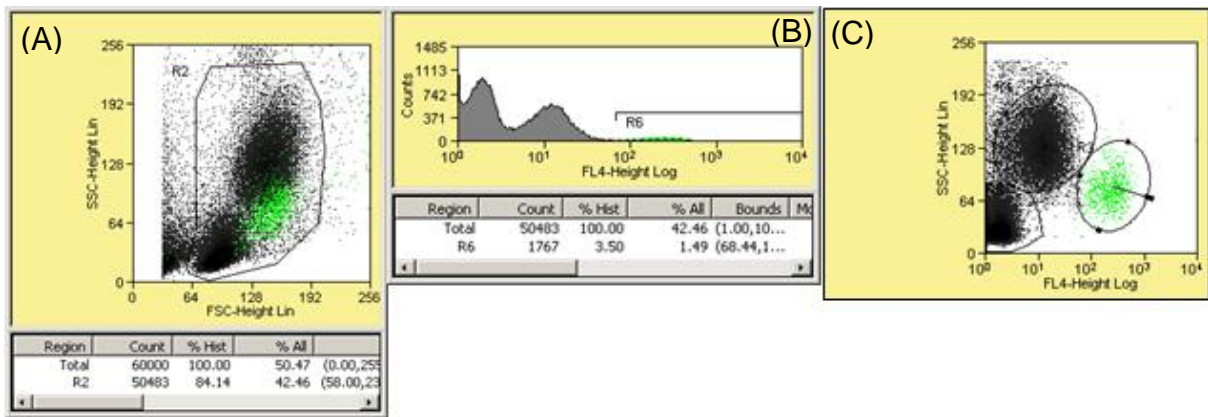


Figura 4.17: Etapas realizadas no programa Summit para análise da quantificação de CD14-APC nas amostras de sangue coletadas.

(A) A região de “Dot plot” indicando “gate” em que a população CD14⁺ foi quantificada. A região de aquisição é identificada utilizando os parâmetros de tamanho (dispersão frontal da luz – SSC) e de granulosidade (dispersão lateral da luz – FSC). (B) Histograma indicando região positiva para CD14 (FL4 - APC). (C) “Dot plot” SSC x FL4 (APC) mostrando as três populações principais de células (linfócitos, monócitos e granulócitos), Os monócitos estão na cor verde.

Experimento 1 (E1)

No grupo Pf-PBS, dois animais (141 e 216) apresentaram discreto aumento de marcação para CD14 com o decorrer da infecção, variando entre 2,6 e 6,99% (Figura 4.18). O animal 212 apresentou valores superiores a 10% e sofreu diminuição, no auge da infecção apresentando 8,3% de CD14 em d7. No grupo Pf-LC1, os níveis de CD14 oscilaram no decorrer da infecção apresentando valores máximos no dia 14 (média 4,73%).

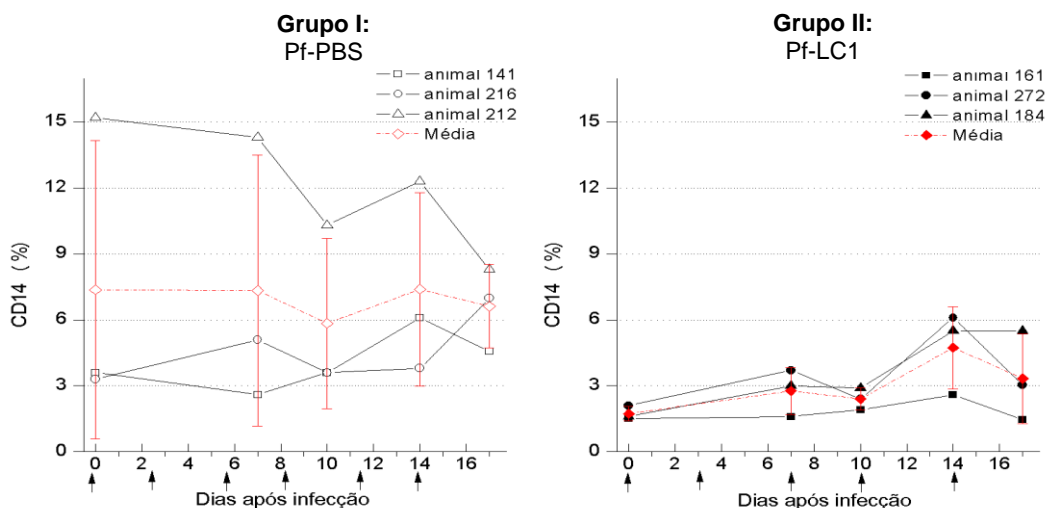


Figura 4.18: Variação de CD14-APC, quantificada por citometria de fluxo - Experimento 1.

Grupos que receberam PBS (Pf-PBS) e LC (Pf-LC1) após a infecção com 10⁶ HP/mL pela cepa FUP de *P. falciparum*. As setas mostram os dias em que foram administrados LC ou PBS.

A contagem de monócitos por leucograma diferencial apresentou valores mais oscilantes (Figura 4.19). No grupo Pf-PBS, o animal 212 apresentou curva

semelhante ao observado na citometria, já o animal 216 apresentou perfil mais próximo do animal 212 e o animal 141 mostrou, mesmo com muita variação nos valores, tendência a aumento no decorrer da infecção. A partir do dia 14, os três animais passaram a apresentar perfil semelhante. O grupo Pf-LC1 apresentou níveis maiores e mais variáveis quando comparados à quantificação por citometria de fluxo variando entre 3 e 14%.

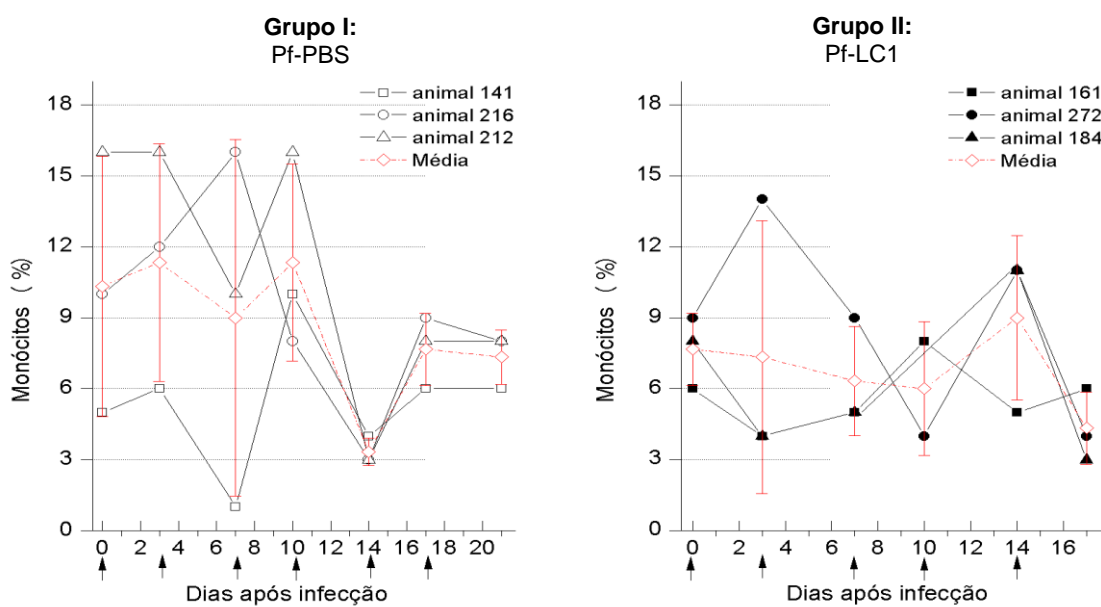


Figura 4.19: Variação de monócitos, quantificados por leucograma diferencial - Experimento 1. Grupos que receberam PBS (Pf-PBS) e LC (Pf-LC1) após a infecção com 10^6 HP/mL pela cepa FUP de *P. falciparum*. As setas mostram os dias em que foram administrados LC ou PBS.

A média da contagem das outras populações de leucócitos aparece na Figura 4.20. No grupo Pf-PBS, os linfócitos apresentaram aumento, e no grupo Pf-LC1, apresentaram valores oscilantes. A população de linfócitos atípicos apresentou aumento no grupo I a partir do dia 7 e no grupo II a partir do dia 14. As populações de neutrófilos bastões e eosinófilos apresentaram oscilação, mas pouca variação nos grupos I e II, já a população de basófilos mostrou pouca variação no grupo I e apresentou diminuição em d7 e valores quase constantes posteriormente no grupo II. A contagem de neutrófilos bastões mostrou tendência à diminuição no grupo I e valores oscilantes no grupo II.

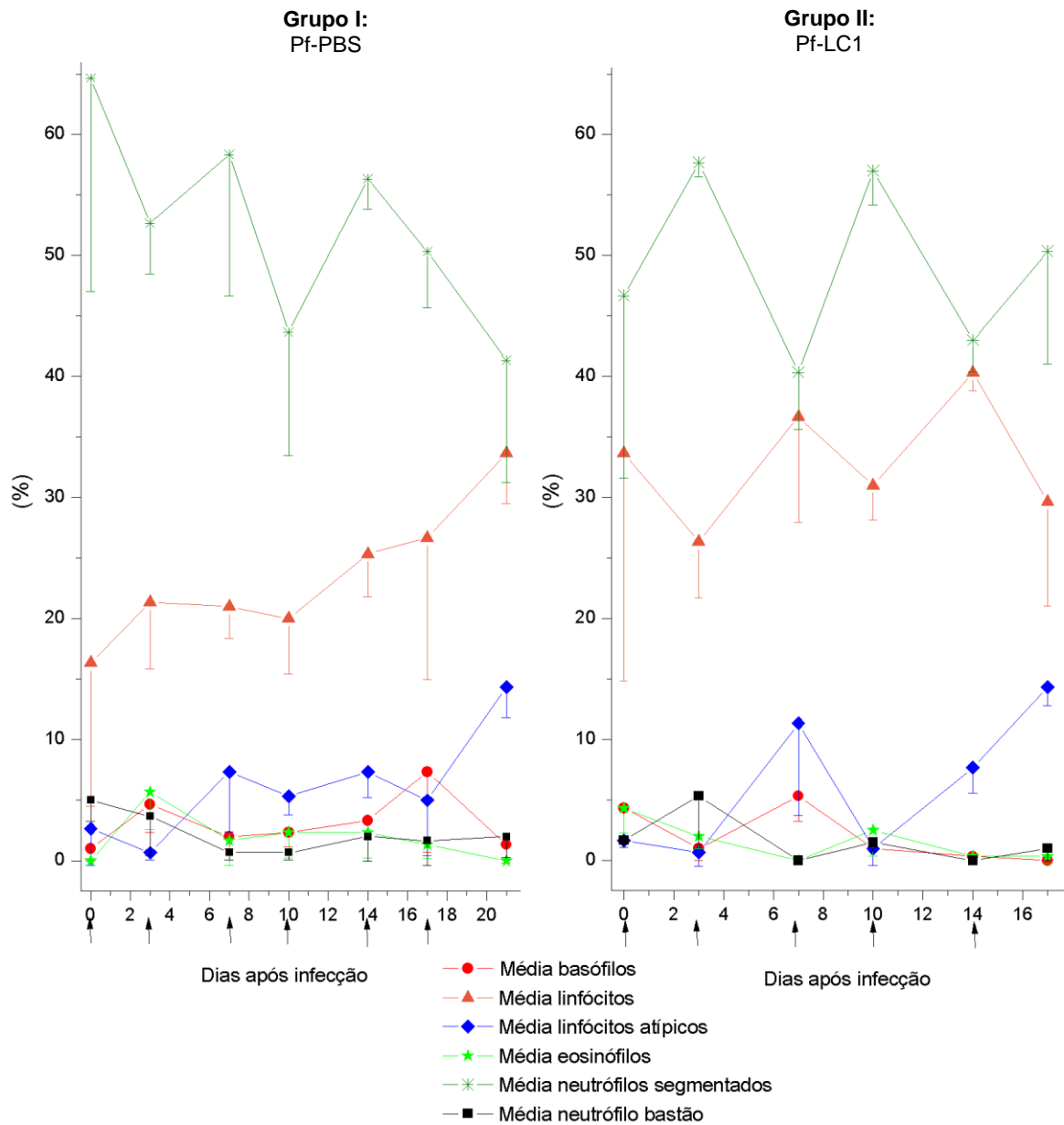


Figura 4.20: Variação de leucócitos (exceto monócitos), quantificados por leucograma diferencial - Experimento 1.

Grupos que receberam PBS (Pf-PBS) e LC (Pf-LC1) após a infecção com 10^6 HP/mL pela cepa FUP de *P. falciparum*. As setas mostram os dias em que foram administrados LC ou PBS.

EXPERIMENTO 2 (E2)

No experimento 2, a quantificação dos monócitos por citometria de fluxo mostrou que quase todos os grupos apresentaram curvas oscilantes. Os dados encontram-se na Figura 4.21.

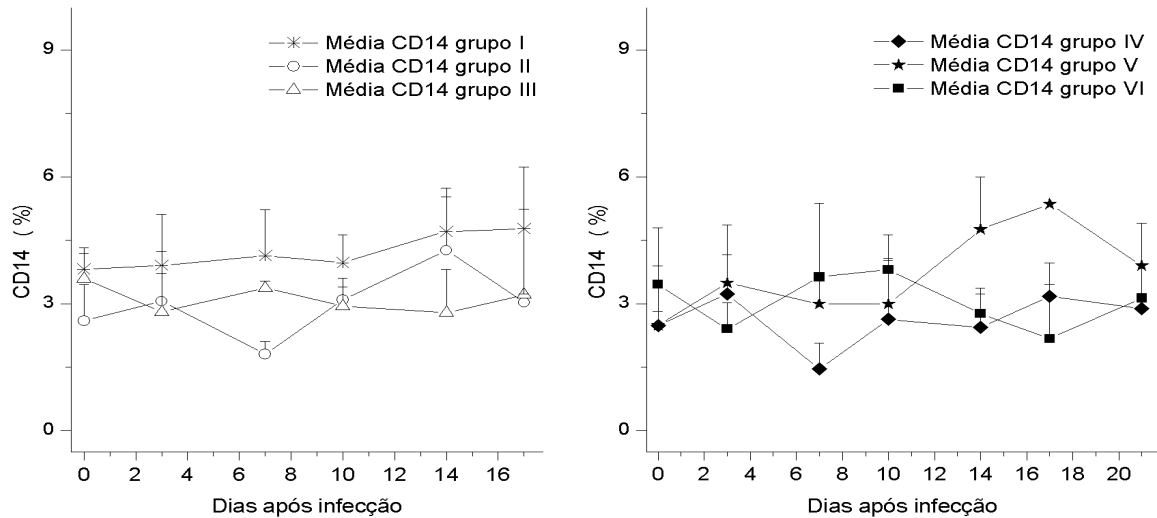


Figura 4.21: Variação de CD14-APC, quantificados por citometria de fluxo (média) - Experimento 2.

Grupos não infectados (I – Ninf-PBS, II – Ninf-LC0,5 e III – Ninf-LC1) e grupos infectados (IV – Pf-PBS, V – Pf-LC0,5 e VI – Pf-LC1) com 10^6 HP/mL pela cepa FUP de *P. falciparum*. As setas mostram os dias em que foram administrados LC ou PBS.

Como conclusão geral, não parece haver um efeito marcante, ou qualquer efeito da administração de LC nos níveis de monócitos circulantes, seja em animais infectados ou não infectados (Figura 4.22).

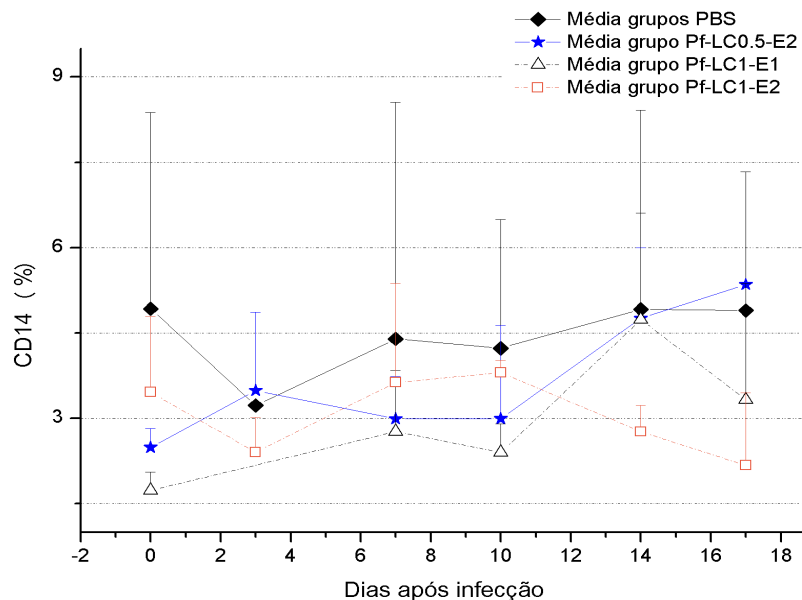


Figura 4.22: Variação de CD14-APC, quantificados por citometria de fluxo (média) – Experimentos 1 e 2.

Média dos grupos que receberam PBS (Pf-PBS-E1 e Pf-PBS-E2) representado em preto, média do grupo que recebeu 0,5 mL de LC (Pf-LC0,5-E2) em azul e média dos grupos que receberam 1,0 mL de LC - Pf-LC1-E1 (representado por triângulos pretos) e Pf-LC1-E2 (representado por quadrados laranjas).

4.3.5 Variação em outros parâmetros

EXPERIMENTO 1 (E1)

Não foi observada perda de peso acentuada (> 10%) entre d0 e d21. Nos dias 11 e 12 (período de pico nas parasitemias dos animais do grupo Pf-LC1) o grupo Pf-LC1 e dois animais do grupo Pf-PBS apresentaram perda de apetite e prostração. Constatou-se nesse período que dois animais do Pf-LC1 apresentaram hematúria que reverteu no dia 13.

EXPERIMENTO 2 (E2)

Não foi observada perda de peso acentuada (> 10%) entre d0 e d21. Também não foram observadas alterações clínicas como perda de apetite ou prostração.

4.3.6 Alterações na estrutura do baço e do fígado

EXPERIMENTO 1 (E1)

A eutanásia e coleta de órgãos foram realizadas nos dias 17 (grupo II - Pf-LC1) e 21 (grupo I - Pf-PBS) após inoculação de HP com cepa FUP de *P. falciparum* e três dias após a última administração de PBS ou LC. Ainda que não se tenha observado diferenças estatisticamente significativas ($p= 0,08$), notou-se que os baços dos animais do grupo Pf-PBS mostraram-se quase quatro vezes maiores que os dos animais do grupo Pf-LC1 conforme Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Peso dos baços removidos após eutanásia e sua relação com o peso corporal na última pesagem – Experimento 1.

Nº animal	Grupo (G)	Injeções	Infectado		Peso baço em	
			cepa FUP (10 ⁶ HP)	Peso animal (g) última pesagem	Peso baço (g)	relação ao peso corporal (%)
141	GI (Pf-PBS)	PBS	sim	826	6.414	0.777
216	GI (Pf-PBS)	PBS	sim	748	5.924	0.792
212	GI (Pf-PBS)	PBS	sim	752	5.029	0.669
161	GII (Pf-LC1)	LC	sim	644	1.02	0.158
272	GII (Pf-LC1)	LC	sim	586	0.876	0.149
184	GII (Pf-LC1)	LC	sim	728	2.236	0.307

Em relação ao fígado, não foram observadas alterações macroscópicas nos animais, tanto do grupo Pf-PBS quanto no grupo Pf-LC1.

EXPERIMENTO 2 (E2)

Procedeu-se com a eutanásia e coleta de órgãos nos dias 15 (animais PA111 e PA37 – grupo Pf-LC0,5) e 21 (grupos NInf-PBS, NInf-LC0,5, NInf-LC1, Pf-PBS, Pf-LC1 e animal PA97 do grupo Pf-LC0,5) após inoculação de HP com cepa FUP de *P. falciparum* e 24 horas após a última administração de PBS ou LC. Os baços dos grupos infectados mostraram-se maiores e mais escuros do que os dos grupos não infectados sendo que os baços do grupo Pf-PBS foram os maiores entre os grupos infectados, conforme Tabela 4.2. Mesmo assim, a diferença entre os grupos que receberam PBS e os que receberam LC não foi tão expressiva como no experimento 1. Os pesos dos baços neste experimento também não eram significativamente diferentes entre os grupos. Os baços dos animais dos grupos Pf-LC0,5 e Pf-LC1 eram 19% e 32% menores do que os do grupo Pf-PBS, respectivamente. Entre os grupos não-infectados, os baços dos animais dos grupos NInf-LC0,5 apresentaram pesos equivalentes à média dos pesos dos baços do grupo NInf-PBS, já os baços dos animais do grupo NInf-LC1 eram cerca de 25% maiores que a média dos baços do grupo NInf-PBS. Os baços do grupo Pf-PBS foram os maiores e os do grupo NInf-LC0,5, os menores entre os animais do experimento 2. No grupo controle NInf-PBS observou-se grande diferença no tamanho dos baços dos animais sendo o do animal PA67 (0,64g) o menor entre os animais do experimento, provavelmente, uma variação anatômica deste animal que difere de todos os outros, mesmo com do mesmo gênero e idade.

Tabela 4.2: Peso dos baços removidos após eutanásia e sua relação com o peso corporal na última pesagem – Experimento 2.

Nº animal	Grupo (G)	Injeções	Infectado cepa FUP (10 ⁶ HP)	Peso animal (g) última pesagem	Peso baço (g)	Peso baço em relação ao peso corporal (%)
PA11	GI (NInf-PBS)	PBS	não	752	1.628	0.216
PA67	GI (NInf-PBS)	PBS	não	774	0.641	0.083
V3	GII (NInf-LC0,5)	0,5 mL LC	não	910	1.26	0.138
PB43	GII (NInf-LC0,5)	0,5 mL LC	não	702	1.108	0.158
PA75	GIII (NInf-LC1)	1 mL LC	não	812	1.515	0.187
R11	GIII (NInf-LC1)	1 mL LC	não	784	1.459	0.186
PA3	GIV (Pf-PBS)	PBS	sim	774	4.488	0.580
PA65	GIV (Pf-PBS)	PBS	sim	852	4.618	0.542
PA111	GV (Pf-LC0,5)	0,5 mL LC	sim	870	3.462	0.398
PA37	GV (Pf-LC0,5)	0,5 mL LC	sim	836	3.308	0.396
PA97	GV (Pf-LC0,5)	0,5 mL LC	sim	808	4.615	0.571
V17	GIV (Pf-LC1)	1 mL LC	sim	880	2.97	0.338
PA47	GIV (Pf-LC1)	1 mL LC	sim	868	4.156	0.479
PA5	GIV (Pf-LC1)	1 mL LC	sim	812	2.75	0.339

Não foram observadas alterações macroscópicas no fígado dos animais, sejam infectados ou não.

4.3.6.1 Análise histopatológica do baço e do fígado – Experimentos 1 e 2

Seções de 5µm foram cortadas e coradas por hematoxilina e eosina e Perls (azul da Prússia). As lâminas foram analisadas por microscopia óptica. Foram avaliados os grupos Ninf-PBS-E2, Ninf-LC0,5-E2, Ninf-LC1-E2 do experimento 2 e os grupos Pf-PBS-E1 e Pf-LC1-E1 do experimento 1.

BAÇO - COLORAÇÃO H&E

Animais não-infectados - Nos baços corados com H&E, observou-se nos animais não infectados que receberam PBS, que a polpa branca e a polpa vermelha apresentaram limites bem definidos com eventual presença de hemácias na polpa branca, formação de centros germinativos e presença de centros de fagocitose (Figura 4.23-A), acúmulo de células de citoplasma claro (provavelmente macrófagos) na zona marginal e na polpa vermelha e presença de centros apoptóticos na polpa branca (Figura 4.23-B). Ausência de pigmento e de plasmócitos.

Nos animais que receberam LC (0,5 mL ou 1,0 mL) e não foram infectados observou-se a polpa vermelha aparentemente maior do que nos animais que receberam PBS. No mais, não foi observado nada em especial. No animal R11 (grupo Ninf-LC1) foi observado maior quantidade de detritos, possivelmente restos celulares de centros de fagocitose (Figura 4.23-C e D).

Animais infectados - Nos animais infectados que receberam PBS, havia muito pigmento marrom (indicativo de hemozoína) na polpa vermelha na forma granular e também em concentrados (Figura 4.23-E), além de presença de precursores eritroides, macrófagos com pigmento e plasmócitos. Observou-se desorganização da zona marginal (Figura 4.23-F).

No grupo de animais infectados que receberam 1,0mL LC (Pf-LC1-E1), dois animais (272 e 161) apresentaram pouco pigmento marrom e esparso. Nos três animais do grupo havia macrófagos sem pigmento marrom na polpa vermelha (Figura 4.23-G e H).

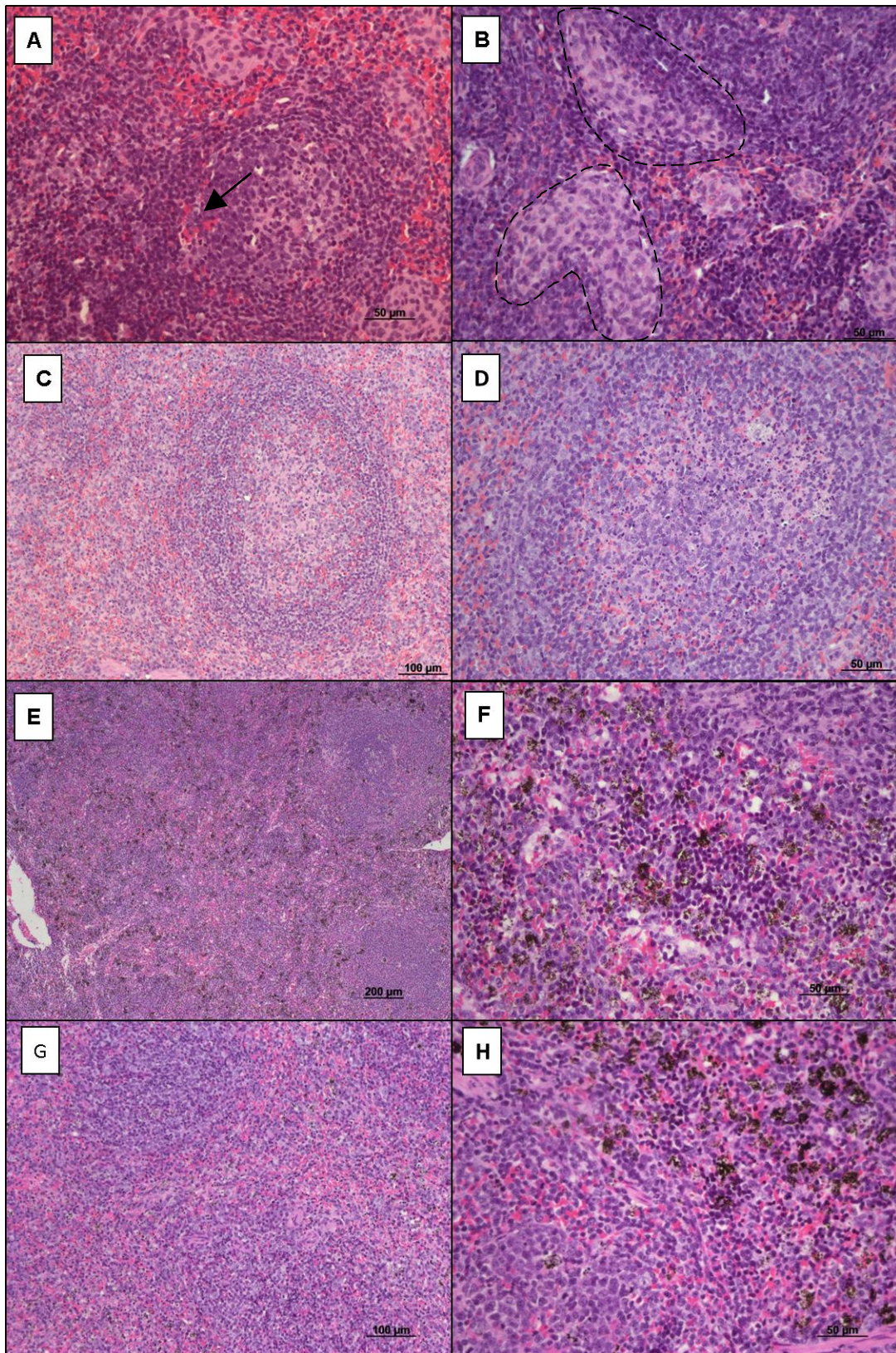


Figura 4.23: Análise histopatológica de baços de *S. sciureus* com coloração H&E.

Grupo não infectado que recebeu PBS (A e B), grupo não infectado que recebeu 0,5mL LC (C), grupo não infectado que recebeu 1,0mL LC (D), grupo infectado que recebeu PBS (E e F) e grupo infectado que recebeu 1,0mL LC (G e H). A seta na figura A mostra algumas hemácias presentes na polpa branca. Em tracejado na figura B, acúmulos de macrófagos. Seções foram cortadas (5 μ m), coradas com H&E, e analisadas ao microscópio óptico.

BAÇO - COLORAÇÃO DE PERLS

Animais não-infectados - A análise dos baços com coloração de Perls mostrou que nos animais que receberam PBS e não foram infectados, havia presença de ferro (cor azul, Fe^{3+}) nos aglomerados de células de citoplasma claro (provavelmente macrófagos) (Figura 4.24-A), na polpa vermelha e um pouco no interior dos folículos (Figura 4.24-B).

Nos grupos de animais não infectados que receberam LC (0,5 mL ou 1,0 mL), observou-se que havia menor quantidade de ferro que nos aglomerados de macrófagos dos animais que haviam recebido PBS. A marcação se distribuía pelas polpas branca e vermelha, e nos macrófagos com variação na quantidade entre os animais (Figura 4.24-C e D).

Animais infectados - Nos animais infectados, tanto nos que receberam PBS quanto LC, havia muito mais macrófagos que nos grupos não infectados. Observou-se mais pigmento marrom (indicativo de hemozoína) do que marcação de Perls positiva distribuído principalmente na polpa vermelha (Figura 4.24-E e G). Além disso, a grande maioria dos macrófagos encontrados estavam carregados ou com ferro ou com pigmento, ou seja, sem co-localização (Figura 4.24-F e H).

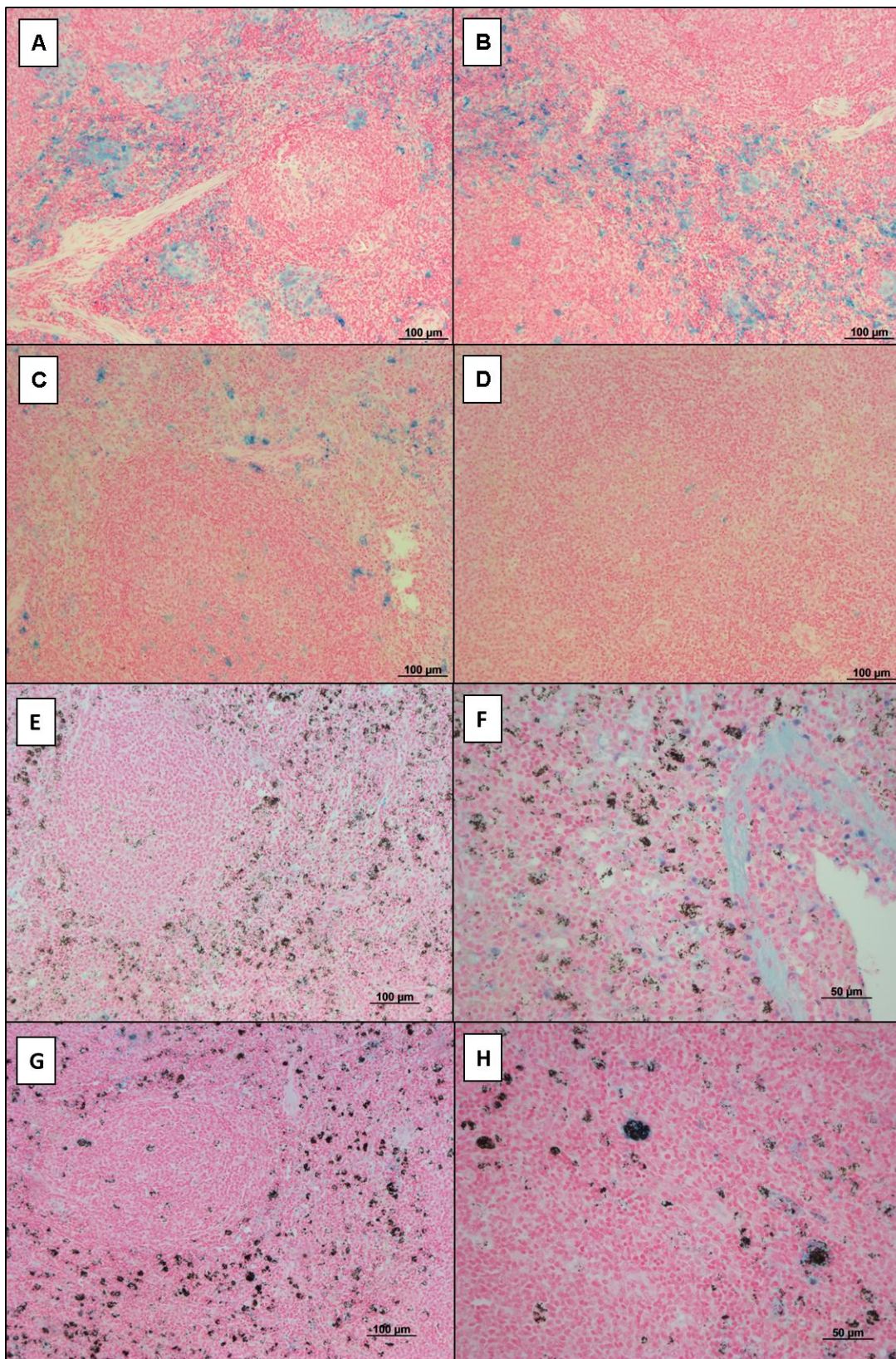


Figura 4.24: Análise histopatológica de baços de *S. sciureus* com coloração de Perls.

Grupo não infectado que recebeu PBS (A e B), grupo não infectado que recebeu 0,5mL LC (C), grupo não infectado que recebeu 1,0mL LC (D), grupo infectado que recebeu PBS (E e F) e grupo infectado que recebeu 1,0mL LC (G e H).

Seções foram cortadas (5µm), coradas com azul da Prússia (Perls), e analisadas ao microscópio óptico.

FÍGADO – COLORAÇÃO H&E

Animais não-infectados – No fígado dos grupos de animais não infectados que receberam PBS observou-se aspecto normal, ausência de necrose, vacuolização ou balonização (Figura 4.25-A). Presença de infiltrados de células mononucleares no espaço porta próximo ao vaso (Figura 4.25-B) e um infiltrado não associado ao vaso.

Um dos animais não infectados que recebeu 0,5mL (PB43) e os dois animais que receberam 1mL LC apresentaram vacuolização perivascular (Figura 4.25-C) ou difusa em algumas áreas (Figura 4.25-D).

Animais infectados - No fígado dos animais que foram infectados e receberam PBS, havia muitas células mononucleares nos sinusoides, células de Kupffer com pigmento marrom (Figura 4.25-E), infiltrado de células no espaço porta, presença de células eritroides, neutrófilos e plasmócitos (Figura 4.25-F). Observou-se vacuolização difusa em dois dos três animais (Figura 4.25-E).

Nas lâminas dos animais infectados que receberam LC 1mL observou-se áreas de vacuolização intensa, células de Kupffer com pigmentos e presença de eritroblastos (Figura 4.25-G). Aparentemente havia bem menos células de Kupffer com ferro que nos animais do grupo PBS. Notou-se a presença de ilhotas de Trentim ou ilhotas eritroblásticas, ou seja, um macrófago central rodeado de eritroblastos em desenvolvimento (Figura 4.25-H).

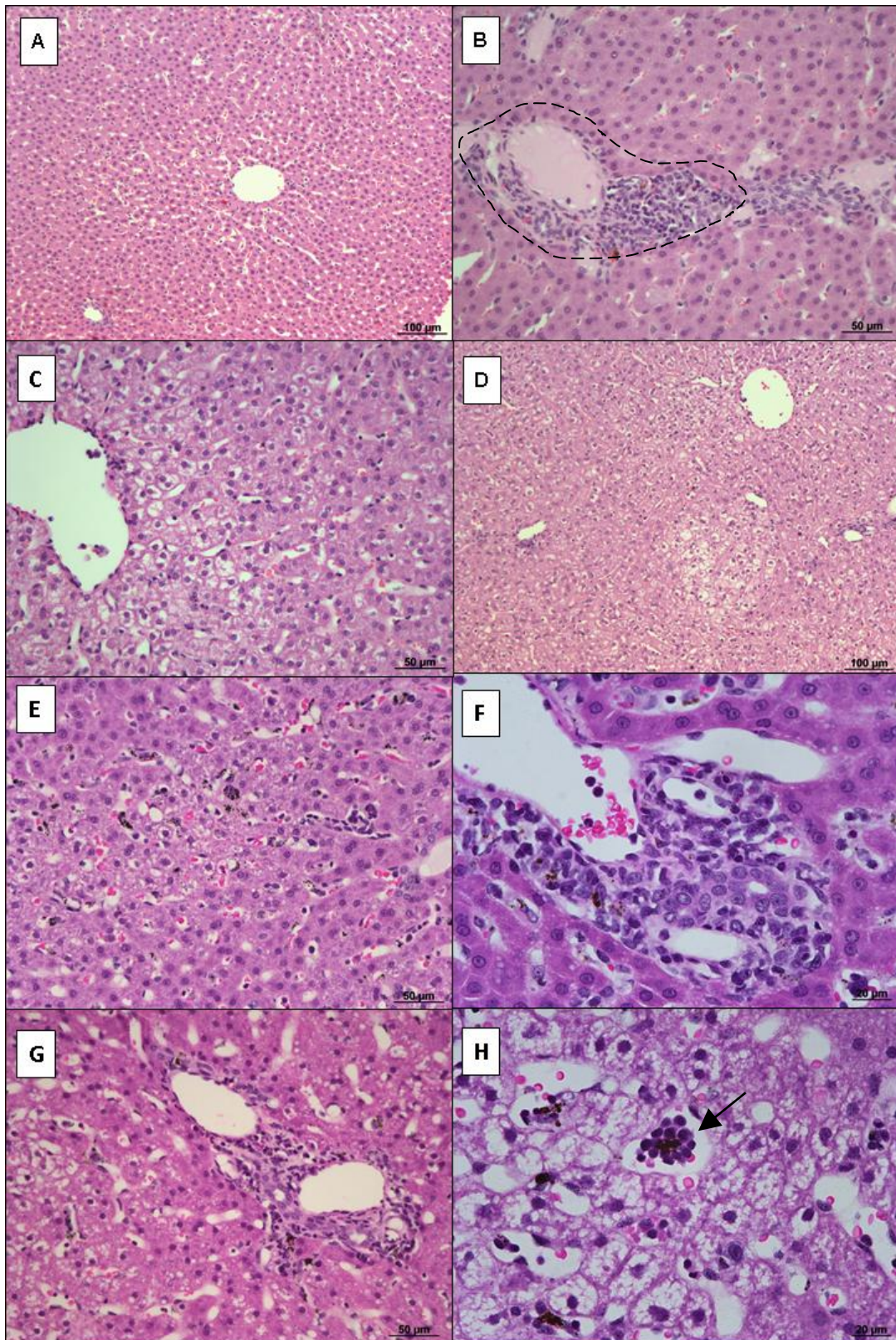


Figura 4.25: Análise histopatológica de fígados de *S. sciureus* com coloração H&E.

Grupo não infectado que recebeu PBS (A e B), grupos não infectados que receberam LC (C e D), grupo infectado que recebeu PBS (E e F) e grupo infectado que recebeu 1,0mL LC (G e H). A linha tracejada em B mostra um concentrado de células mononucleares. A seta em H mostra uma ilha de Trentin.

Seções foram cortadas (5µm), coradas com H&E, e analisadas ao microscópio óptico.

FÍGADO – COLORAÇÃO DE PERLS

Animais não-infectados - Nos animais não infectados que receberam PBS, observou-se grânulos no interior dos hepatócitos e marcação nas células dos sinusoides e ao redor do espaço porta (Figura 4.26-A e B).

Nos animais não infectados que receberam LC (0,5mL ou 1,0mL), aparentemente havia menos ferro que nas lâminas dos animais que receberam PBS (Figura 4.26-C). Notou-se que vacuolização não interferiu na distribuição do ferro nos sinusoides (Figura 4.26-D).

Animais infectados - No grupo infectado que recebeu PBS observou-se menos ferro que no grupo não infectado (Figura 4.26-E), raras co-localizações de ferro e pigmento e presença de grânulos nos hepatócitos (Figura 4.26-F).

Nos animais que foram infectados e receberam LC, observou-se áreas vacuolizadas com ferro esparso, mas não tão carregado e, aparentemente, com menos células de Kupffer que nas lâminas dos animais infectados que receberam PBS. Foi observada co-localização de pigmento e ferro em algumas células e outras apenas com pigmento (Figura 4.26-G e H).

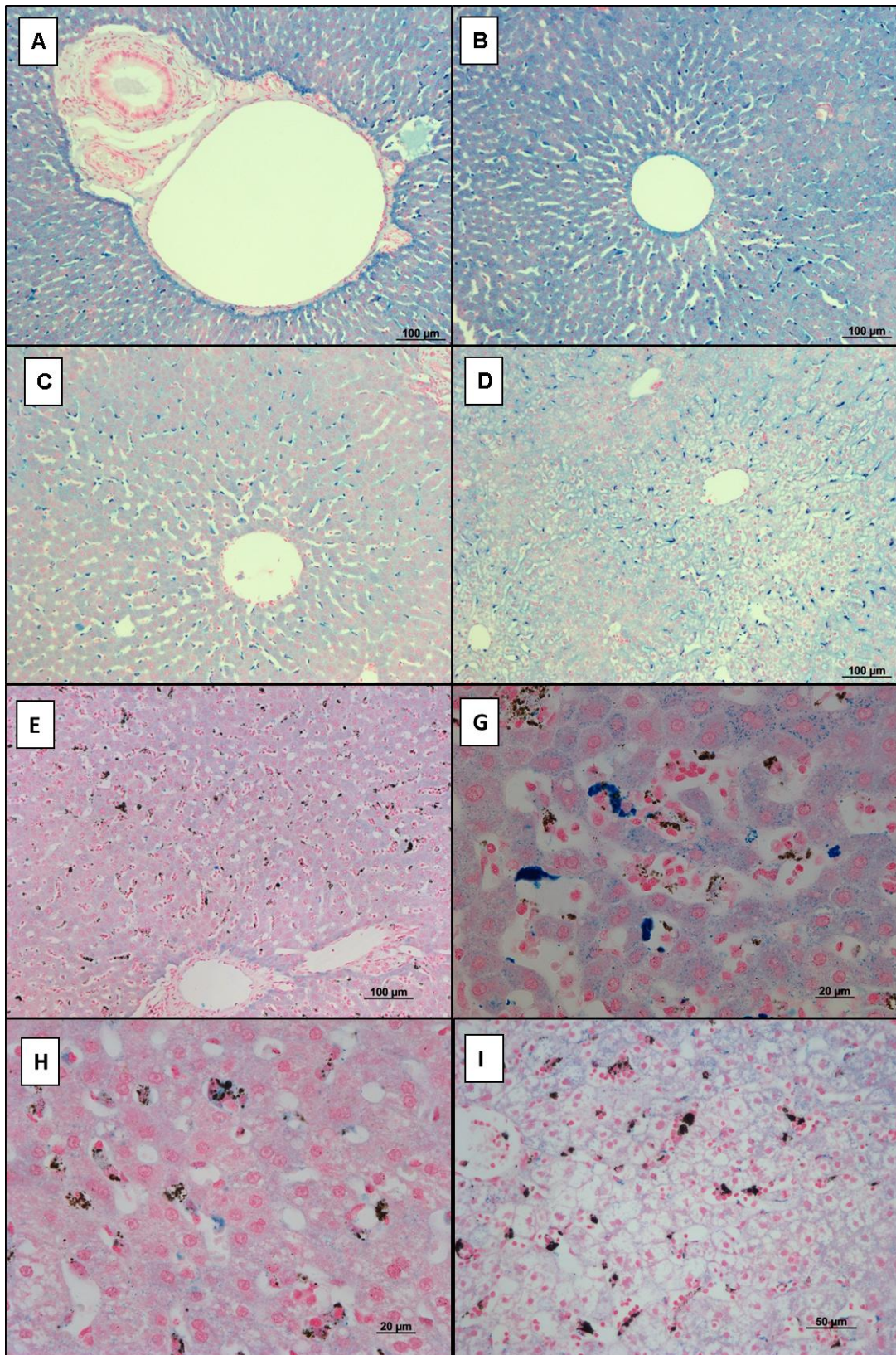


Figura 4.26: Análise histopatológica de baços de *S. sciureus* com coloração de Perls. Grupo não infectado que recebeu PBS (A e B), grupos não infectados que receberam LC (C e D), grupo infectado que recebeu PBS (E e F) e grupo infectado que recebeu 1,0mL LC (G e H). Seções foram cortadas (5µm), coradas com azul da Prússia (Perls), e analisadas ao microscópio óptico.

4.3.7 Investigação da expressão de citocinas em células de baço de *S. sciureus* infectados e não infectados por *P. falciparum*

Os esplenócitos ($2,5 \times 10^5$ células/poço) foram cultivados *in vitro* em presença de: a) PMA/ionomicina (mitógeno), b) cultivo de cepa FUP de *P. falciparum* em hemácias de *S. sciureus* e c) hemácias de *S. sciureus*. As células foram coletadas após 3h, 6h, 12h, 24h e 48h de cultura. Realizou-se extração de RNA, síntese de cDNA e reação de PCR em tempo real com iniciadores diretos e reversos para detecção de: TNF, IL1A, IL2, IL10, IL12B, IL17A, IFNB1, IL4, IL5, IL6, IFNG, LTA (Figura 4.27 à Figura 4.38).

Todos os gráficos foram mostrados, porém das doze citocinas testadas, apenas cinco (IL2, IL6, IL10, IL17A e IFNG1- Figura 4.27 à Figura 4.31) parecem ter sido estimuladas pelo mitógeno usado como controle positivo no grupo de animais controles não infectados (grupo III). Dessas, a IL2, o IFNG1 e a IL17A apresentaram aumento de expressão acima de mil vezes em comparação com células não estimuladas (Figuras 4.27, 4.30 e 4.31). A infecção com ou sem administração de LC aparentemente não alterou o nível de expressão dessas citocinas. (Figura 4.39). Entretanto, para nenhuma das citocinas foi observado aumento de expressão quando as células foram estimuladas com hemácias, parasitadas ou não. O reduzido número de amostras não permitiu uma conclusão definitiva.

O pico de expressão das citocinas foi, em geral, entre 3h e 12h.

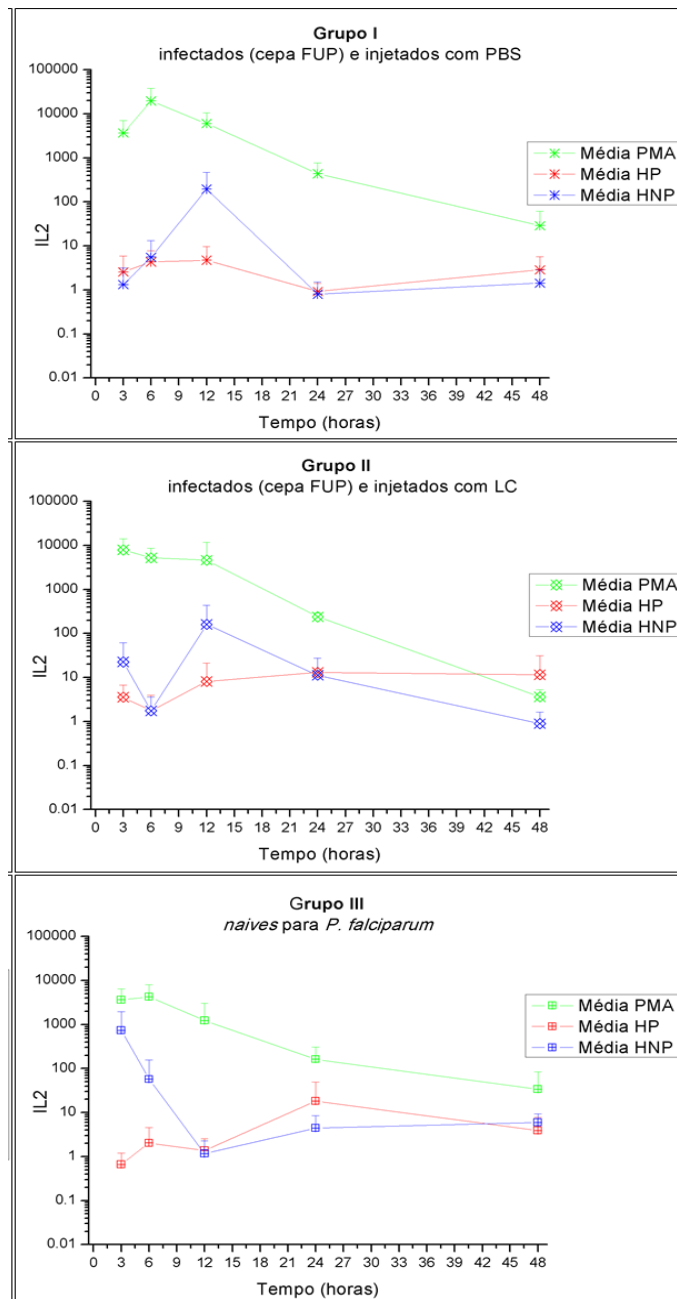


Figura 4.27: Expressão de IL2 em células do baço de seis animais infectados por *P. falciparum* e de três animais controles não infectados QUE RESPONDERAM ao estímulo *in vitro* por mitógeno (PMA).

Os valores de expressão gênica correspondem à quantificação da expressão gênica de IL2 em relação ao branco (sem estímulos antigênico ou mitogênico). À direita encontram-se os valores médios de expressão para cada grupo. HP – hemácia parasitada, HNP – hemácia não parasitada.

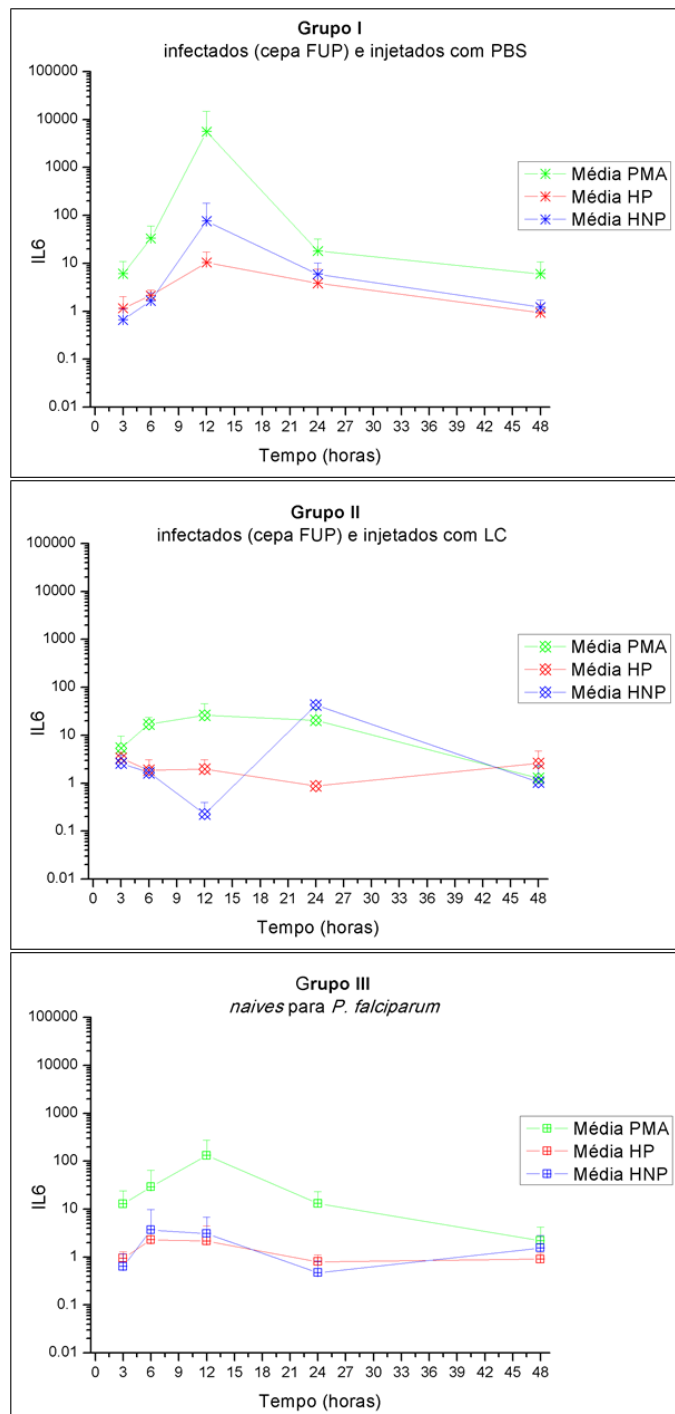


Figura 4.28: Expressão de IL6 em células do baço de seis animais infectados por *P. falciparum* e de três animais controles não infectados QUE RESPONDERAM ao estímulo *in vitro* por mitógeno (PMA).

Os valores de expressão gênica correspondem à quantificação da expressão gênica de IL6 em relação ao branco (sem estímulos antigênico ou mitogênico). À direita encontram-se os valores médios de expressão para cada grupo. HP – hemácia parasitada, HNP – hemácia não parasitada.

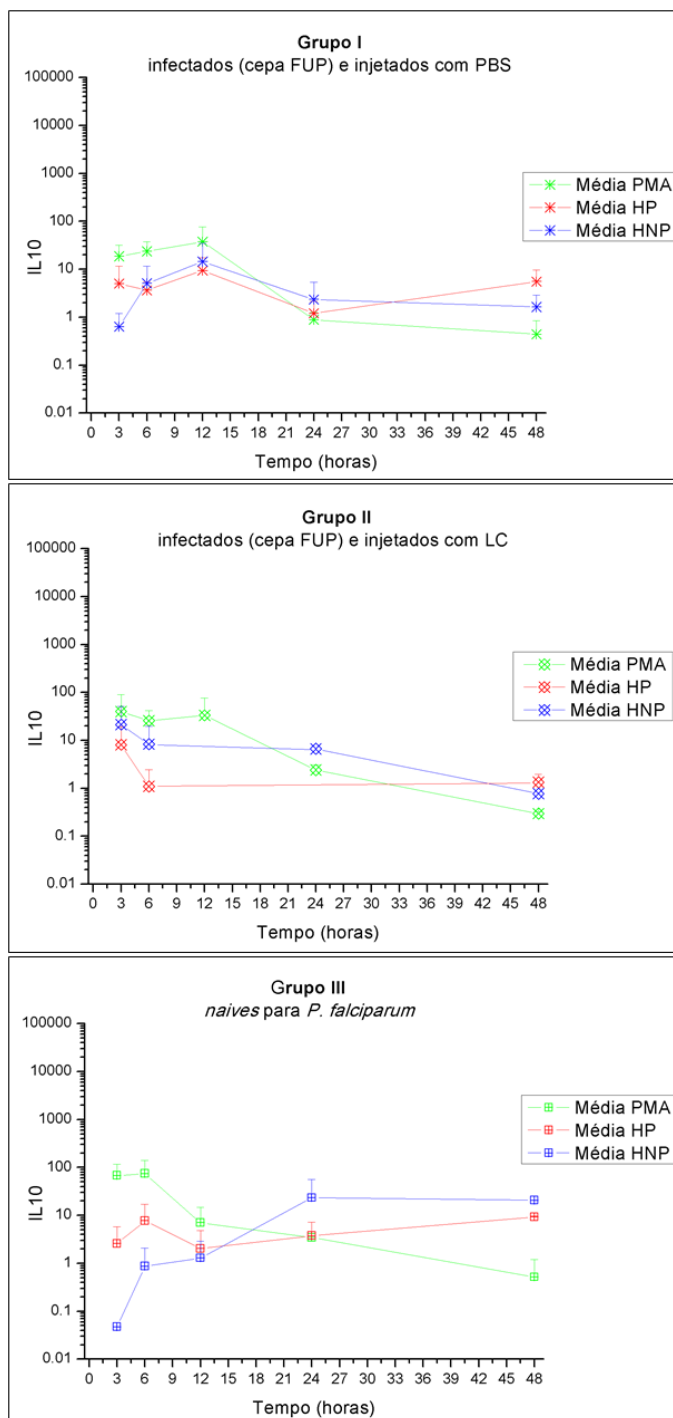


Figura 4.29: Expressão de IL10 em células do baço de seis animais infectados por *P. falciparum* e de três animais controles não infectados QUE RESPONDERAM ao estímulo *in vitro* por mitógeno (PMA).

Os valores de expressão gênica correspondem à quantificação da expressão gênica de IL10 em relação ao branco (sem estímulos antigênico ou mitogênico). À direita encontram-se os valores médios de expressão para cada grupo. HP – hemácia parasitada, HNP – hemácia não parasitada.

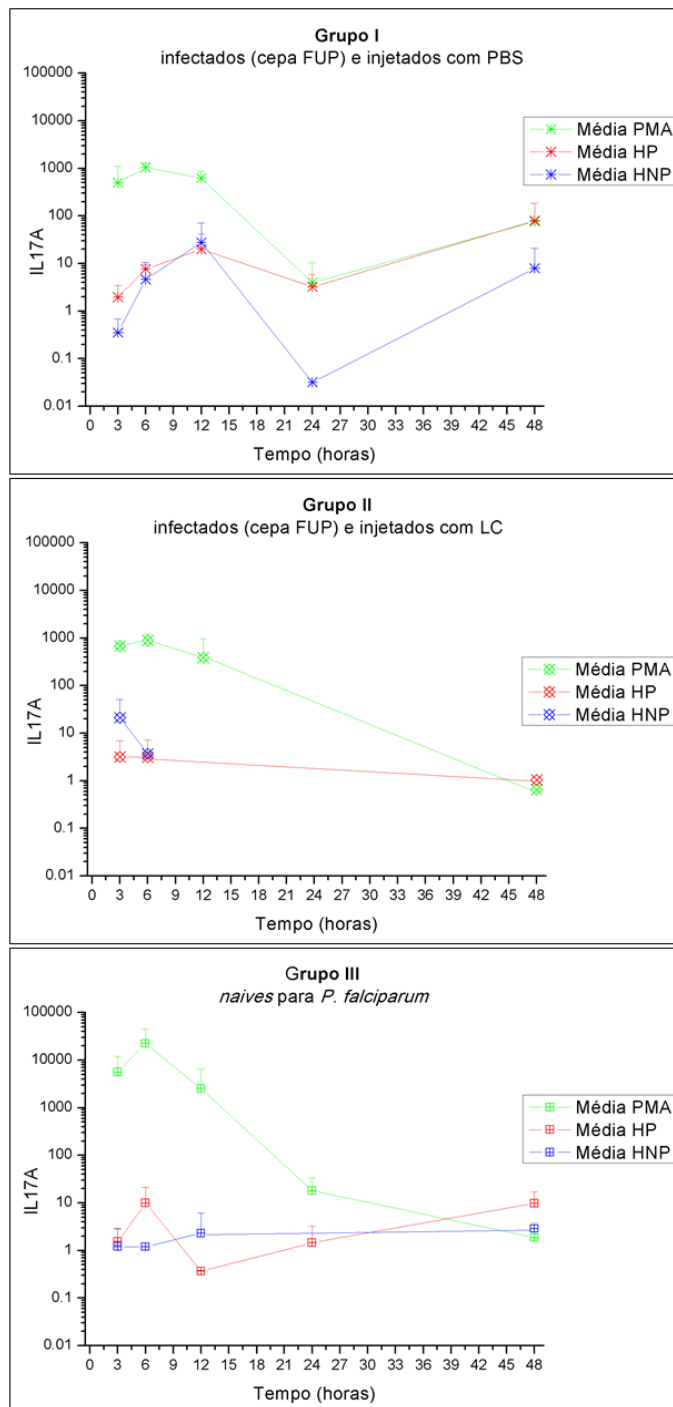


Figura 4.30: Expressão de IL17A em células do baço de seis animais infectados por *P. falciparum* e de três animais controles não infectados QUE RESPONDERAM ao estímulo *in vitro* por mitógeno (PMA).

Os valores de expressão gênica correspondem à quantificação da expressão gênica de IL17A em relação ao branco (sem estímulos antigênico ou mitogênico). À direita encontram-se os valores médios de expressão para cada grupo. HP – hemácia parasitada, HNP – hemácia não parasitada.

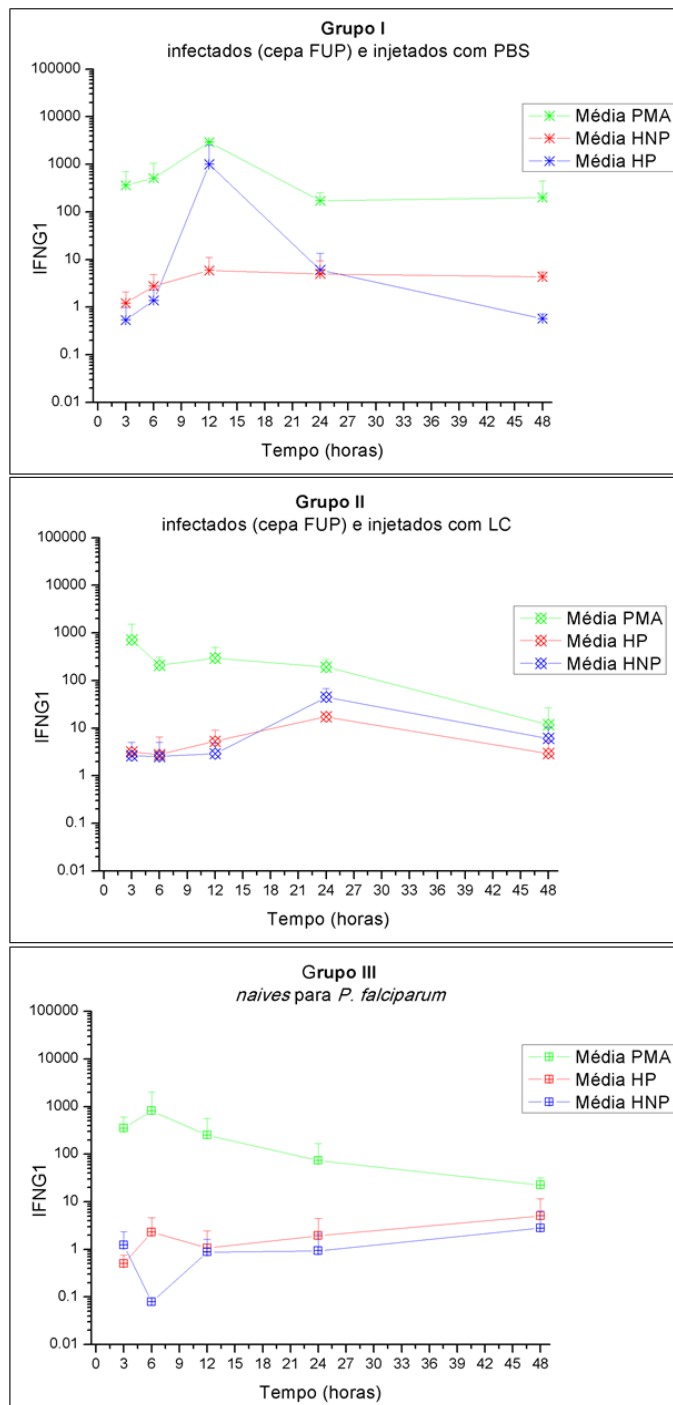


Figura 4.31: Expressão de IFNG1 em células do baço de seis animais infectados por *P. falciparum* e de três animais controles não infectados QUE RESPONDERAM ao estímulo *in vitro* por mitógeno (PMA).

Os valores de expressão gênica correspondem à quantificação da expressão gênica de IFNG1 em relação ao branco (sem estímulos antigênico ou mitogênico). À direita encontram-se os valores médios de expressão para cada grupo. HP – hemácia parasitada, HNP – hemácia não parasitada.

Os gráficos da Figura 4.32 à Figura 4.38 correspondem à expressão das citocinas no grupo controle (grupo III) **que não respondeu** adequadamente para o estímulo com o mitógeno (IFNB1, LTA, TNF, IL1A, IL4, IL5 e IL12B).

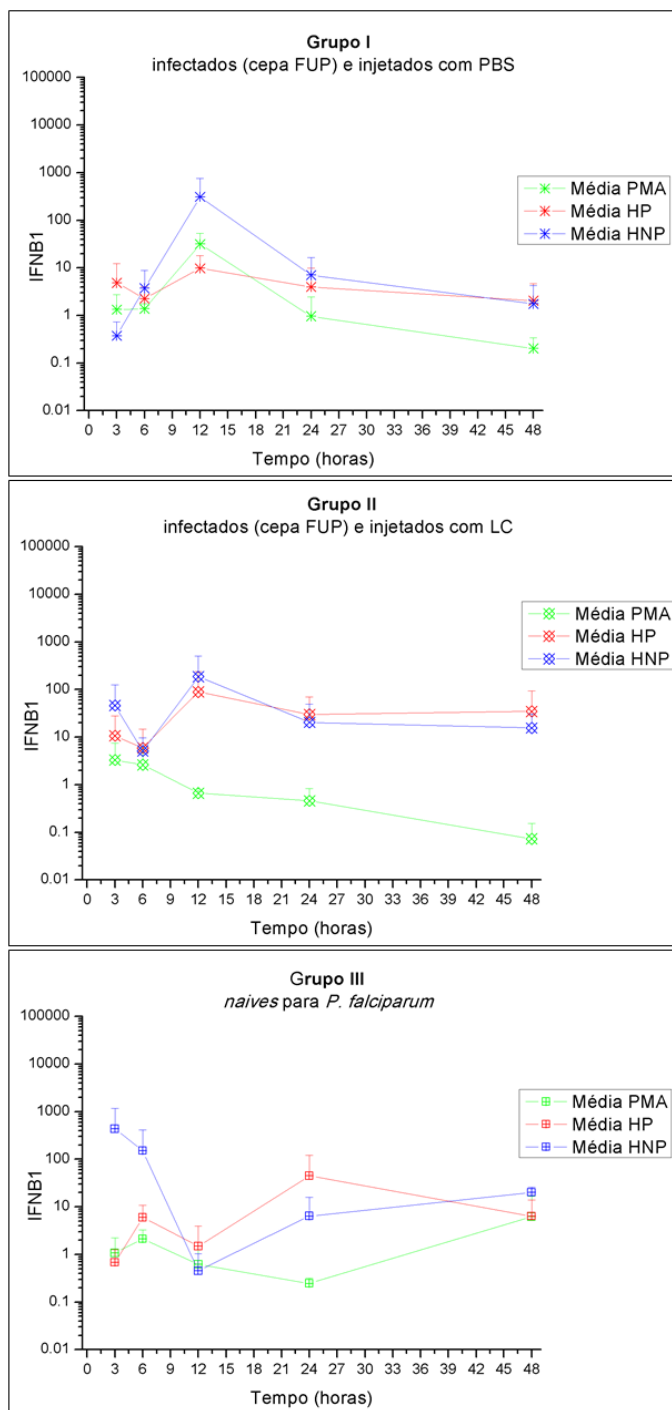


Figura 4.32: Expressão de IFNB1 em células do baço de seis animais infectados por *P. falciparum* e de três animais controles não infectados estimuladas *in vitro* pela presença de mitógeno, HP ou HNP de *Saimiri*.

Os valores de expressão gênica correspondem à quantificação da expressão gênica de IFNB1 em relação ao branco (sem estímulos antigênicos ou mitogênicos). À direita encontram-se os valores médios de expressão para cada grupo.

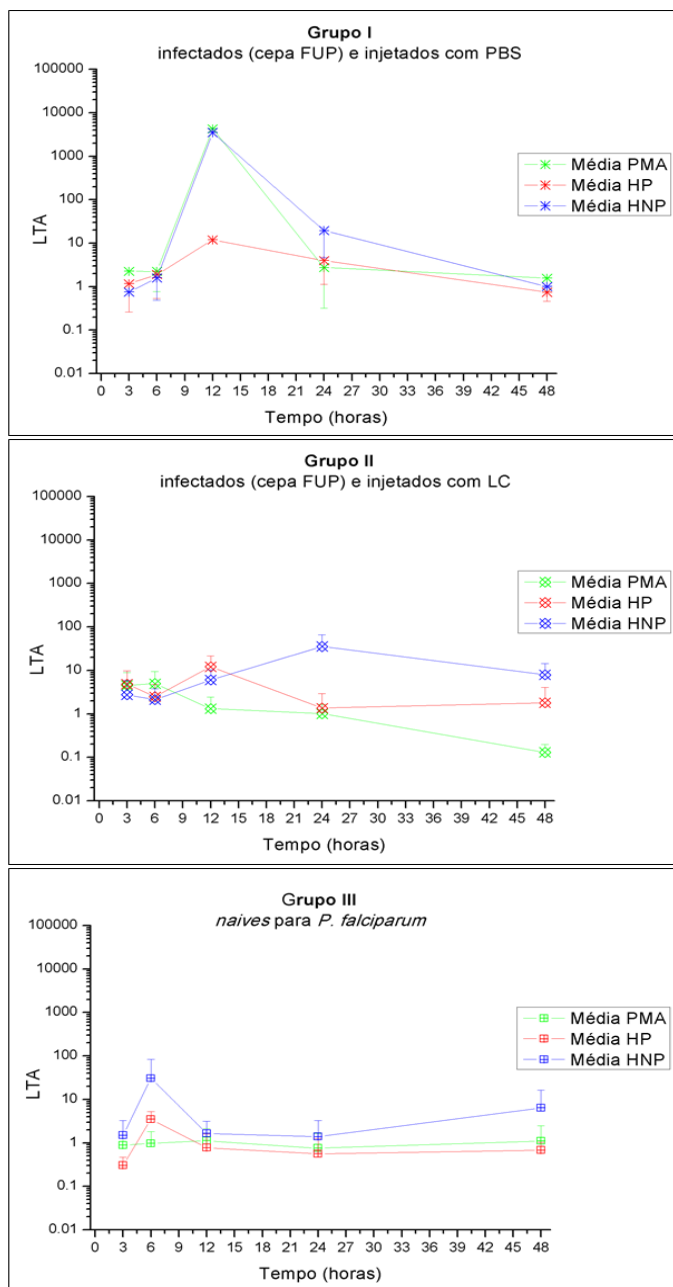


Figura 4.33: Expressão de LTA em células do baço de seis animais infectados por *P. falciparum* e de três animais controles não infectados estimuladas *in vitro* pela presença de mitógeno, HP ou HNP de *Saimiri*.

Os valores de expressão gênica correspondem à quantificação da expressão gênica de LTA em relação ao branco (sem estímulos antigênico ou mitogênico). À direita encontram-se os valores médios de expressão para cada grupo.

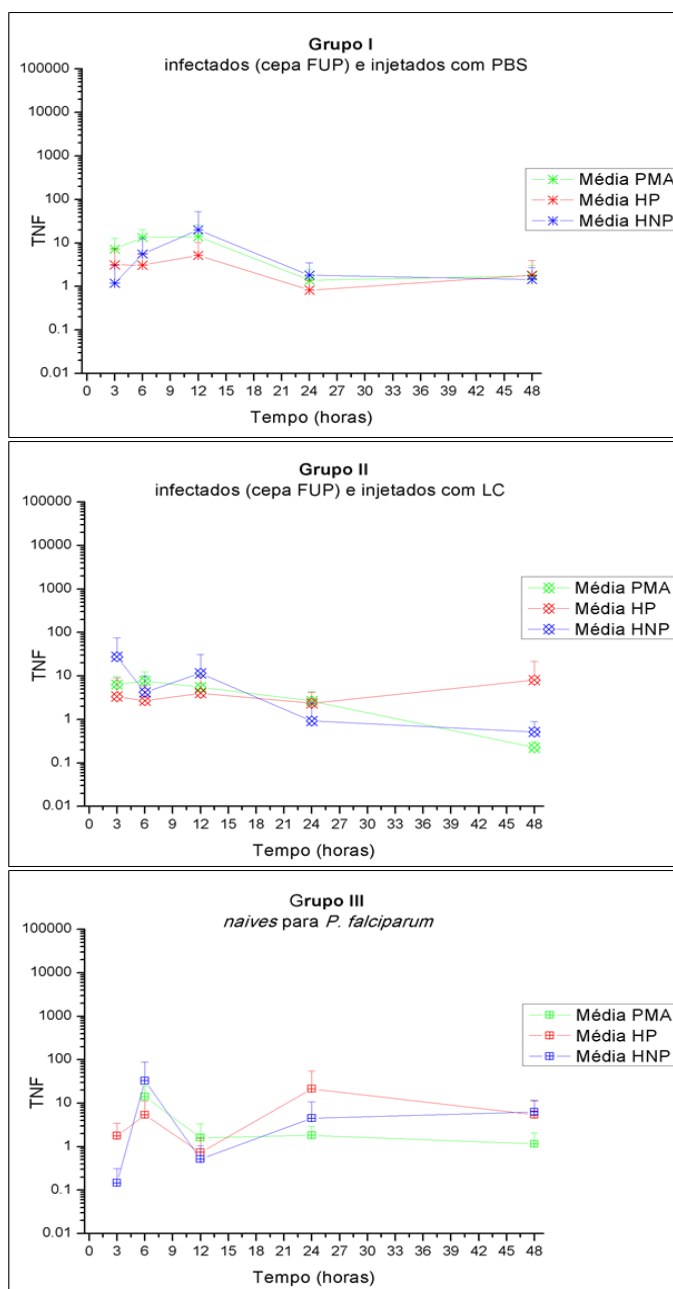


Figura 4.34: Expressão de TNF em células do baço de seis animais infectados por *P. falciparum* e de três animais controles não infectados estimuladas *in vitro* pela presença de mitógeno, HP ou HNP de *Saimiri*.

Os valores de expressão gênica correspondem à quantificação da expressão gênica de TNF em relação ao branco (sem estímulos antigênico ou mitogênico). À direita encontram-se os valores médios de expressão para cada grupo.

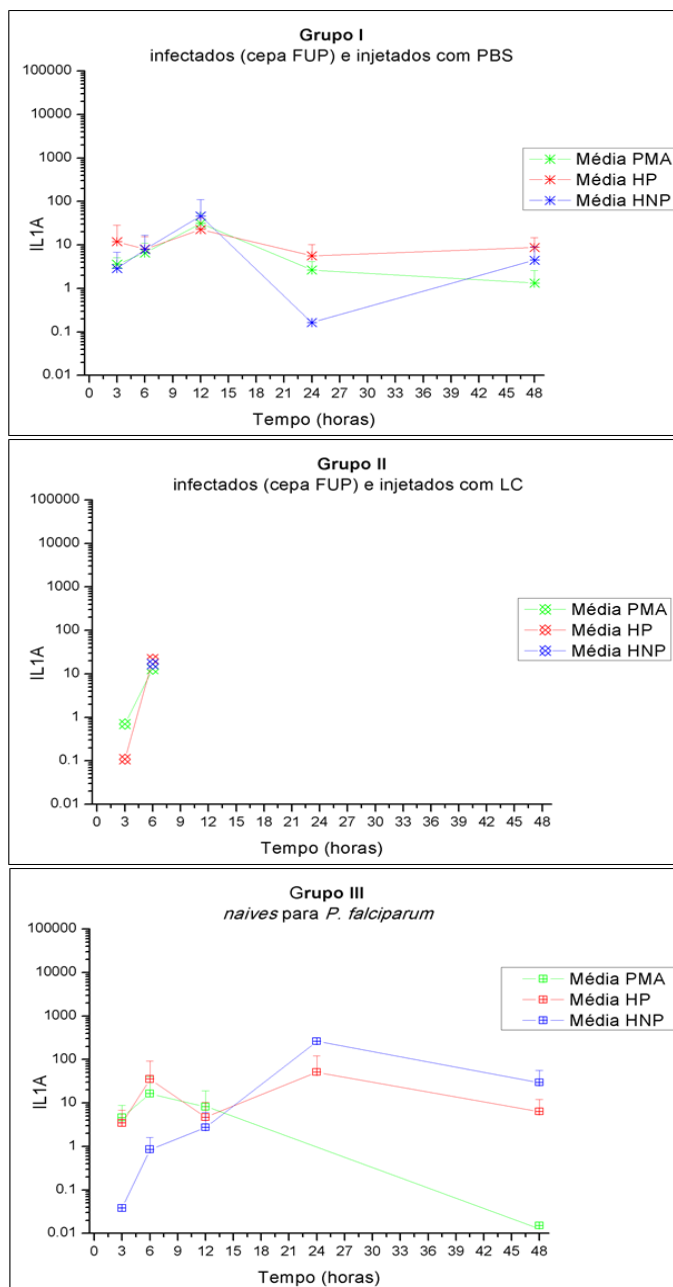


Figura 4.35: Expressão de IL1A em células do baço de seis animais infectados por *P. falciparum* e de três animais controles não infectados estimuladas *in vitro* pela presença de mitógeno, HP ou HNP de *Saimiri*.

Os valores de expressão gênica correspondem à quantificação da expressão gênica de IL1A em relação ao branco (sem estímulos antigênicos ou mitogênicos). À direita encontram-se os valores médios de expressão para cada grupo.

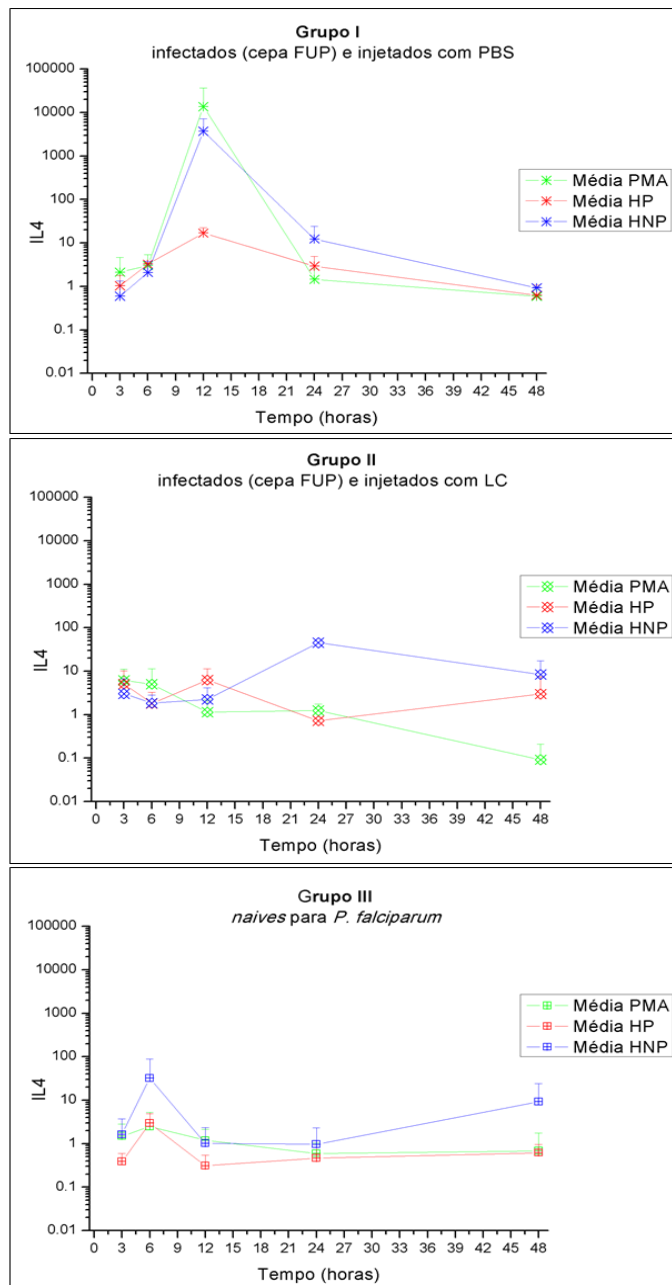


Figura 4.36: Expressão de IL4 em células do baço de seis animais infectados por *P. falciparum* e de três animais controles não infectados estimuladas *in vitro* pela presença de mitógeno, HP ou HNP de *Saimiri*.

Os valores de expressão gênica correspondem à quantificação da expressão gênica de IL4 em relação ao branco (sem estímulos antigênico ou mitogênico). À direita encontram-se os valores médios de expressão para cada grupo.

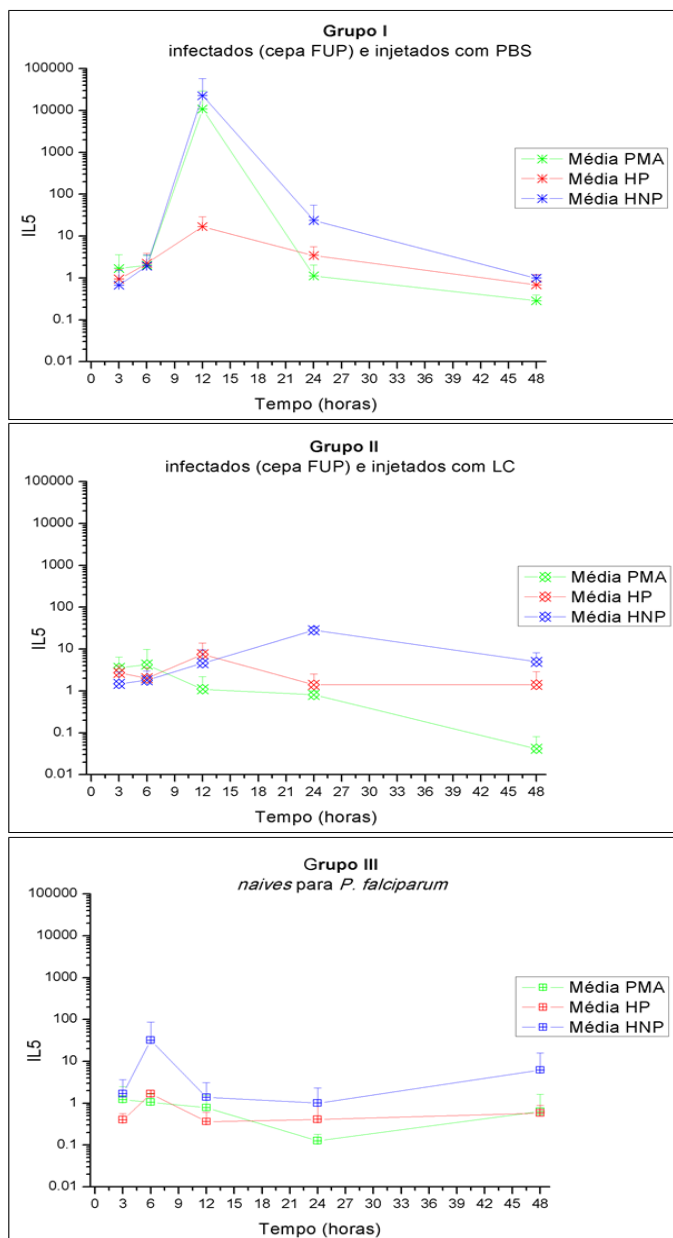


Figura 4.37: Expressão de IL5 em células do baço de seis animais infectados por *P. falciparum* e de três animais controles não infectados estimuladas *in vitro* pela presença de mitógeno, HP ou HNP de *Saimiri*.

Os valores de expressão gênica correspondem à quantificação da expressão gênica de IL5 em relação ao branco (sem estímulos antigênico ou mitogênico). À direita encontram-se os valores médios de expressão para cada grupo.

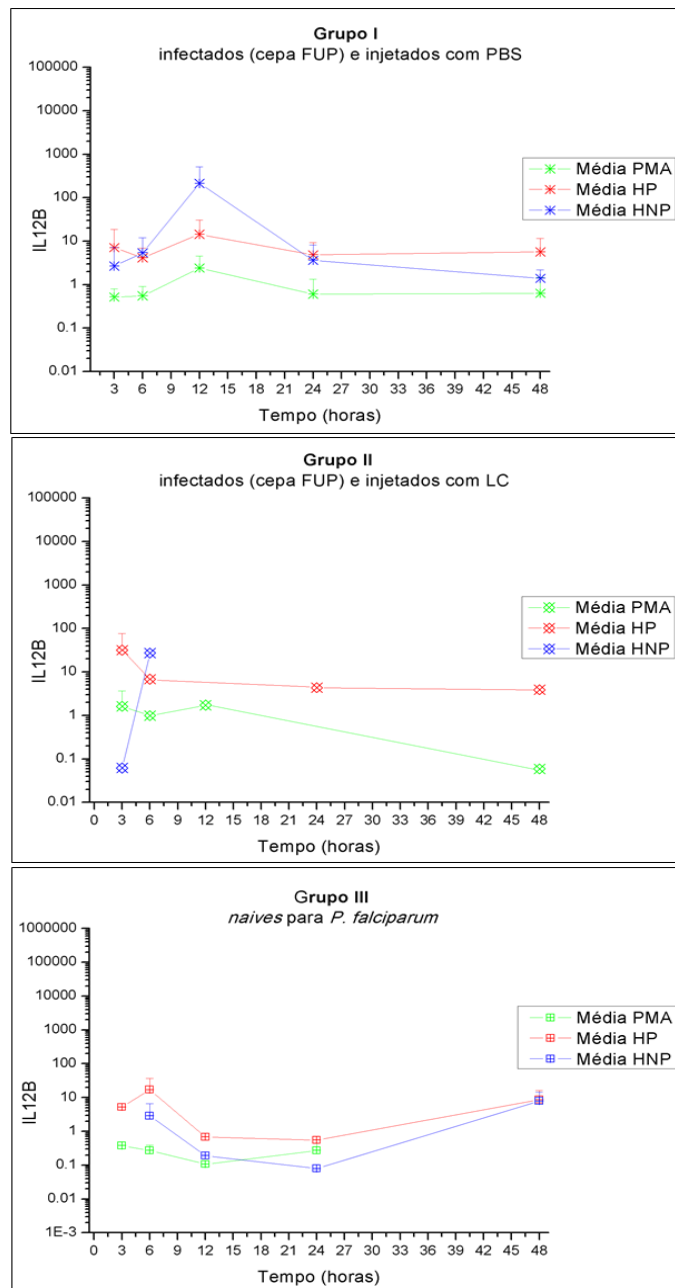


Figura 4.38: Expressão de IL12B em células do baço de seis animais infectados por *P. falciparum* e de três animais controles não infectados estimuladas *in vitro* pela presença de mitógeno, HP ou HNP de *Saimiri*.

Os valores de expressão gênica correspondem à quantificação da expressão gênica de IL12B em relação ao branco (sem estímulos antigênicos ou mitogênicos). À direita encontram-se os valores médios de expressão para cada grupo.

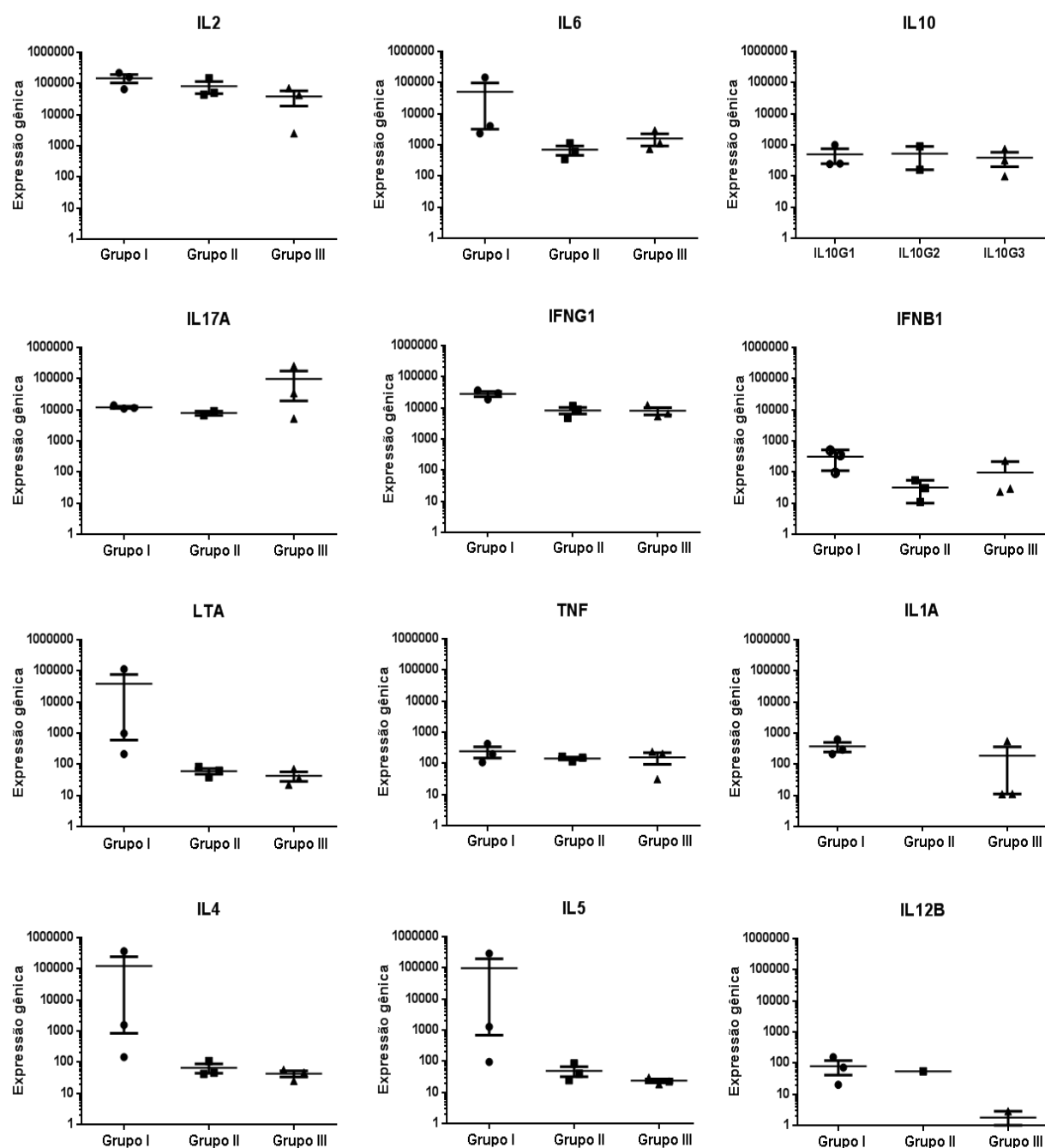


Figura 4.39: Expressão de citocinas – comparação das áreas sob a curva.

Os valores de expressão gênica correspondem às áreas sob as curvas de quantificação da expressão gênica das citocinas avaliadas em relação ao branco (sem estímulos antigênico ou mitogênico). O grupo I (animais que foram infectados e receberam PBS) está representado por círculos, o grupo II (animais que foram infectados e receberam 1 mL de LC) está representado por quadrados e o grupo III (animais “naives” para *P. falciparum*) está representado por triângulos.

5 DISCUSSÃO

A malária é uma doença parasitária que acomete mamíferos, aves e répteis. Como o *Plasmodium* spp tem bastante especificidade para o hospedeiro (Warrell, Gilles, 2002), a barreira entre espécies é um obstáculo para a pesquisa da malária humana em modelo animal experimental, que deve refletir a patologia humana. Tanto os modelos murino e aviário quanto os primatas não-humanos são usados na pesquisa em malária. O modelo de infecção de *P. falciparum* em primatas neotropicais, mais próximos filogeneticamente ao homem, apresenta uma importante limitação que é a necessidade da esplenectomia prévia dos animais para a obtenção de parasitemias altas e consistentes (Collins, 1992). Com o objetivo de contornar esse problema, testamos o uso da suspensão de lipossomo-clodronato (LC), utilizado há mais de duas décadas em estudos imunológicos como eficiente depletor de macrófagos *in vitro* e *in vivo*, uma vez que estas células são, no curso da malária, importantes na destruição do parasito (Criswell, 1971). Utilizou-se a cepa FUP de *P. falciparum* adaptada ao primata neotropical *Saimiri sciureus* cariótipo 14-7.

Os primatas neotropicais não esplenectomizados, usados como modelo de infecção de malária humana, dificilmente desenvolvem parasitemias altas e consistentes. Contamin e colaboradores (2000) utilizaram inóculo de 10^6 hemácias parasitadas e identificaram reprodutibilidade na parasitemia em pré-patência e duração, mas parasitemia máxima entre 2% e 10% dependendo do animal. No nosso laboratório conseguimos parasitemias mais elevadas (máxima entre 7% e 14%) com inóculo mais alto (5×10^8 hemácias parasitadas), mas com grande variação de animal para animal (Violeta Sanchez *et al*, dados não publicados). Por isso, usamos o LC a fim de obter parasitemias elevadas, reprodutivas e similares sem necessidade de cirurgia. Os dados referentes à parasitemia nos dois experimentos indicam que o LC é capaz de favorecer a infecção ocasionando parasitemias homogêneas de maneira semelhante à esplenectomia (Contamin *et al*, 2000; Carvalho *et al*, 2003). No entanto, mais estudos parecem ser necessários para se estabelecer a dose e o regime de administração mais adequado para obtenção de parasitemias altas e uniformes com a menor toxicidade possível. Outra questão importante é a própria preparação utilizada. O LC constitui uma limitação uma vez que pode variar de estudo para estudo tratando-se de um produto perecível,

importado e com dificuldade teórica de se garantir a reprodutibilidade de resultados obtidos com diferentes lotes adquiridos.

A malária é uma doença sistêmica que provoca alterações em diversos órgãos, tais como cérebro, rins, pulmões, baço e fígado. A gravidade varia desde formas benignas até formas muito graves e fatais. Os sintomas variam de acordo com a espécie e a cepa do plasmódio, com a imunidade do paciente, com a região geográfica, dentre outros. Além dos característicos acessos maláricos que ocorrem a cada ciclo de esquizogonia sanguínea, outros sintomas incluem anorexia, astenia, palidez, náuseas, vômitos, cefaleias e algias em praticamente todas as regiões do corpo. Pode apresentar variações clínicas: formas agudas (malária grave por *P. falciparum*, febre hemoglobinúrica) e formas crônicas (nefropatias maláricas, síndrome da esplenomegalia hiper-reativa à malária). (REY, 2002; MS, 2009; WHO, 2011).

A anemia é frequentemente associada com a malária e a anemia severa é uma das principais causas de morbimortalidade, principalmente em crianças em áreas endêmicas de transmissão de *P. falciparum* (Pradhan, Ghosh, 2009). A anemia foi descrita em *S. sciureus boliviensis* (Kakoma *et al*, 1992), *S. sciureus guyanensis* (Contamin *et al*, 2000) e *S. sciureus* cariótipo 14-7 (Alves, 2009). Em ambos os experimentos, todos os animais infectados apresentaram reduções nos níveis de hemoglobina e hematócrito. Em nosso estudo, as reduções em relação aos valores pré-infecção não pareceram depender das administrações ou concentrações de LC, mas da parasitemia do animal.

A febre, uma manifestação clínica típica da malária, também foi observada. A temperatura corporal normal de *Saimiri* adultos saudáveis mantidos em ambiente com temperatura controlada de 33°C é de 39°C ± 0,5°C (Stitt, 1971) e a temperatura retal dos animais parasitados é 0,7°C mais elevada em relação aos não parasitados (Contamin, 2000). Nos dois experimentos realizados, a temperatura dos animais estava relacionada com a presença e variação da parasitemia. No experimento 1 a temperatura variou 2,2°C e no experimento 2 variou 1,5°C para cima ou para baixo.

Aparentemente, nem a infecção e tampouco as administrações de LC alteraram de maneira marcante o número de monócitos circulantes.

A infecção malárica provoca alterações no baço. O órgão fica aumentado e escuro devido à captação e fagocitose de hemácias infectadas e intensa atividade linfóide no órgão. Essas alterações macroscópicas foram observadas nos animais que receberam PBS, mas não foram observadas (experimento 1) ou foram

observadas de maneira mais suave (experimento 2) nos que receberam LC, mesmo com uma parasitemia mais elevada. Essa diferença no tamanho dos baços (entre animais infectados que receberam ou não o LC) foi mais acentuada no experimento 1 que no experimento 2.

Na análise histopatológica dos baços, os animais que receberam LC e não foram infectados apresentaram aparentemente a polpa vermelha mais abundante do que os que não receberam LC. Tal possibilidade necessitaria ser investigada por meio de exames morfométricos, para avaliação da proporção polpa branca polpa vermelha. Não foi observada diferença na estrutura da polpa branca entre o grupo PBS e os grupos LC não infectados.

Tanto o trabalho de Carvalho e colaboradores (2007) com camundongos infectados com *P. berghei* ANKA quanto o de Alves (2009) com *S. sciureus* infectados com *P. falciparum* FUP observou que a malária provoca desestruturação da arquitetura normal do baço, particularmente nos centros germinativos.

Nós observamos nos grupos infectados, assim como registrado nos trabalhos citados, a presença de pigmento marrom (hemozoína) e de corpos apoptóticos, além da desorganização da zona marginal, sem diferenças significativas entre animais que receberam PBS e que receberam LC. A presença de plasmócitos e precursores eritroides nos grupos infectados podem indicar ativação de células B e eritropoiese extra medular, respectivamente. A presença de ilhotas de Trentin ou ilhotas eritroblásticas nos animais infectados que receberam LC sugere que, uma vez que o macrófago protege e oferece nutrientes para o desenvolvimento dos eritroblastos e, que os animais desse grupo apresentaram anemia mais severa, elas resultem do consequente estímulo da eritropoiese. Para confirmação desses dados é necessária a análise do material com coloração de Giemsa para melhor identificação dos tipos celulares, além de marcação para Ig para confirmação da ativação de células B.

O pigmento malárico é um hemoglobínogeno derivado do metabolismo patológico da hemoglobina pelo *Plasmodium* sp. O corante azul da Prússia se liga aos sais dos tecidos (valência Fe^{2+}) aparecendo em azul, mas não ao pigmento malárico (valência Fe^{3+}), que aparece em castanho na leitura ao microscópio. A análise das lâminas com essa coloração mostrou que nos animais não infectados que receberam LC havia menos marcação para ferro do que nos animais PBS indicando uma depleção parcial de macrófagos. De fato, essas células são importantes captadoras de ferro devido à fagocitose de eritrócitos e metabolismo da

hemoglobina. Nos animais infectados havia muito mais macrófagos, o que se deve provavelmente a uma resposta à infecção. A grande maioria dessas células apresentou marcação de hemozoína, e raramente marcação de Perls ou co-localização. Considerando que na infecção os macrófagos fagocitam hemozoína, que é de difícil remoção, a capacidade fagocítica fica comprometida dificultando ou impossibilitando a fagocitose de hemácias normais e a consequente incorporação de ferro. Na análise do fígado também foi possível observar depleção parcial de macrófagos pela coloração de Perls.

Esperava-se que a depleção fosse visível e óbvia na estrutura do tecido. Como pela coloração de H&E essa alteração não se mostrou claramente, tentamos padronizar a imunofluorescência utilizando anticorpos anti-macrófago. No entanto, não foi possível concluir para a dissertação, mas ainda constitui um dos objetivos do trabalho.

Certamente, estudos morfométricos mais detalhados, além do uso da técnica de imunofluorescência, serão fundamentais para confirmar e quantificar essa depleção parcial. Além disso, foram identificados sinais de toxicidade hepática (vacuolização de hepatócitos) nos dois volumes de LC administrados (0,5mL e 1,0mL), o que requer a realização de novos estudos para se determinar a mínima dose funcional e sua atividade dose dependente.

A análise da resposta imune em primatas não humanos do gênero *Saimiri* em ensaios vacinais tem uma importante dificuldade que é a escassez de ferramentas disponíveis. As citocinas expressas por células do sistema imune desempenham papel essencial durante a infecção plasmodial (Iriemenam, 2009). Assim, reagentes e ensaios específicos para a detecção e quantificação de citocinas de *Saimiri* a fim de esclarecer as alterações imunológicas e fisiopatológicas que ocorrem durante a infecção experimental nestes animais são bem vindos. O grupo do Laboratório de Pesquisas em Malária (IOC, Fiocruz) desenvolveu uma metodologia utilizando a técnica de PCR em tempo real que permite a aferição da expressão do mRNA de IL2, IL6, IL10, IL12, IFNG, TNF e LTA possibilitando a avaliação aprofundada da resposta imune em diversas abordagens experimentais (Alves, 2009). O grupo vem comparando o uso de metodologias moleculares e imunológicas para monitorar a resposta imune celular de *S. sciureus* em estudos de imunização com candidatos vacinais (Riccio *et al*, *submetido*).

A detecção de diferenças sem significância estatística em praticamente todos os parâmetros estudados, apesar da análise realizada de maneira detalhada e

críteriosa, e conseqüentemente a difícil interpretação dos dados obtidos pelo uso de tais métodos em nosso estudo, decorreram das grandes variações individuais observadas no número reduzido de animais utilizados em cada grupo. Para superar esse problema seria necessária a utilização de um número maior de animais por grupo nos experimentos, o que constitui uma limitação natural quando se trata de trabalho com primatas não-humanos.

Existe um indicativo de que a intervenção funciona, porém os experimentos não foram reprodutíveis (o volume de 1mL não funcionou no 2º experimento) o que leva a necessidade da realização de um experimento confirmatório, que está em preparação e ocorrerá no Centro de Experimentação da Fiocruz ainda em 2014.

6 CONCLUSÕES

- Ainda que os experimentos não tenham sido totalmente reprodutíveis, o lipossomo-clodronato (LC) foi capaz de promover parasitemias mais altas em primatas neotropicais *Saimiri sciureus* infectados por *Plasmodium falciparum*;
- a parasitemia esteve associada a evidências de depleção de macrófagos, como diferenças no tamanho de baços e menor presença de ferro no baço e fígado dos animais que receberam LC mostrando que houve uma depleção, ainda que parcial, dessas células;
- o LC apresentou toxicidade hepática nos volumes administrados (0,5 mL e 1 mL).

7 PERSPECTIVAS

Apesar de não termos obtidos resultados uniformes com os dois volumes estudados nos dois experimentos, observamos o potencial da utilização desta abordagem. Assim, propomos explorar algumas questões ainda pendentes:

- com vistas à questão de sua toxicidade, avaliar o menor volume de lipossomo-clodronato (LC) que apresente eficácia na indução de parasitemias altas e consistentes e pesquisar a dependência de volume no efeito de depleção de macrófagos e monócitos;

- avaliar diferentes regimes de administração de LC, incluindo o regime de dose única, a fim de diminuir o número de administrações e de manipulações nos animais;

- estudar as alterações teciduais no baço e no fígado utilizando coloração de Giemsa, imunofluorescência e técnicas morfométricas mais detalhadas a fim de analisar de forma mais aprofundada, e quantificar a depleção de macrófagos nos tecidos alvos;

- incluir estudos histopatológicos dos rins e da medula óssea para avaliar a influência da infecção e do LC e suas consequências sobre esses órgãos;

- buscar uma solução para as limitações impostas pelo preço e disponibilidade de LC, como a sua produção na Instituição, em colaboração com outros laboratórios. Isso facilitaria a realização de mais estudos e o uso rotineiro dessa abordagem no modelo experimental.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
- Achtman AH, Khan M, MacLennan IC, Langhorne J. *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice induces strong B cell responses and striking but temporary changes in splenic cell distribution. *J Immunol*. 2003 jul; 171(1): 317-24.
- Alves FA, Abril 2009. Desenvolvimento e validação de ferramentas moleculares para análise da resposta imune de primatas *Aotus* e *Saimiri*. Tese.
- Agnandji ST, Lell B, Soulanoudjingar SS, Fernandes JF, Abossolo BP, Conzelmann C, et al. First Results of Phase 3 Trial of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African Children. *N Engl J Med*. 2011 nov; 365(20): 1863-75.
- Arnold L, Tyagi RK, Meija P, Van Rooijen N, Pérignon JL, Druilhe P. Analysis of innate defences against *Plasmodium falciparum* in immunodeficient mice. *Malar J*. 2010 Jul 9; 9:197.
- Arnold L, Tyagi RK, Meija P, Swetman C, Gleeson J, Pérignon JL, Druilhe P. Further improvements of the *P. falciparum* humanized mouse model. *PLoS One*. 2011 Mar 31; 6(3):e18045.
- Badell E, Oeuvray C, Moreno A, Soe S, van Rooijen N, et al. Human malaria in immunocompromised mice: an *in vivo* model to study defense mechanisms against *Plasmodium falciparum*. *J Exp Med* 2000; 192: 1653–1660.
- Baer K, Klotz C, Kappe SH, Schnieder T, Frevert U. Release of hepatic *Plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS Pathog*. 2007a; 3:171.
- Baer K, Roosevelt M, Clarkson AB Jr, van Rooijen N, Schnieder T, Frevert U. Kupffer cells are obligatory for *Plasmodium yoelii* sporozoite infection of the liver. *Cell Microbiol*. 2007b Feb; 9(2):397-412. Epub 2006 Aug 31.
- Biewenga J, van der Ende MB, Krist LFG, Borst A, Ghufron M, van Rooijen N. Macrophage depletion in the rat after intraperitoneal administration of liposome-encapsulated clodronate: depletion kinetics and accelerated repopulation of peritoneal and omental macrophages by administration of Freund's adjuvant. *Cell Tissue Res*. 1995; 280: 189-196.
- Borre MB, Dziegiel M, Høgh B, Petersen E, Rieneck K, Riley E, et al. Primary structure and localization of a conserved immunogenic *Plasmodium falciparum* glutamate rich protein (GLURP) expressed in both the preerythrocytic and erythrocytic stages of the vertebrate life cycle. *Mol Biochem Parasitol*. 1991 Nov; 49(1):119-31.

- Carvalho LJM, Oliveira SG, Alves FA, Brígido MCO, Muniz JAPC, Daniel-ribeiro CT. *Aotus infulatus* is susceptible to *Plasmodium falciparum* infection and may constitute an alternative experimental model for malaria. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000; 95(3): 363-365.
- Carvalho LJM, Daniel-Ribeiro CT, Goto H. Malaria Vaccine: Candidate Antigens, Mechanisms, Constraints and Prospects. Scand J Immunol. 2002 oct; 56(4): 327–343.
- Carvalho LJ, Alves FA, de Oliveira SG, do Valle Rdel R, Fernandes AA, Muniz JA, Daniel-Ribeiro CT. Severe anemia affects both splenectomized and non-splenectomized *Plasmodium falciparum*-infected *Aotus infulatus* monkeys. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003 jul; 98(5):679-86.
- Carvalho LJM, Oliveira SG, Theisen M, Alves FA, Andrade MCR, Zanini GM, Brígido MCO, Oeuvray C, Povia M, Muniz JAPC, Druilhe P, Daniel-Ribeiro CT. Immunization of *Saimiri sciureus* monkeys with *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein-3 and Glutamate-Rich Protein suggests that protection is related to antibody levels. Scand J Immunol. 2004; 59: 363-372.
- Carvalho LJM, Alves FA, Bianco-Jr C, Oliveira SG, Zanini GM, Soe S, Druilhe P, Theisen M, Muniz JAPC, Daniel-Ribeiro CT. Immunization of *Saimiri sciureus* monkeys with a recombinant hybrid protein derived from the *Plasmodium falciparum* antigens Glutamate-Rich Protein and Merozoite Surface Protein-3 can induce partial protection with Freund's and Montanide ISA720 adjuvants. Clin Diagn Lab Immunol. 2005; 12(2): 242-248.
- Carvalho LJ, Ferreira-da-Cruz MF, Daniel-Ribeiro CT, Pelajo-Machado M, Lenzi HL. Germinal center architecture disturbance during *Plasmodium berghei* ANKA infection in CBA mice. Malar J. 2007 May 16;6: 59.
- Chrubasik C, Jacobson RL. The development of artemisinin resistance in malaria: reasons and solutions. Phytother Res. 2010 jul; 24(7): 1104-6.
- Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J, Erhardt W, Flecknell P, Gregory N, Hackbarth H, Morton D, Warwick C. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. DGXT of the European Commission. Lab Anim. 1997 Jan;31(1):1-32.
- Collins W. South American monkeys in the development and testing of malaria vaccines. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992; (87): 401-406.
- Collins WE, Galland GG, Barnwell JW, Udhayakumar V, Sullivan JS, Nace D, Tongren JE, Williams T, Roberts J, Shi YP, Lal AA. Preliminary observations on the efficacy of a recombinant multistage *Plasmodium falciparum* vaccine in *Aotus nancymai* monkeys. Am J Trop Med Hyg. 2005 oct; 73(4): 686-93.
- Contamin H, Behr C, Mercereau-Puijalon O, Michel JC. *Plasmodium falciparum* in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*): infection of nonsplenectomised animals as a model for exploring clinical manifestations of malaria. Microbes Infect. 2000 jul; 2(8): 945-54.
- Costa AP, Brasil P, Di Santi SM, Araujo MP, Suárez-Mutis MC, Santelli ACFS, Oliveira-Ferreira J, Lourenço RO e Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: what

- happens outside the Amazonian endemic region. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014 ago; 109(5): 618-633.
- Costa AP, Bressan CS, Pedro RS, Souza RV, Silva S, Souza PR, Guaraldo L, Ferreira-da-Cruz MF, Daniel-Ribeiro CT, Brasil P. Diagnóstico tardio de malária em área endêmica de dengue na extra-Amazônia brasileira: experiência recente de uma unidade sentinela no Estado do Rio de Janeiro. Rev Soc Bras Med Trop. 2010; 43(5):571-574.
 - Criswell BS, Butler WT, Rossen RD, Knight V. Murine malaria: the role of humoral factors and macrophages in destruction of parasitized erythrocytes. J Immunol. 1971 Jul; 107(1): 212-221.
 - Dondorp AM, Yeung S, White L, Nguon C, Day NP, Socheat D, von Seidlein L. Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. Nat Rev Microbiol. 2010 Apr; 9(4): 272-80. Epub 2010 Mar 8.
 - Douglas NM, Anstey NM, Buffet PA, Poespoprodjo JR, Yeo TW, White NJ, Price RN. The anaemia of *Plasmodium vivax* malaria. Malar J. 2012: 135.
 - Dziegiel M, Borre MB, Jepsen S, Høgh B, Petersen E, Vuust J. Recombinant *Plasmodium falciparum* glutamate rich protein; purification and use in enzyme-linked immunosorbent assay. Am J Trop Med Hyg. 1991 Mar; 44(3):306-13.
 - França TCC, Santos MG, Figueroa-Villar JD. Malária: Aspectos Históricos e Quimioterapia. Quim. Nova. 2008; 31(5): 1271-1278.
 - Gueirard P, Tavares J, Thiberge S, Bernex F, Ishino T, Milon G, Franke-Fayard B, Janse CJ, Ménard R, Amino R. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. Proc Natl Acad Sci USA. 2010; 107(43):18640-5.
 - Gysin J, Fandeur T. *Saimiri sciureus* (karyotype 14-7): an alternative experimental model of *Plasmodium falciparum* infection. Am J Trop Med Hyg. 1983 may; 32(3): 461-7.
 - Hafalla JC, Silvie O, Matuschewski K. Cell biology and immunology of malaria. Immunol. 2011; 240: 297-316.
 - Heraud JM, Lavergne A, Kazanji M. Molecular cloning, characterization, and quantification of squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) Th1 and Th2 cytokines. Immunogenetics. 2002 apr; 54(1):20-9.
 - Herrera S, Perlaza BL, Bonelo A, Arévalo-Herrera M. *Aotus* monkeys: their great value for anti-malaria vaccines and drug testing. Int J Parasitol. 2002 dec; 4;32(13):1625-35.
 - Honda M, Asai T, Oku N, Araki Y, Tanaka M, Ebihara N. Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on ocular targets. Int J Nanomedicine. 2013; 8: 495–504.
 - Iriemenam NC, Okafor CM, Balogun HA, Ayede I, Omosun Y, Persson JO, Hagstedt M, Anumudu CI, Nwuba RI, Troye-Blomberg M, Berzins K. Cytokine profiles and antibody responses to *Plasmodium falciparum* malaria infection in

- individuals living in Ibadan, southwest Nigeria. *Afr Health Sci.* 2009 jun; 9(2):66-74.
- Kakoma I, James MA, Whiteley HE, Montelegre F, Buese M, Fafjar-Whestone CJ, Clabaugh GW, Baek BK. Platelet kinetics and other hematological profiles in experimental *Plasmodium falciparum* infection: a comparative study between *Saimiri* and *Aotus* monkeys. *Kisaengchunghak Chapchi.* 1992 sep; 30(3):177-82.
 - Kawada H, Dida GO, Ohashi K, Komagata O, Kasai S, Tomita T, Sonye G, Maekawa Y, Mwatele C, Njenga SM, Mwandawiro C, Minakawa N, Takagi M. Multimodal pyrethroid resistance in malaria vectors, *Anopheles gambiae* s.s., *Anopheles arabiensis*, and *Anopheles funestus* s.s. in western Kenya. *PLoS One.* 2011; 6(8): e22574. Epub 2011 Aug 11.
 - Kim HM, Lee YW, Lee KJ, Kim HS, Cho SW, van Rooijen N, Guan Y, Seo SH. Alveolar macrophages are indispensable for controlling influenza viruses in lungs of pigs. *J Virol.* 2008 may; 82(9): 4265-74.
 - Kitchen AD, Chiodini PL. Malaria and blood transfusion. *Vox sanguinis.* 2006 jan; 90(2): 77-84.
 - Kitua AY, Smith TA, Alonso PL, Urassa H, Masanja H, Kimario J, Tanner M. The role of low level *Plasmodium falciparum* parasitaemia in anaemia among infants living in an area of intense and perennial transmission. *Trop Med Int Health.* 1997 apr;2(4):325-33.
 - Lee KS, Divis PCS, Zakaria SK, Matusop A, Julin RA, Conway DJ, Cox-Singh J, Singh B. *Plasmodium knowlesi*: Reservoir Hosts and Tracking the Emergence in Humans and Macaques. *PLoS Pathogens.* 2011 abr; 7(4): 1-11.
 - Lehenkari PP, Kellinsalmi M, Näpänkangas JP, Ylitalo, KV, Mönkkönen J, Rogers MJ, Azhayev A, Väänänen HK, Hassinen IE. Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. *Mol Pharmacol.* 2002 May; 61(5):1255-62.
 - Leisewitz AL, Rockett KA, Gumede B, Jones M, Urban B, Kwiatkowski DP. Response of the splenic dendritic cell population to malaria infection. *Infect Immun.* 2004 jul; 72(7): 4233-9.
 - Markus MB. The hypnozoite concept, with particular reference to malaria. *Parasitol Res.* 2011;108(1):247-52.
 - Markus MB. Origin of recurrent *Plasmodium vivax* malaria: a new theory. *S Afr Med J.* 2011 Oct;101(10):682-84.
 - Markus MB. Dormancy in mammalian malaria. *Trends Parasitol.* 2012 Feb;28(2):39-45. Epub 2011 Nov 25.
 - Mathes M, Jordan M, Dowa S. Evaluation of liposomal clodronate in experimental spontaneous autoimmune hemolytic anemia in dogs. *Experimental Hematology.* 2006; 34: 1393–1402.

- McColl DJ, Anders RF. Conservation of structural motifs and antigenic diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 (MSP-3). *Mol Biochem Parasitol*. 1997 Dec 1; 90(1):21-31.
- Ménard R, Tavares J, Cockburn I, Markus M, Zavala F, Amino R. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. *Nat Rev Microbiol*. 2013; 11, 701–712.
- Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. Situação Epidemiológica da Malária no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; 2008.
- Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica e Diretoria Técnica de Gestão. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.
- Ministério da Saúde (MS). Portal da Saúde. Malária. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. [Acessado em 30 de outubro de 2011]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1526.
- Ministério da Saúde (MS). Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) – Serviço de Vigilância em Saúde (SVS). Boletim do PNCM, SVS, 2014.
- Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2005. [Acessado em 07 de novembro de 2011]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/be_malaria_01_2005.pdf.
- Mohan K, Maithani MM. Congenital malaria due to chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*: a case report. *Journal of tropical pediatrics*. 2010 dec; 56(6): 454-455.
- Moreno A, Badell E, van Rooijen N, Druilhe P: Human malaria in immunocompromised mice: new *in vivo* model for chemotherapy studies. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001; 45(6):1847-1853.
- Murray CJ, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D, Fullman N, Naghavi M, Lozano R, Lopez AD. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet*. 2012 feb 4; 379(9814):413-31.
- Naito M, Nagai H, Kawano S, Umezu H, Zhu H, Moriyama H, Yamamoto T, Takatsuka H, Takei Y. Liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate induces macrophage apoptosis *in vivo* and *in vitro*. *J Leukoc Biol*. 1996 Sep; 60(3):337-44.
- Newton CR, Warn PA, Winstanley PA, Peshu N, Snow RW, Pasvol G, Marsh K. Severe anaemia in children living in a malaria endemic area of Kenya. *Trop Med Int Health*. 1997 feb; 2(2):165-78.
- Nikbakht N, Shen S, Manser T. Cutting edge: Macrophages are required for localization of antigen-activated B cells to the follicular perimeter and the

- subsequent germinal center response. *J Immunol.* 2013 May 15; 190(10): 4923-7. Epub 2013 Apr 8.
- Oeuvray C, Bouharoun-Tayoun H, Gras-Masse H, Bottius E, Kaidoh T, Aikawa M, Filgueira MC, Tartar A, Druilhe P. Merozoite surface protein-3: a malaria protein inducing antibodies that promote *Plasmodium falciparum* killing by cooperation with blood monocytes. *Blood.* 1994 sep; 84(5): 1594-602.
 - Oeuvray C, Theisen M, Rogier C, Trape JF, Jepsen S, Druilhe P. Cytophilic immunoglobulin responses to *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein are correlated with protection against clinical malaria in Dielmo, Senegal. *Infect Immun.* 2000 may; 68(5): 2617-20.
 - Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J.* 2010; 9: 115.
 - Pan American Health Organization (PAHO). Regional Malaria Program HDS/CD/Malaria. Malaria Surveillance Indicators. [Acessado em 15 de janeiro de 2014]. Disponível em: http://ais.paho.org/hip/viz/malaria_surv_indicators_popup.asp
 - Pradhan V, Ghosh K. Immunological disturbances associated with malarial infection. *J Parasit Dis.* 2013 Apr; 37(1):11-15. Epub 2012 Sep 27. Review.
 - Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. *Vivax* malaria: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77(6):79-87
 - Quintero JP, Siqueira AM, Tobón A, Blair S, Moreno A, Arévalo-Herrera M, Lacerda MVG, Valencia SH. Malaria-related anaemia: a Latin American perspective. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011; 106 (suppl. I): 91-104.
 - Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Farmacologia.* 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
 - Rey, L. *Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África.* 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
 - Riccio EK, Pratt-Riccio LR, Bianco Jr C, Totino PR, Sanchez V, Carvalho LJM, Daniel-Ribeiro CT. Molecular and immunological tools for cytokine studies in the neotropical *Saimiri sciureus* monkeys. *Malar J.* Submetido 2014.
 - Riley EM, Stewart VA. Immune mechanisms in malaria: new insights in vaccine development. *Nat Med.* 2013 feb; 19(2): 168-78.
 - Rowe JA, Claessens A, Corrigan RA, Arman M. Adhesion of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Rev in Molec Med.* 2009; 11: e16.
 - Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone.* 2011 Jul; 49(1):2-19. Epub 2011 May 1. Review.
 - Sabbatani S, Fiorino S, Manfredi R. The emerging of the fifth malaria parasite (*Plasmodium knowlesi*). A public health concern? *Braz J Infect Dis.* 2010; 14: 299-309.

- Schwartz L, Brown GV, Genton B, Moorthy VS. A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table. 2012; *Malaria Journal*. 11:11.
- Singh B, Kim SL, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*. 2004 mar; 363(9414): 1017-1024.
- Sirima SB, Cousens S, Druilhe P. Protection against malaria by MSP3 candidate vaccine. *N Engl J Med*. 2011 sep; 365(11): 1062-4.
- Snoeys J, Mertens G, Lievens J, van Berkel T, Collen D, Biessen EA, De Geest B. Lipid emulsions potentially increase transgene expression in hepatocytes after adenoviral transfer. *Mol Ther*. 2006 Jan; 13(1):98-107. Epub 2005 Aug 19.
- Soesatyo M, Biewenga J, van Rooijen N, Kors N, Sminia T. The *in situ* immune response of the rat after intraperitoneal depletion of macrophages by liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *Res. Immunol*. 1991; 142: 533-540.
- Stitt JT, Hardy JD. Thermoregulation in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *J Appl Physiol*. 1971 Jul;31(1):48-54. *J Appl Physiol*. 1971 Jul;31(1):48-54.
- Tao Z-y, Fang Q, Liu X, Culleton R, Tao L, et al. Congenital Malaria in China. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(3): e2622.
- Teixeira C, Gomes R. Experimental models in vaccine research: malaria and leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*. 2013 fev; 46(2): 109–116.
- Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 1976 aug 20; 193(4254):673-5.
- van Rooijen N, van Nieuwmegen R. Elimination of phagocytic cells in the spleen after intravenous injection of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. An enzyme-histochemical study. *Cell Tissue Res*. 1984; 238(2):355-8.
- van Rooijen N, Kors N. Effects of intracellular diphosphonates on cells of the mononuclear phagocyte system: *in vivo* effects of liposome-encapsulated diphosphonates on different macrophage subpopulations in the spleen. *Calcif Tissue Int*. 1989 sep; 45(3): 153-6.
- van Rooijen N, Kors N, vd Ende M, Dijkstra CD. Depletion and repopulation of macrophages in spleen and liver of rat after intravenous treatment with liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *Cell Tissue Res*. 1990 May; 260(2):215-22.
- van Rooijen N, Sanders A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods*. 1994 Sep 14; 174(1-2):83-93.

- van Rooijen N, Sanders A. Elimination, blocking, and activation of macrophages: three of a kind? J Leukoc Biol. 1997 dec; 62(6):702-9. Review.
- van Rooijen N, van Kesteren-Hendriks E. Clodronate liposomes: perspectives in research and therapeutics. J Liposome Res. 2002;12(1-2):81-94.
- van Rooijen N, van Kesteren-Hendriks E. "In vivo" depletion of macrophages by liposome-mediated "suicide". Methods Enzymol. 2003; 373:3-16.
- Van Rooijen N. ClodronateLiposomes.org; 2006. [Acessado em 05 de maio de 2013]. Disponível em <http://clodronateliposomes.org/>.
- Vitor-Silva S, Reyes-Lecca RC, Pinheiro TRA, Lacerda MVG. Malaria is associated with poor school performance in the short term in an endemic area from the Brazilian Amazon. Malaria Journal. 2009; 8:230.
- Vythilingam I, Tan CH, Asmad M, Chan ST, Lee KS, Singh B. Natural transmission of *Plasmodium knowlesi* to humans by *Anopheles latens* in Sarawak, Malaysia. Transact Royal Soc Trop Med and Hygiene. 2006; v.100(11):1087-8.
- Warrell DA, Gilles HM (editors). Essential Malariology, 4th edition. London: Arnold, 2002.
- Wilczewska AZ, Niemirowicz K, Markiewicz KH, Car H. Nanoparticles as drug delivery systems. Pharmacol Rep. 2012; 64(5):1020-37.
- White NJ. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. Clin Infect Dis. 2008; 46(2): 172-3.
- World Health Organization (WHO). MALVAC Meeting 2004: Evaluation of malaria vaccines. Pre-clinical Evaluation Group: Optimizing the developmental pathway from the lab to the clinic. Report from a technical consultation at WHO/IVR Malaria Vaccine Advisory Committee meeting Montreux, Switzerland, 11-14 October, 2004. [Acessado em 05 de novembro de 2011]. Disponível em: http://www.who.int/vaccine_research/documents/2004_MALVAC_PreclinicalEvalReport.pdf
- WHO. Malaria. Media centre. Fact sheet N° 94. October 2011. [Acessado em 05 de novembro de 2011]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>.
- WHO. World Malaria Report 2013. [Acessado em 15 de janeiro de 2014]. Disponível em: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/en/
- WHO. Questions and Answers on Malaria Vaccines. October 2013. [Acessado em 06 de novembro de 2011]. Disponível em: http://www.who.int/immunization/research/development/WHO_malaria_vaccine_q_and_a_Oct2013.pdf?ua=1

9 ANEXOS

Anexo 1



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo intitulado :

" Desenvolvimento e avaliação pré-clínica de vacinas anti-maláricas em primatas Saimiri sciureus. "

número P-391/07, proposto por Cláudio Tadeu Daniel Ribeiro, foi licenciado pelo Nº L-0062/08.

Sua licença de Nº L-0062/08 autoriza o uso anual de :

- 99 *Saimiri sciureus*

Esse protocolo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ). Na presente formatação, este projeto está licenciado e tem validade até 8 de setembro de 2012.

Rio de Janeiro, 25/09/2008

Dra. Norma Vollmer Labarthe
Coordenadora da CEUA
FIOCRUZ

Anexo 2



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
no Uso de Animais

TERMO ADITIVO AO CERTIFICADO DA LICENÇA Nº L-0062/08 (P-391/07)

A Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FIOCRUZ, em atenção à solicitação do Dr. Claudio Tadeu Daniel Ribeiro autoriza o presente aditivo, conforme solicitação do proponente via carta s/nº, de 31 de agosto de 2012.

1. Prorrogação do prazo de validade da licença por um ano, sem acréscimo de animais.

Este aditivo tem validade até 08 de setembro de 2013.

Rio de Janeiro, 03 de setembro de 2012.

Octávio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA/FIOCRUZ

Octávio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SUARE 05628550

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 – Prédio da Expansão – sala 200 – Manguinhos – Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

Anexo 3



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-9/14

Certificamos que o protocolo (P-47/13-2), intitulado "Desenvolvimento e avaliação pré-clínica de vacinas antimaláricas em primatas *Saimiri sciureus*", sob a responsabilidade de Claudio Tadeu Daniel Ribeiro, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 02/12/2017 e inclui o uso total de :

Saimiri sciureus

- 285 Machos,

- 95 Fêmeas.

Rio de Janeiro, 2 de dezembro de 2013

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04628550

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Mangueiras - Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fio cruz.br