

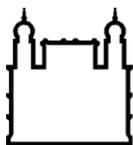
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Parasitária

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE CÉLULAS DO
SISTEMA IMUNE INATO NA MALÁRIA CEREBRAL EXPERIMENTAL

LUCAS FREIRE ANTUNES

Rio de Janeiro
Março de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

LUCAS FREIRE ANTUNES

Caracterização fenotípica e funcional de células do sistema imune inato na malária cerebral experimental

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

Orientador: Prof^ª. Dra. Flávia Lima Ribeiro Gomes

RIO DE JANEIRO

Março de 2020

Freire Antunes, Lucas.

Caracterização fenotípica e funcional de células do sistema imune inato na malária cerebral experimental / Lucas Freire Antunes. - Rio de Janeiro, 2020.

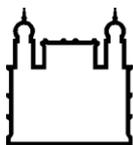
81 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2020.

Orientadora: Flávia Lima Ribeiro Gomes.

Bibliografia: f. 69-80

1. Imunidade Inata. 2. Malária Cerebral Experimental. 3. Plasmodium sp. 4. Polarização de Macrófagos. 5. Resposta Imune. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

LUCAS FREIRE ANTUNES

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE INATO NA MALÁRIA CEREBRAL EXPERIMENTAL

ORIENTADOR: Prof^ª. Dra. Flávia Lima Ribeiro Gomes

Aprovada em: 13 / 03 / 2020

EXAMINADORES:

Prof^ª. Dra. Dalma Maria Banic - Presidente (Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ)

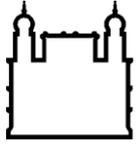
Prof^ª. Dra. Roberta Olmo Pinheiro (Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ)

Prof^ª. Dra. Ana Acácia Pinheiro Caruso Neves (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ)

Prof. Dr. Josué da Costa Lima Júnior (Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ)

Prof^ª. Dra. Alessandra D Almeida Filardy (Instituto de Microbiologia, UFRJ)

Rio de Janeiro, 13 de março de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

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

AGRADECIMENTOS

Aos meu pais por todo suporte que me deram para realizar meus sonhos. Agradeço também a minha família por estar junto comigo.

À Dr^a. Flávia Lima Ribeiro Gomes por ter me aceitado como seu aluno. Que sempre esteve disposta a dedicar seu tempo em ensinar não só assuntos referentes ao cotidiano de laboratório, mas também assuntos pertinentes a vida, que sempre levarei comigo.

Ao ImmunoTeam, Carina, Marcos e Uyla, por todo apoio que me deram para realização deste trabalho. Por mais que nossos experimentos fossem longos e cansativos vocês sempre estiverem presentes. Em especial a Uyla, por todas as discussões de trabalhos e resultados, pela ajuda para alinhar os gráficos e textos, pelos momentos de descontração que foram fundamentais para não surtar.

Ao Laboratório de Pesquisa em Malária, por ter fornecido a estrutura necessária para a execução deste projeto. Agradeço também ao Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, por disponibilizar alguns de seus equipamento e materiais quando precisei.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária pela organização, atendimento e apoio.

À equipe responsável pelo biotério do Pavilhão Leônidas Deane, pela manutenção e cuidado com os animais solicitados.

À Plataforma de Citometria de Fluxo – Análise Multiparamétrica

As agências de fomento, CAPES e CNPq, e o INOVA-FIOCRUZ pelo apoio financeiro.

“O prazer mais nobre é a alegria do entendimento”.
Leonardo Da Vinci

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE INATO NA MALÁRIA CEREBRAL EXPERIMENTAL

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Lucas Freire Antunes

A malária cerebral (MC) é responsável por muitas mortes ocasionadas pela infecção por *Plasmodium falciparum*. Devido à dificuldade em estudar os mecanismos imunes envolvidos no desenvolvimento de MC em humanos, o uso de modelos murinos de malária cerebral experimental (MCE) tem sido amplamente empregado. Este estudo tem como objetivo investigar o papel das células imunes inatas no desenvolvimento ou não de MCE utilizando os modelos experimentais de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com *Plasmodium berghei* ANKA. A sobrevida, parasitemia, peso, temperatura corporal e a quebra da barreira hematoencefálica confirmaram a resistência e suscetibilidade dos camundongos BALB/c e C57BL/6 parasitados ao desenvolvimento de MCE, respectivamente. Embora os camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados tenham apresentado diferentes cursos clínicos da doença, eles exibiram a mesma parasitemia. A esplenomegalia foi observada em ambas as linhagens de camundongos durante a infecção. Entre as subpopulações mieloides investigadas, encontramos o influxo de neutrófilos e monócitos inflamatórios em cinética e proporções diferentes entre as linhagens. Já os macrófagos da polpa vermelha (MPV) dos camundongos BALB/c mantiveram seus valores constante ao longo da infecção, entretanto, responderam ao processo infeccioso ampliando a expressão do receptor de manose CD206. Interessantemente, os animais C57BL/6 apresentaram redução no número total dos MPV e MPV CD206⁺ após a infecção. A redução nos valores de MPV CD206⁺ foi acompanhada pelo aumento no número e percentual de MPV iNOS⁺. Curiosamente, o número total de macrófagos da polpa branca (MPB) e MPB iNOS⁺ aumentou nos animais BALB/c e se manteve constante nos animais C57BL/6 infectados. Ao avaliarmos a expressão de CD206 nos MPB, observamos diminuição no percentual e número total dessas células em ambos os animais após infecção. Também realizamos a análise da expressão de CD206 e iNOS em microglias, macrófagos residentes do sistema nervoso central. Estas células, em ambas as linhagens, apresentaram a mesma cinética de aumento na expressão do receptor de manose CD206, e redução diferenciada na expressão de iNOS ao longo da infecção. Toda essa regulação dos marcadores fenotípicos nos macrófagos esplênicos de camundongos BALB/c ocorreu na presença de níveis séricos elevados de INF- γ e da citocina regulatória IL-10, no 4º dia após infecção, quando comparados aos camundongos C57BL/6. Nossos dados sugerem que, apesar de camundongos resistentes à MCE desenvolverem uma forte resposta imune ao parasito, o animal é favorecido pelo desencadeamento de um perfil anti-inflamatório de resposta, como a ativação de macrófagos do tipo M2 e produção de citocinas regulatórias. Enquanto que os animais suscetíveis ao desenvolvimento de MCE respondem a infecção montando uma resposta com perfil pró-inflamatório nos momentos iniciais da resposta imune, através do aumento no número de macrófagos com perfil M1 e pela produção de TNF e IL-6.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

PHENOTYPIC AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF INNATE IMMUNE RESPONSE CELLS IN EXPERIMENTAL CEREBRAL MALARIA

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITIC BIOLOGY

Lucas Freire Antunes

Cerebral malaria (CM) is responsible for many deaths caused by infection with *Plasmodium falciparum*. Due to the difficulty in studying the immune mechanisms involved in the development of CM in humans, the use of murine models of experimental cerebral malaria (ECM) has been widely used. This study aims to investigate the role of innate immune cells in the development or not of ECM using the experimental models of C57BL/6 and BALB/c mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA. Survival, parasitemia, weight, body temperature and the breakdown of the blood-brain barrier confirmed the resistance and susceptibility of the BALB/c and C57BL/6 parasitized mice to the development of ECM, respectively. Although the infected BALB/c and C57BL/6 mice had different clinical courses of the disease, they exhibited the same parasitemia. Splenomegaly was observed in both strains of mice during infection. Among the myeloid subpopulations investigated, we found the influx of neutrophils and inflammatory monocytes with different kinetics and proportions between strains. The red pulp macrophages (RPM) of the BALB/c mice kept their values constant throughout the infection, however, they responded to the infectious process by expanding the expression of the CD206 mannose receptor. Interestingly, the C57BL/6 animals showed a reduction in the total number of RPM and RPM CD206⁺ after infection. The decrease in RPM CD206⁺ values was accompanied by an increase in the number and percentage of RPM iNOS⁺. Interestingly, the total number of white pulp macrophages (WPM) and WPM iNOS⁺ increased in the BALB/c animals and remained constant in the infected C57BL/6 animals. When evaluating the expression of CD206 in WPM, we observed a decrease in the percentage and total number of these cells in both animals after infection. We also performed the analysis of CD206 and iNOS expression in microglia, resident macrophages of the central nervous system. These cells, in both strains, showed the same increase in the expression of the mannose receptor CD206, and differentiated reduction in the expression of iNOS throughout the infection. All this regulation of phenotypic markers in splenic macrophages of BALB/c mice occurred in the presence of high serum levels of INF- γ and the regulatory cytokine IL-10, on the 4th day after infection, when compared to C57BL/6 mice. Our data suggest that, although MCE-resistant mice develop a strong immune response to the parasite, the animal is favored by triggering an anti-inflammatory response profile, such as the activation of type M2 macrophages and production of regulatory cytokines. While animals susceptible to the development of ECM respond to infection by setting up a response with a pro-inflammatory profile in the initial moments of the immune response, by increasing the number of macrophages with an M1 profile and by producing TNF and IL-6.

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Epidemiologia da malária	16
1.2 Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> sp.	18
1.3 Malária cerebral	20
1.4 Resposta imune ao <i>Plasmodium</i> sp.	23
1.5 Macrófagos: origem e função	28
1.6 Neutrófilos: origem e função	33
2 JUSTIFICATIVA	35
3 HIPÓTESE	36
4 OBJETIVOS	36
4.1 Objetivo geral	36
4.2 Objetivos específicos	36
5 MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1 Animais e aspectos éticos	37
5.2 Parasito e infecção	37
5.3 Avaliação do curso da infecção: sobrevida, parasitemia, peso e temperatura corporal	38
5.4 Avaliação da permeabilidade da barreira hematoencefálica	38
5.5 Coleta e processamento dos tecidos/órgãos	39
5.5.1 Soro.....	39
5.5.2 Baço.....	39
5.5.3 Cérebro	40
5.6 Imunofenotipagem	40
5.6.1 Baço.....	40
5.6.2 Cérebro	42
5.7 Dosagem de citocinas séricas	42
5.8 Análise estatística	43

6	RESULTADOS	44
6.1	Camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA apresentam a mesma parasitemia e diferentes sinais clínicos da doença	44
6.2	Neutrófilos e monócitos inflamatórios apresentam cinética de recrutamento diferenciada para o baço de camundongos suscetíveis e resistentes à malária cerebral	46
6.3	A infecção por <i>Plasmodium berghei</i> ANKA promove alterações nas populações de macrófagos esplênicos em camundongos BALB/c e C57BL/6	48
6.4	A infecção de camundongos BALB/c por <i>Plasmodium berghei</i> ANKA promove aumento no percentual de macrófagos da polpa vermelha esplênica que expressam o receptor de manose CD206	49
6.5	A infecção de camundongos C57BL/6 por <i>Plasmodium berghei</i> ANKA promove aumento no percentual e número total de macrófagos da polpa vermelha que expressam iNOS.....	51
6.6	Redução no percentual e número total de macrófagos da polpa branca expressando o receptor de manose CD206 após infecção de camundongos BALB/c e C57BL/6 por <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	53
6.7	A infecção de camundongos BALB/c por <i>Plasmodium berghei</i> ANKA promove aumento no número total de macrófagos da polpa branca que expressam iNOS e IL-12	54
6.8	Microglias de camundongos BALB/c infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA reduzem rapidamente a expressão da enzima iNOS.....	56
6.9	Camundongos C57BL/6 infectados com <i>P. berghei</i> ANKA apresentam níveis séricos elevados de TNF- α e IL-6 no 4º dia após infecção	57
7	DISCUSSÃO	59
8	CONCLUSÃO	66
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
11	ANEXOS	81
11.1	Licença do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA)	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Países com casos autóctones de malária em 2000 e seus status epidemiológicos em 2018.....	16
Figura 2. Mapa de risco da malária no Brasil em 2018.	17
Figura 3. Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> sp.....	18
Figura 4. Composição da barreira hematoencefálica.....	22
Figura 5. Resposta imune iniciada na derme de hospedeiros infectados com <i>Plasmodium</i> sp.	24
Figura 6. Resposta imune desencadeada no baço durante a infecção pelo <i>Plasmodium</i> sp..	27
Figura 7. Classificação e polarização de macrófagos.	30
Figura 8. Desenho experimental.....	38
Figura 9. Avaliação do curso da infecção e progressão da doença.	45
Figura 10. Cinética do recrutamento de células mieloides para o baço de animais BALB/c e C57BL/6 infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	47
Figura 11. Estratégia de gates utilizada para análise dos macrófagos da polpa vermelha e polpa branca.....	48
Figura 12. Análise dos macrófagos presentes no baço de animais BALB/c e C57BL/6 ao longo da infecção por <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	49
Figura 13. Análise da expressão de CD206 e arginase nos macrófagos da polpa vermelha do baço de animais BALB/c e C57BL/6 ao longo da infecção com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	50
Figura 14. Análise da expressão de iNOS e IL-12 nos macrófagos da polpa vermelha em animais BALB/c e C57BL/6 ao longo da infecção com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	52
Figura 15. Análise da expressão de CD206 em macrófagos da polpa branca de animais BALB/c e C57BL/6 ao longo da infecção com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	53
Figura 16. Análise da expressão de iNOS e IL-12 em macrófagos da polpa branca de animais BALB/c e C57BL/6 ao longo da infecção com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	55
Figura 17. Análise da expressão de CD206 e iNOS em microglias de animais BALB/c e C57BL/6 ao longo da infecção com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	57
Figura 18. Análise do perfil de citocinas presentes no soro de animais infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	58
Figura 19.. Perfil de polarização de macrófagos esplênicos de animais infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de anticorpos utilizados para marcação de esplenócitos.....	41
Tabela 2. Lista de anticorpos utilizados para marcação de microglia	42

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BD	Becton Dickinson
BHE	Barreira hematoencefálica
CBA	do inglês <i>Cytokines Beads Array</i>
CCL	do inglês <i>Chemokine (C-C motif) Ligand</i>
CD	do inglês <i>Cluster of Differentiation</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CSP	do inglês <i>Circumsporozoite Protein</i>
DAMPs	do inglês <i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>
g	Gramma
g	Gravidade
GFP	do inglês <i>Green Fluorescent Protein</i>
ICAM-1	do inglês <i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
IFN	do inglês <i>Interferon</i>
IL	do inglês <i>Interleukin</i>
iNOS	do inglês <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
i.p.	Intraperitoneal
Kg	Quilograma
LPS	Lipopolissacarídeos
M1	Macrófagos classicamente ativados
M2	Macrófagos alternativamente ativados
MC	Malária cerebral
MCE	Malária cerebral experimental
mg	Miligrama
MHC	do inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i>
ml	Mililitro
NETs	do inglês <i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
NK	do inglês <i>Natural Killer</i>
NKT	do inglês <i>Natural Killer T</i>
nm	Nanômetro
NO	do inglês <i>Nitric Oxid</i>
PAMPs	do inglês <i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
PbA	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA

PfEMP1	do inglês <i>Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1</i>
pRBCs	do inglês <i>Parasitized Red Blood Cells</i>
PRRs	do inglês <i>Pathogen-Recognition Receptors</i>
ROS	do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema nervoso central
TAMs	do inglês <i>Tumor-Associated Macrophages</i>
TGF	do inglês <i>Transforming Growth Factor</i>
TLR	do inglês <i>Toll-like Receptor</i>
TNF	do inglês <i>Tumor Necrosis Factor</i>
μl	Microlitro
μm	Micrometro
VCAM-1	do inglês <i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
VEGF	do inglês <i>Vascular Endotelial Growth Factor</i>
WHO	do inglês <i>World Health Organization</i>
ZO-1	do inglês <i>Zonula Occludens-1</i>

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia da malária

A malária é uma doença parasitária causada por protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, ordem Haemosporida, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium* (ANTINORI et al., 2012). Dentro deste gênero existem aproximadamente 120 espécies capazes de infectar mamíferos, aves e répteis. As espécies de *Plasmodium* (*P.*) capazes de infectar o homem são: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi*, *P. cynomolgi* e *P. simium* (BRASIL et al., 2017; ASHLEY et al., 2018; IMWONG et al., 2019).

Segundo o *Malaria Report* (WHO, 2019) foram registrados cerca de 228 milhões de casos e 405 mil mortes em 91 países no ano de 2018. A doença ocorre, principalmente, em países tropicais e subtropicais (Figura 1). O continente africano concentra o maior número de casos registrados (93% dos casos mundiais), seguido pela Ásia e Américas. A distribuição dos casos de malária depende de fatores ambientes que permitam a circulação do vetor, como clima, altitude e vegetação, e de fatores sociais, como implementação de medidas de controle da doença, pobreza e guerra (CAMINADE et al., 2014). O *P. falciparum* é o mais prevalente na África, responsável por 99.7% dos casos e associado às formas graves da malária, que acometem principalmente crianças menores de 5 anos e gestantes (WHO, 2019).

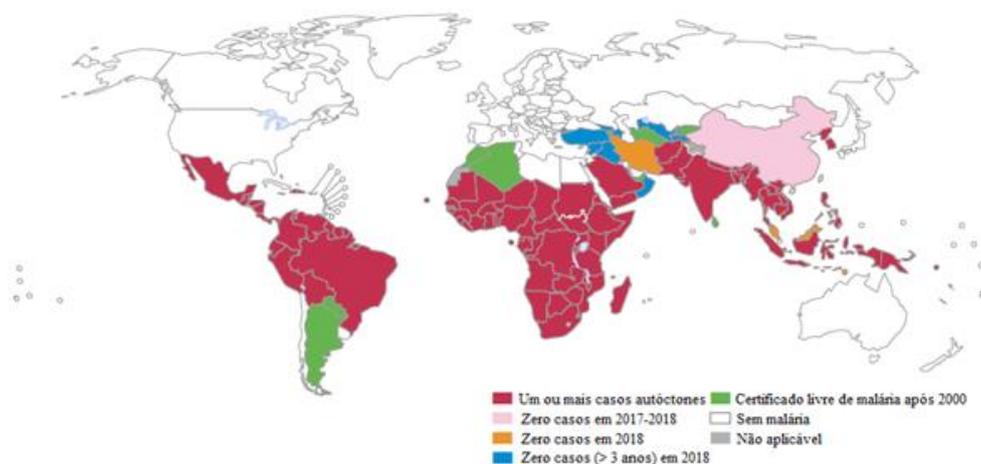


Figura 1. Países com casos autóctones de malária em 2000 e seus status epidemiológicos em 2018. Mapa representativo das áreas endêmicas para malária. Na legenda em vermelho, áreas com um ou mais casos autóctones notificados em 2018; em amarelo, áreas com zero casos em 2018; em azul, áreas com zero casos há mais de 3 anos em 2018; em verde; áreas certificadas sem malária desde 2000; em branco, áreas sem malária e em cinza, áreas sem dados fornecidos. Fonte: Adaptado WHO, 2019.

No Brasil, em 2018, foram registrados 217 mil casos, sendo o *P. vivax* responsável por 90% desses casos. A área mais afetada é a região da Amazônia Legal Brasileira (Figura 2) onde ocorrem cerca de 99% dos casos relatados no território brasileiro (SAMPAIO et al., 2015; WHO, 2019). Os casos extra-amazônicos podem ser classificados como autóctones (se a infecção ocorre por transmissão local) ou importados (adquiridos fora do país ou da região onde a pessoa vive) (WHO, 2018). Esses casos ocorrem em menor proporção, mas apresentam alta letalidade devido ao atraso no diagnóstico.

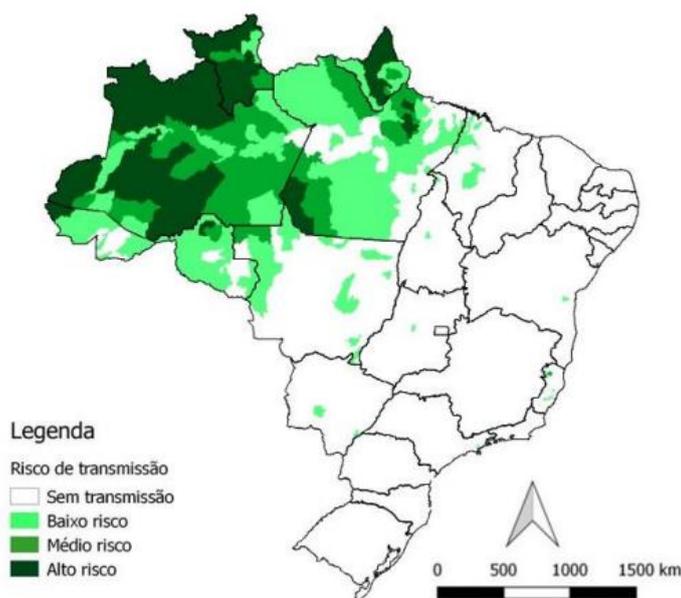


Figura 2. Mapa de risco da malária no Brasil em 2018. Mapa representativo de áreas no Brasil com risco de transmissão da malária. Na legenda em branco, áreas sem transmissão; em verde mais claro, áreas com baixo risco de transmissão, em verde intermediário, áreas com médio risco de transmissão e, em verde escuro, áreas com alto risco de transmissão. Fonte: Sivep-Malária e Sinan (2018).

Mesmo com medidas de controle da doença, o número de casos tem aumentado nos últimos anos, principalmente pela ocupação e desmatamento da floresta amazônica, pelo garimpo ilegal na região e resistência do parasito aos fármacos utilizados (FERREIRA & CASTRO, 2016). Além disso, fenômenos climáticos e políticas públicas de saúde também são fatores capazes de alterar o número de casos registrados (CARLOS et al., 2019)

1.2 Ciclo biológico do *Plasmodium* sp.

O ciclo biológico do *Plasmodium* sp. apresenta uma fase sexuada (esporogônica) no hospedeiro invertebrado e duas fases no hospedeiro vertebrado, a fase exoeritrocítica e eritrocítica.

A infecção do hospedeiro vertebrado inicia-se durante o repasto sanguíneo de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles* parasitados com *Plasmodium* sp., quando formas esporozoítos do parasito são inoculadas na derme do hospedeiro (Figura 3). Apesar de apresentarem alta motilidade, apenas 50% dos esporozoítos inoculados conseguem invadir os vasos sanguíneos e linfáticos (AMINO et al., 2006). Nos vasos linfáticos, os parasitos são drenados até o linfonodo mais próximo e removidos por células fagocíticas (VANDERBERG & FREVERT, 2004; AMINO et al., 2006). Os esporozoítos que alcançam a corrente sanguínea são carregados pelo sangue até o fígado, atravessam a barreira sinusoidal ativamente e ganham acesso aos hepatócitos.

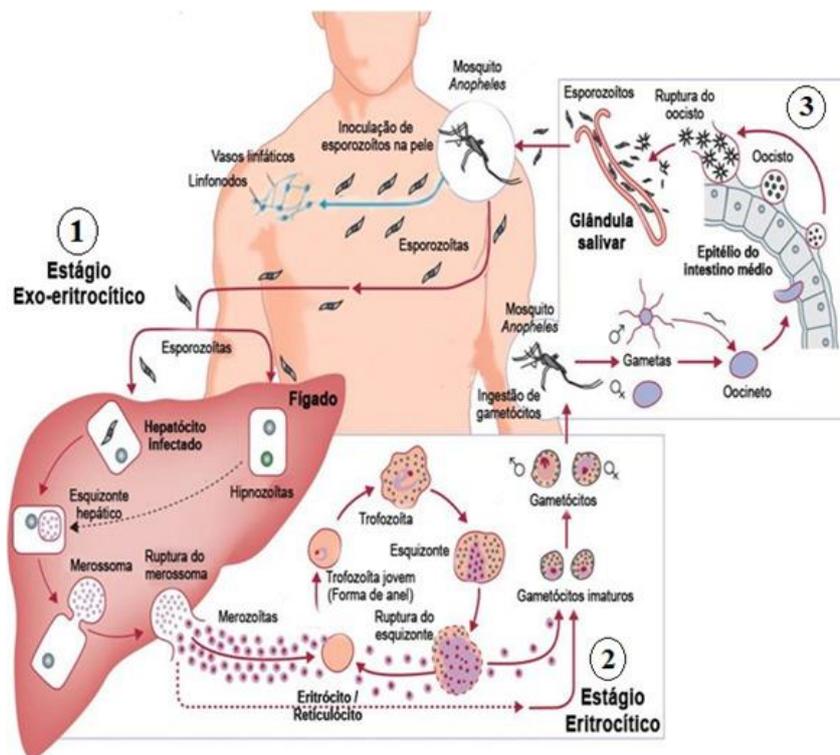


Figura 3. Ciclo biológico do *Plasmodium* sp. 1. Estágio exoeritrocítico: momento inicial da infecção, da inoculação de esporozoítos na derme do hospedeiro vertebrado até a infecção dos hepatócitos, esquizogonia e liberação dos merozoítos; fase assintomática da doença. 2. Estágio eritrocítico: estágio no qual os eritrócitos são infectados repetidamente e quando também são formados os gametócitos, formas sexuadas do parasito; fase sintomática da doença. Durante o repasto sanguíneo o mosquito ingere as formas sexuadas do parasito presentes na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. 3. Fase sexuada do ciclo: após a formação dos gametas, oocistos e diversos ciclos de diferenciação, os parasitos chegam à glândula salivar do mosquito na forma de esporozoítos. Fonte: adaptado de GARCIA-BASTEIRO et al., 2012.

O esporozoítio tem a capacidade de transmigrar por vários hepatócitos antes de se instalar em uma célula e iniciar a formação do vacúolo parasitóforo (FREVERT et al., 2006; MOTA et al., 2001). Após a formação do vacúolo parasitóforo, o parasito começa a se diferenciar, perdendo o aparelho apical e ganhando uma forma arredondada e passando de uma forma invasiva para uma forma altamente replicativa, o trofozoítio exoeritrocítio. Após várias divisões (esquizogonia exoeritrocítio), forma-se o esquizonte hepático com centenas de merozoítos. Os merozoítos são liberados na corrente sanguínea em vesículas derivadas da membrana plasmática dos hepatócitos, denominadas merossomos (PRUDÊNCIO et al., 2006; LINDNER et al., 2012).

Nas infecções pelo *P. vivax* e *P. ovale*, um pequeno percentual dos esporozoítos diferenciam-se em formas latentes chamadas hipnozoítos, que podem permanecer assim por semanas a meses, causando infecções tardias mesmo após tratamento convencional (ADAMS & MUELLER, 2017; ASHLEY et al., 2018).

Na corrente sanguínea, os merossomos liberam merozoítos capazes de infectar os eritrócitos, dando início ao ciclo eritrocítio da doença (STURM et al., 2006). Dentro dos eritrócitos, os merozoítos se transformam em trofozoítos jovens, que amadurecem e dão origem a esquizontes repletos de novos merozoítos que, após o rompimento da célula, são liberados e infectam outros eritrócitos. O ciclo eritrocítio, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infecção, se repete a cada 48 horas nas infecções causadas pelo *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* e a cada 72 horas nas infecções por *P. malariae* (COWMAN et al., 2016).

Além dos merozoítos, os trofozoítos também podem se diferenciar em gametócitos masculinos ou femininos. Estímulo do microambiente, como altos níveis de parasitemia e uso de drogas antimaláricas, são capazes de aumentar a produção de gametócitos (COWMAN et al., 2016). Os gametócitos imaturos que são liberados na corrente sanguínea ficam retidos na medula óssea durante, aproximadamente, 8 dias para seu completo desenvolvimento, assim, evitam serem fagocitados no baço. Após esse tempo voltam para corrente sanguínea, onde estarão disponíveis para serem ingeridos pelo mosquito durante o repasto sanguíneo (JOICE et al., 2014).

Quando ingeridos pelo mosquito *Anopheles* sp. inicia-se o ciclo sexuado (esporogônico) no vetor. No mosquito, os gametócitos se diferenciam nos gametas que irão se fundir e dar origem ao oocinetio. O oocinetio, por apresentar alta motilidade, é capaz de atravessar barreiras físicas do mosquito até chegar ao seu intestino médio, iniciando o processo de diferenciação em oocisto (ANGRISANO et al., 2012). Esta fase

pode durar de 10 a 14 dias, dependendo do *Plasmodium* sp. e das condições ambientais, como por exemplo, temperatura (ABRANTES & SILVEIRA, 2009). Após diferenciação e intensa multiplicação, milhares de esporozoítos migram para a glândula salivar do inseto, prontos para serem inoculados na derme do hospedeiro vertebrado novamente (ANGRISANO et al., 2012).

1.3 Malária cerebral

A malária cerebral (MC) é a mais bem estudada complicação da doença causada pelo *P. falciparum*. O principal grupo de risco são crianças menores de cinco anos, grávidas, adultos com idade acima de 50 anos e pessoas primo infectadas (GHAZANFARI et al., 2018; WHO, 2018). Aproximadamente 575 mil crianças em áreas endêmicas da África desenvolvem MC anualmente (IDRO et al., 2010).

Os casos de MC são descritos como encefalopatia difusa e caracterizada clinicamente por convulsões, inconsciência, retinopatia e coma, podendo levar ao óbito (GHAZANFARI et al., 2018; SAHU et al., 2015). A MC também pode ser acompanhada por falência múltipla dos órgãos, como falência renal e pulmonar. Por apresentar sintomas semelhantes a outras encefalopatias, o diagnóstico da MC muitas vezes não é feito em momento oportuno, atrasando o início do tratamento (DE SOUZA, J.B. et al., 2010). Diagnósticos específicos devem ser empregados para aumentar a taxa de sobrevivência dos pacientes. O exame de retina tem se mostrado preciso no diagnóstico de MC, visto que a retinopatia está associada aos piores prognósticos (POSTELS & BIRBECK, 2013; SINGH, J. et al., 2016; VILLAVARDE et al., 2017).

Mesmo com o tratamento, a MC apresenta letalidade de 15% a 20% e os pacientes que sobrevivem podem apresentar déficit cognitivo (JOHN et al., 2008; IDRO et al., 2010; DE SOUSA et al., 2018).

O perfil das alterações patológicas entre os pacientes com MC não é uniforme. Frequentemente limitado a observações *post mortem*, esses pacientes apresentaram, principalmente, eritrócitos parasitados aderidos ao endotélio cerebral em vênulas de menor calibre (TAYLOR et al., 2004). Também foi observado a congestão em vênulas maiores devido a presença de eritrócitos não parasitados aderidos aos eritrócitos parasitados (PONGPONRATN et al., 2003). Os sintomas neurológicos surgem durante o

estágio eritrocítico da infecção, quando o parasito invade e se multiplica nos eritrócitos (PAIS & PENHA-GONÇALVES, 2019).

Eritrócitos infectados pelo *P. falciparum* sofrem modificações estruturais e funcionais em sua membrana, devido a expressão de proteínas parasitárias, principalmente a Proteína 1 da Membrana do Eritrócito Infectado por *Plasmodium falciparum* (PfEMP1). Essas alterações na membrana dos eritrócitos são conhecidas como knobs (COWMAN et al., 2016). Diferentes isoformas da PfEMP1 podem ser expressas pelos eritrócitos parasitados ao longo da infecção, favorecendo a evasão do sistema imune pelo parasito e, conseqüentemente, novas ondas de parasitemia (PASTERNAK & DZIKOWSKI, 2009). Outra forma de evadir do sistema imune é através do fenômeno de citoaderência, onde os eritrócitos infectados aderem-se ao endotélio de órgãos vitais, como cérebro e pulmão, e impedem sua remoção da circulação sanguínea no baço. A aderência ocorre pela interação da PfEMP1 com receptores do próprio hospedeiro como CD36, E-selectina, Moléculas de Adesão Intercelular-1 (ICAM-1) e Moléculas de Adesão Vascular-1 (VCAM-1) (HIGGINS et al., 2011; COBAN et al., 2018). Além da ligação ao endotélio, eritrócitos infectados também se ligam a eritrócitos não infectados, formando as chamadas rosetas, reduzindo o acúmulo do parasito ao baço e sua destruição neste órgão. As interações entre os eritrócitos parasitados ou não, com o endotélio cerebral, como mencionado anteriormente, causará o acúmulo dessas células em vasos e capilares, impedindo a circulação de sangue na região, que acarreta em hipóxia e morte tecidual (CLARK & COWDEN, 2003; EMILE et al., 2012).

Leucócitos e plaquetas também estão envolvidos no sequestro celular e agravam o quadro de obstrução dos capilares diminuindo a circulação local, além de exacerbar o processo inflamatório local que irá fazer com que o endotélio expresse ainda mais moléculas que facilitam a adesão de novas células e a quebra da barreira hematoencefálica (BHE) (GHAZANFARI et al., 2018).

A BHE é uma barreira anatômica seletiva que mantém a homeostase cerebral, permitindo o transporte de nutrientes do sangue para o sistema nervoso central (SNC) (STANIMIROVIC & FRIEDMAN, 2012; DANEMAN & PRAT, 2015). A BHE é formada por células endoteliais do cérebro, pelos pericitos, por prolongamentos terminais dos astrócitos perivasculares e por junções estreitas, que vedam os espaços intercelulares impedindo o fluxo de compostos prejudiciais (Figura 4). Essas junções são formadas por proteínas transmembranares como as ocludinas, que se conectam à proteínas adaptadoras

no citoplasma, como a ZO-1 (do inglês, zonula occludens 1) (PAIS & PENHA-GONÇALVES, 2019). Em um estudo *post mortem*, foi observada uma diminuição de proteínas de junção endotelial (ZO-1 e ocludina) no cérebro de pacientes com malária, quando comparado a pacientes sem malária (BROWN, H. et al., 1999). Ademais, a liberação de fatores parasitários e inflamatórios no espaço perivascular, ativa outras células cerebrais, como pericitos, astrócitos e microglia, comprometendo a estrutura da barreira e ocasionando o vazamento do conteúdo vascular para o parênquima cerebral, formando edema cerebral (PAIS & PENHA-GONÇALVES, 2019). Edema e o aumento da pressão intracraniana foram relatadas em crianças africanas com MC e associadas com um pior prognóstico (WALKER et al., 1992; SEYDEL et al., 2015).

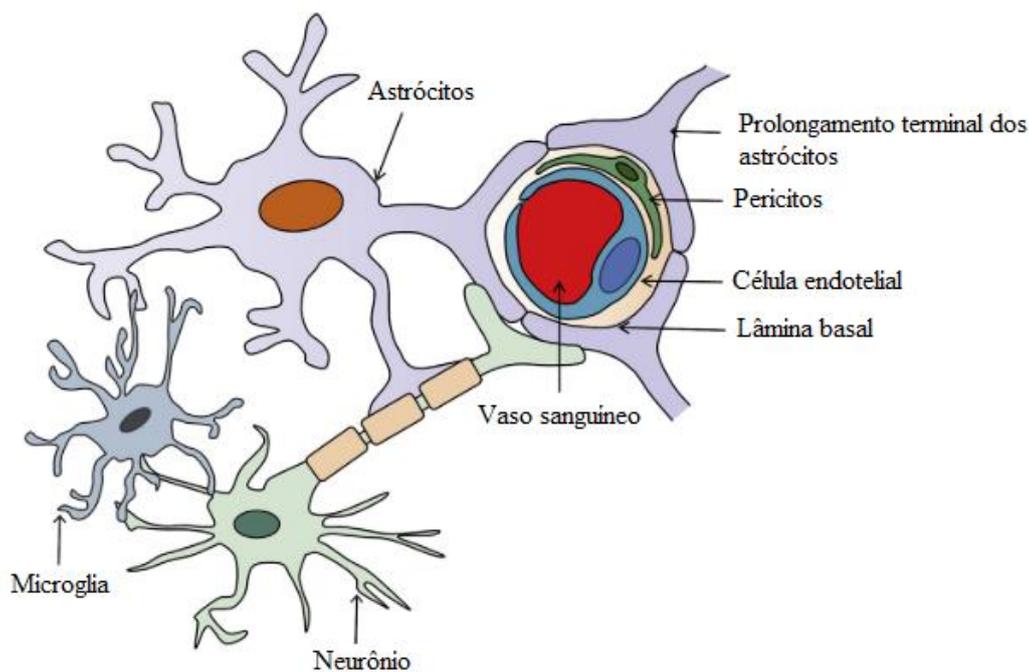


Figura 4. Composição da barreira hematoencefálica. A barreira hematoencefálica é formada por monocamada de células endoteliais unidas por proteínas de junção. A integridade da barreira hematoencefálica é mantida pelos pericitos e astrócitos. Fonte: Adaptado de NISHANTH & SCHLÜTER, 2019.

Devido às dificuldades em estudar a MC em humanos, o uso de modelos murinos para estudar a patogênese da MC veem sendo empregados há décadas. Apesar das já descritas limitações do uso de modelos murinos em reproduzir a doença observada em humanos, eles contribuem significativamente para que se possa compreender a biologia do parasito, a interação do parasito com o hospedeiro, a resposta imunológica desencadeada e a patogênese da doença (ENGWERDA et al., 2005; WHITE et al., 2009; FREVERT & NACER, 2014).

Há uma ampla gama de linhagens de camundongos que permitem compreender os mecanismos envolvidos na resistência ou suscetibilidade ao desenvolvimento da malária

cerebral experimental (MCE). Um modelo bem estabelecido para elucidar os mecanismos imunopatológicos envolvidos na MCE, é o camundongo da linhagem C57BL/6 infectado com eritrócitos parasitados por *Plasmodium berghei* ANKA (ZUZARTE-LUIS et al., 2014). Esses animais desenvolvem sinais de acometimento neurológico, típicos da MC humana, como ataxia e coma, indo a óbito 6 a 10 dias após infecção (DE SOUZA & RILEY, 2002). A patogênese nesses animais envolve o sequestro e acúmulo de plaquetas e leucócitos nas vênulas e capilares do cérebro. Apesar de já ter sido descrito o sequestro de eritrócitos parasitados (pRBCs), esse fenômeno é bem menos pronunciado no modelo murino (DE SOUZA & RILEY, 2002; WHITE et al., 2009). Além disso, outra diferença observada entre a doença humana e murina, é que os camundongos não desenvolvem febre elevada, mas sim uma hipotermia progressiva conforme avança o quadro de MCE (AMANI, R. et al., 1998).

Por outro lado, camundongo BALB/c infectados com *P. berghei* ANKA são mais resistentes a MCE. Este modelo experimental desenvolve hiperparasitemia e é amplamente utilizado para estudar a anemia severa, resultando no óbito dos animais 3 semanas após a infecção (KOSSODO & GRAU, 1993).

Apesar dos diversos estudos sobre o tema, os mecanismos relacionados à patogênese da MC ainda não estão completamente esclarecidos. Acredita-se que tanto a ação do parasito, *per se*, quanto a resposta imunológica exacerbada desenvolvida pelo hospedeiro contra o parasito, são responsáveis pela imunopatogênese da doença (BAUER et al., 2002; BERNABEU & SMITH, 2018; GRAMAGLIA et al., 2006).

1.4 Resposta imune ao *Plasmodium* sp.

Estudos utilizando modelos experimentais indicam que os neutrófilos são as primeiras células recrutadas para o local do repasto sanguíneo (2-4 horas após infecção), enquanto os monócitos são recrutados mais tardiamente (4-24 horas após infecção) e, mesmo com diferente cinética de recrutamento para o sítio de infecção, são capazes de fagocitar os parasitos presentes na derme. Alguns parasitos fagocitados conseguem sobreviver por até 24 horas no interior dessas células ou simplesmente transmigrar por elas (DEMEURE et al., 2005; MAC-DANIEL et al., 2014).

A alta motilidade que os esporozoítos apresentam na derme funciona como forma de escape, uma vez que o parasito é capaz de atravessar células do hospedeiro, tornando difícil sua captura e fagocitose. A alta motilidade também é essencial para a invasão dos vasos sanguíneos e linfáticos (AMINO et al., 2006) (Figura 5). Os esporozoítos, drenados pelos vasos linfáticos, são carreados ao linfonodo drenante mais próximo, capturados, degradados por células dendríticas (DCs) e os seus peptídeos apresentados via Moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) classe II e I para o linfócito T CD4 e CD8, respectivamente. Esse primeiro contato entre as DCs e os linfócitos T é fundamental para resposta imune em estágios futuros da doença (CHAKRAVARTY et al., 2007; CORRADIN & LEVITSKAYA, 2014; RADTKE et al., 2015).

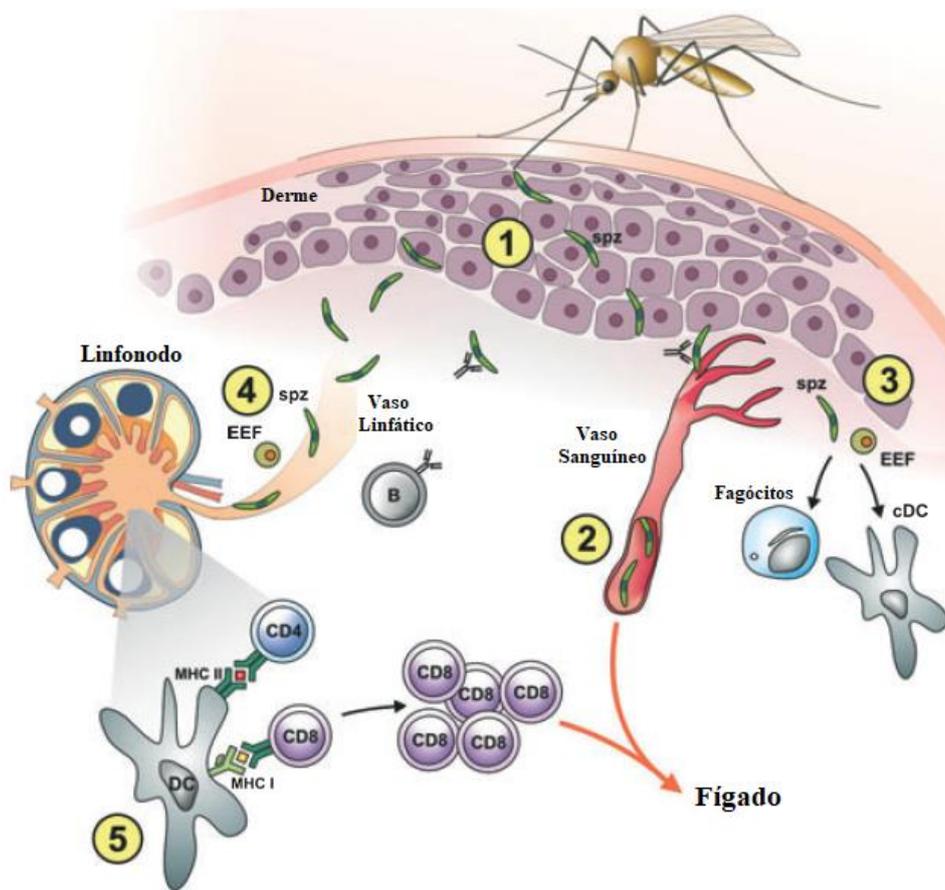


Figura 5. Resposta imune iniciada na derme de hospedeiros infectados com *Plasmodium* sp. Esporozoítos inoculados na derme (1) podem alcançar a corrente sanguínea e, rapidamente, chegar ao fígado (2). Além disso, alguns desses esporozoítos podem ser eliminados ainda na derme por células fagocíticas (3), ou carreados até os linfonodos drenantes por vasos linfáticos, onde fornecem antígenos para ativação da resposta de células T (5). Fonte: Adaptado de HAFALLA et al., 2011.

Os parasitos que ganham a corrente sanguínea chegam até o fígado. Para conseguir se alojar e se multiplicar nos hepatócitos, os esporozoítos atravessam a barreira sinusoidal (FREVERT et al., 2006). Estudo *in vitro* mostraram que esporozoítos são capazes de atravessar a barreira sinusoidal através das células de Kupffer (macrófagos residentes do fígado) ou pelas células endoteliais para chegar no seu destino final, que são os hepatócitos (TAVARES et al., 2013). Para invadir e atravessar a barreira sinusoidal, o esporozoíto conta com diversas proteínas, como a Proteína de Micronema de Esporozoíto Essencial para a Travessia Celular (SPECT2), que tem um importante papel na entrada do parasito, já que possui um domínio do tipo perforina de ataque a membrana, permitindo a perfuração da membrana e facilitando a travessia até o parênquima hepático (ISHINO et al., 2005). Além disso, a passagem do esporozoíto pelos macrófagos presentes no fígado leva a inativação dessas células impedindo que o parasito seja fagocitado (SINNIS & ZAVALA, 2012).

No parênquima hepático, o esporozoíto atravessa vários hepatócitos, processo conhecido como transmigração, deixando rastro de antígenos. A Proteína Circunsporozoíta (CSP) é um desses antígenos. A liberação de CSP leva a supressão da sinalização via Fator Nuclear kappa B (NF- κ B), essencial para síntese de proteínas inflamatórias. A supressão da via NF- κ B (junto com a supressão de outras vias inflamatórias) cria um nicho apropriado para o crescimento do parasito (DING et al., 2012; SINGH, A. P. et al., 2007). Estudos *in vitro*, utilizando modelos experimentais, demonstraram que o parasito é capaz de modular o perfil de citocinas expressas pelos hepatócitos, diminuindo o perfil pró-inflamatório (TNF- α e IL-6) e aumentando o perfil anti-inflamatório (IL-10), com o intuito de favorecer a sua passagem pelas células (KLOTZ & FREVERT, 2008).

Em contra partida, estudos em modelos experimentais infectados com *P. berghei* e *P. yoelii* mostraram que o parasito pode ser reconhecido por Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRRs) citosólicos do hepatócito levando ao aumento de IFN do tipo I, que inibe o crescimento do parasito (LIEHL et al., 2014; MILLER et al., 2014). Ademais, esse aumento na produção de IFN pelos hepatócitos induz a produção de quimiocinas e o recrutamento de leucócitos para o fígado. Análises histopatológicas identificaram infiltrado de eosinófilos, neutrófilos, células *Natural Killer* (NK) e *Natural Killer T* (NKT) no fígado durante a infecção (KHAN & VANDERBERG, 1992; ROLAND et al., 2006; MILLER et al., 2014).

A transmigração do esporozoítio pelos hepatócitos também induz a secreção do fator de crescimento de hepatócitos, tornando o hepatócito mais suscetível a infecção (CARROLO et al., 2003). Em um certo momento, ao invadir o último hepatócito o esporozoítio é encapsulado no vacúolo parasitóforo, dentro do qual se diferencia e multiplica dando origem a diversos merozoítos.

A liberação dos merozoítos ocorre dentro de vesículas derivadas da membrana do hepatócito, os merossomos. Esses não expressam fosfatidilserina em sua membrana, evitando sua fagocitose e destruição pelas células de Kupffer e garantindo a liberação dos merozoítos diretamente na corrente sanguínea (STURM et al., 2006).

Na corrente sanguínea, os merozoítos invadem os eritrócitos. Por não apresentarem moléculas de MHC em sua membrana, os eritrócitos permitem o desenvolvimento intracelular do parasito sem que o mesmo seja reconhecido pelo sistema imune (YAMAUCHI et al., 2007). Repetidos ciclos de invasão e ruptura dos eritrócitos levam a liberação de novos merozoítos, Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) e Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs) na corrente sanguínea, ativando a resposta imune do hospedeiro e dando início a fase sintomática da doença (JARAMILLO et al., 2004; RILEY & STEWART, 2013).

Um dos principais PAMPs liberados é a hemozoína, conhecida como pigmento malárico. A hemozoína é o produto da digestão da hemoglobina pelo parasito no interior das hemácias. Por muito tempo acreditou-se que a hemozoína fosse apenas um produto produzido e excretado pelo parasito, sem função biológica, contudo, muito estudos já mostraram o papel da hemozoína na modulação resposta imune (JARAMILLO et al., 2004; IHEKWEREME et al., 2014). Já foi demonstrado que a ingestão da hemozoína por monócitos, compromete sua diferenciação em células dendríticas (SKOROKHOD et al., 2004) e, conseqüentemente, o desenvolvimento da resposta adaptativa. Por outro lado, estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que a hemozoína induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6 e TNF- α por macrófagos e monócitos (PRATO et al., 2008; OLIVIER et al., 2014). A liberação de TNF- α e IFN- γ desencadeia um ciclo vicioso de ativação dos macrófagos, aumento da liberação de óxido nítrico e aumento da expressão de moléculas de ICAM-1 em células endoteliais e em outros leucócitos (BELNOUE, E et al., 2008; BRUNEEL, 2019).

O baço é um importante órgão do sistema imune e o maior filtro de sangue do corpo humano tendo como uma de suas funções principais a remoção de eritrócitos velhos e deformados, além de ser essencial no combate de diversas infecções, uma vez que abriga diferentes tipos celulares envolvidos na resposta imune inata e adaptativa (Figura 6). A organização das células de forma compartimentalizada no baço e em outros órgãos linfoides, é fundamental para a execução de suas funções imunológicas de maneira eficaz (MEBIUS & KRAAL, 2005; HANDAYANI et al., 2009; ORTEGA-PAJARES & ROGERSON, 2018).

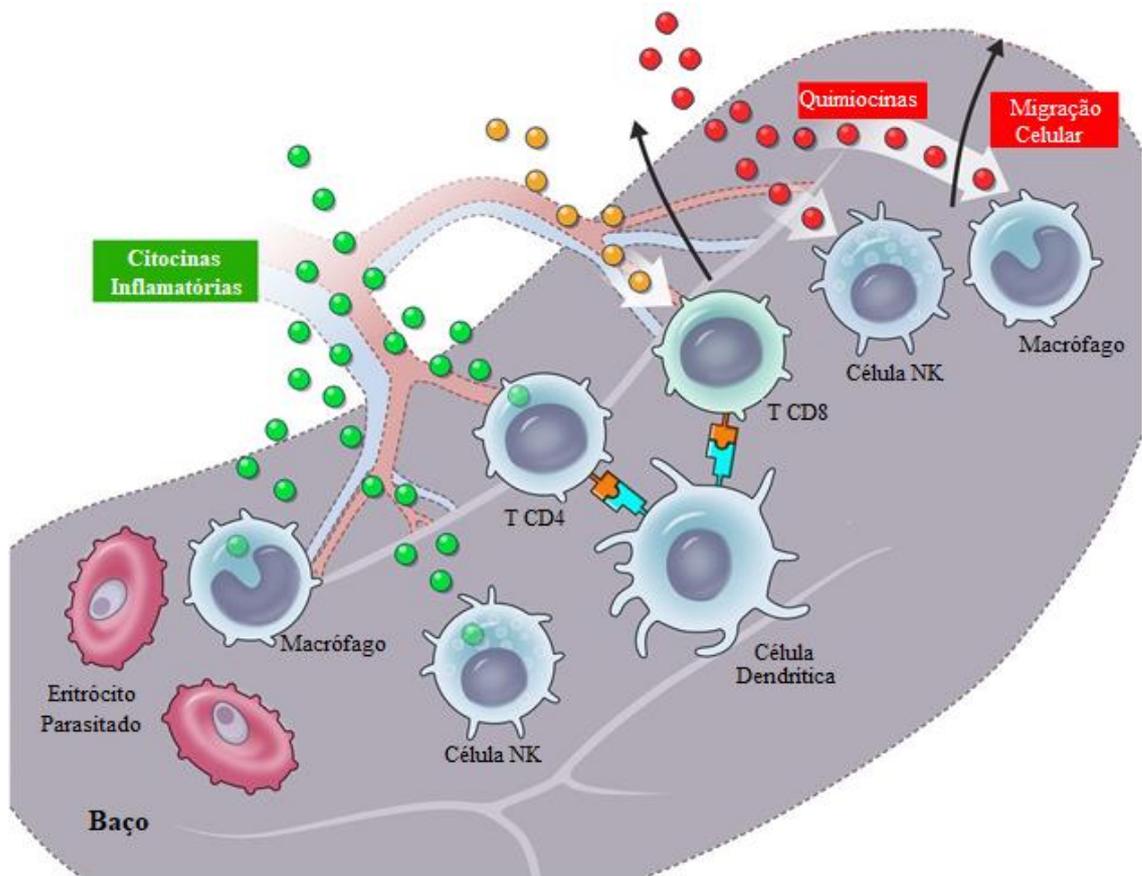


Figura 6. Resposta imune desencadeada no baço durante a infecção pelo *Plasmodium* sp. Durante a infecção, células da imunidade adaptativa são ativadas no baço, sobretudo, por macrófagos e células dendríticas, capazes de fagocitar e apresentar antígenos de eritrócitos parasitados. Citocinas e quimiocinas são capazes de ativar e ampliar a resposta efetora no órgão. Fonte: Adaptado de GORDON, E. et al., 2015.

Na malária, o baço é capaz de reter eritrócitos parasitados. A retenção destes eritrócitos ativa a resposta imune local, levando a expansão e migração de diversas células (JOICE et al., 2016). O aumento no número de células mieloides e linfoides no baço durante o estágio agudo da malária é observado em humanos e em modelo experimental murino. Análises macro e microscópicas *post mortem*, demonstraram mudanças na coloração do baço, presença de eritrócitos parasitados, acúmulo de hemozoína e massiva congestão de macrófagos e linfócitos (ZINGMAN & VINER, 1993; LEONI et al., 2015). Na ausência de um baço funcional, eritrócitos parasitados permanecem na circulação dificultando o combate a infecção (CHOTIVANICH et al., 2002).

O baço pode ser microanatomicamente compartimentalizado, possuindo polpa branca, polpa vermelha e zona marginal (MEBIUS & KRAAL, 2005). Cada uma destas áreas possui função e até mesmo tipos celulares específicos, como: macrófagos da polpa vermelha, macrófagos da polpa branca, macrófagos metalofílicos marginais, entre outros. Estas células podem ser diferenciadas por diferentes marcadores fenotípicos (BORGES DA SILVA et al., 2015).

1.5 Macrófagos: origem e função

Diferentes tecidos/órgãos possuem macrófagos residentes (próprios), como o cérebro (microglia), pulmão (macrófago alveolar) e fígado (células de Kupffer). Esses macrófagos residentes têm origem embrionária diferenciada. Acredita-se que são originados de precursores mieloides derivados do saco vitelino que migram para diferentes tecidos, durante a embriogênese (CORREALE, 2014; PERDIGUERO et al., 2015). São responsáveis pela fagocitose de células apoptóticas e pelo remodelamento tecidual, importantes para a organogênese geral do tecido embrionário (POLLARD, 2009). Durante o desenvolvimento embrionário, os progenitores mieloides e linfoides presentes no saco vitelino migram para o fígado por volta de 4ª semana de gestação, tornando-o o sítio de hematopoese mais importante. A medula óssea é o principal tecido responsável pela hematopoese na vida adulta, pode ser detectada entre a 11ª e 12ª semana de gestação, com isso, a hematopoese hepática diminui gradativamente até o momento do nascimento (MIGLIACCIO et al., 1986; HOLT & JONES, 2000).

Ao contrário dos macrófagos residentes, macrófagos derivados de monócitos são originados a partir de células tronco hematopoiéticas que, por meio da ação de fatores estimuladores de colônia, são capazes de formar células progenitoras mieloides pluripotentes (HEINSBROEK & GORDON, 2009; SILVA-JUNIOR et al., 2009; NAKAJIMA, 2011). Essas células dão origem sequencialmente aos monoblastos, pró-monócitos e monócitos, os quais são liberados da medula óssea na corrente sanguínea. Monócitos são células fagocíticas circulantes no sangue capazes de migrarem para os tecidos e se diferenciarem em macrófagos e células dendríticas (MOSSER & EDWARDS, 2008).

Os macrófagos apresentam diversas funções. Juntamente com os neutrófilos e as células dendríticas, constituem as principais células fagocíticas do organismo, capazes de eliminar microrganismos invasores. Sua função fagocitária também possibilita a apresentação de antígenos presentes no microambiente, via moléculas de MHC, às células T, ativando a imunidade adaptativa (GORDON et al., 2014; KAMBAYASHI & LAUFER, 2014), além de secretar diversas citocinas imunomodulatórias (WYNN et al., 2013).

Dependendo dos estímulos do microambiente envolvido em sua ativação, os macrófagos podem alterar seu fenótipo e o perfil de citocinas secretadas. Essa modulação ocorre pela sua alta plasticidade, em um processo conhecido como polarização (Figura 7) (SICA & MANTOVANI, 2012). De forma análoga ao que acontece com os linfócitos, foi empregada a terminologia M1 e M2 para indicar o estado de polarização dos macrófagos (BISWAS & MANTOVANI, 2010).

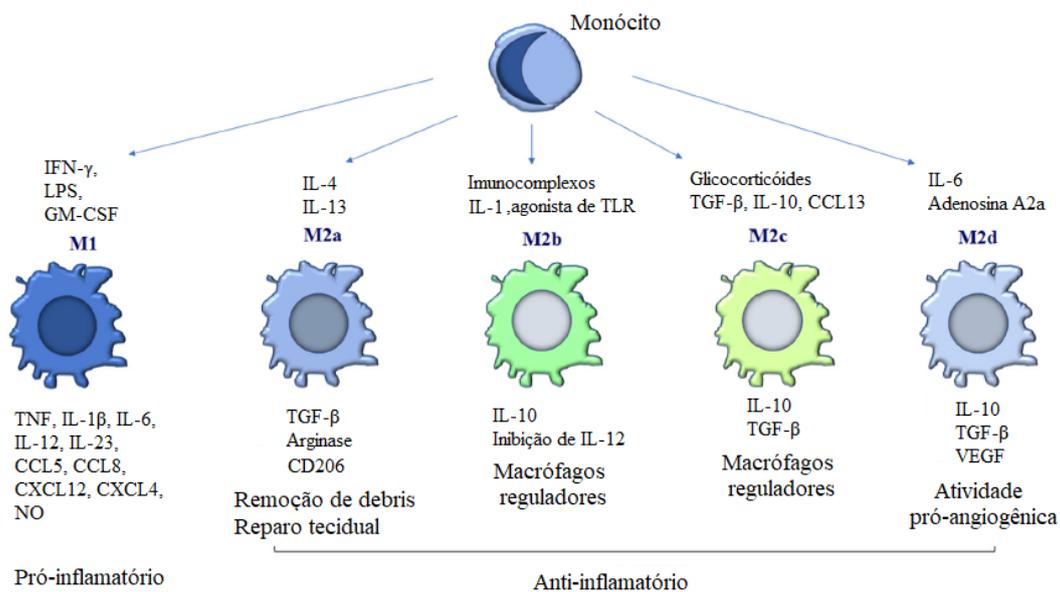


Figura 7. Classificação e polarização de macrófagos. Os monócitos sofrem polarização, dependendo dos estímulos recebidos. Os estímulos M1 incluem IFN- γ , LPS e GM-CSF, que induzem a diferenciação pró-inflamatória de macrófagos. Os macrófagos M2, anti-inflamatórios, são classificados em M2a, M2b, M2c, M2d, dependendo dos estímulos recebidos. IL-4 e IL-13 induzem macrófagos M2a, e sua função está relacionada a remoção de detritos celulares e reparo tecidual. M2b é induzido por agonista de TLR e IL-1, apresentam funções imunoregulatórias, secretando IL-10. M2c é induzido por IL-10, desempenha importante papel na remoção de células apoptóticas. Finalmente, IL-6 e adenosina A2a promovem polarização para perfil M2d, que desempenham atividade pró-angiogênica. Fonte: Adaptado de BENEDETTO et al., 2019.

Macrófagos classicamente ativados (M1) são induzidos por citocinas pró-inflamatórias, principalmente IFN- γ e TNF, ou por lipopolissacarídeo (LPS). Possuem alta capacidade de apresentar antígenos, secretam altos níveis de citocinas e mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 β , IL-12, NO (óxido nítrico) e ROS (Espécies Reativas de Oxigênio), e baixos níveis de IL-10 (MANTOVANI et al., 2004; MYERS et al., 2019).

Os M1 apresentam papel antitumoral e microbicida (DAVIS et al., 2013; LIN et al., 2013; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018). Participam da ativação e do recrutamento de células T citotóxicas e células *Natural Killer* para o tumor, favorecendo a eliminação das células modificadas (LAMAGNA et al., 2006).

Embora apresentem extrema importância para defesa do organismo contra diversos patógenos, os macrófagos M1 são capazes de causar danos teciduais severos pela alta expressão de citocinas pró-inflamatórias. A associação destas células com efeitos imunopatológicos é descrito na artrite reumatoide, paracoccidiodomicose, influenza,

tripanossomíases africana e malária (SZEKANECZ & KOCH, 2007; FERIOTTI et al., 2013; SICA et al., 2015; COLE et al., 2017; STIJLEMANS et al., 2018;).

Macrófagos alternativamente ativados (M2), são induzidos por citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10. Macrófagos M2 são caracterizados pela sua atividade anti-inflamatória e pró-tumoral, pela alta expressão de Arginase do tipo 1 (Arginase-1), IL-10 e TGF- β e baixa expressão de IL-12. Além disso, são importantes para reparo tecidual, remoção de células apoptóticas e imunorregulação, já que controla a ação de macrófagos M1 (GORDON & MARTINEZ, 2010; MANTOVANI et al., 2004; STEIDL et al., 2010). Diferentemente do perfil M1, o perfil M2 pode ser dividido em 4 outros subtipos (M2a, b, c e d), dependendo do estímulo recebido no microambiente. Estes subtipos de macrófagos M2 apresentam diferentes funções no organismo (MARTINEZ & GORDON, 2014).

O perfil M2a é induzido por IL-4 e IL-13 e é capaz de expressar grande quantidade de CD206 e arginase, além de secretar IL-10, CCL17 e CCL22, importante no recrutamento de células Th2. Macrófagos M2a estão envolvidos em reações alérgicas e no reparo tecidual. O perfil M2b é induzido por agonista de Receptores Tipo Toll (TLR) e IL-1, capaz de secretar grandes quantidades de IL-10, TNF- α e expressar iNOS (Enzima Óxido Nítrico Sintase Induzível). Apresentam funções imunoregulatórias por secretar inibidores de IL-12, mas, por outro lado, também está associado a persistência de infecções. O perfil M2c é induzido por IL-10 e expressa altos níveis de IL-10, TGF- β , CXCL13 e CCL18, levando a diminuição de quimiocinas pró-inflamatórias. Desempenha um importante papel na fagocitose de células apoptóticas. O perfil M2d é induzido principalmente por IL-6, caracterizado pela alta expressão de IL-10 e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) fornecendo propriedades pró-angiogênicas (BROWN et al., 2014; SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018; BENEDETTO et al., 2019; YIN et al., 2019).

Muitas patologias já foram atribuídas aos macrófagos M2. Os macrófagos associados ao câncer (TAMs) são os principais leucócitos infiltrados no microambiente tumoral. Esses macrófagos expressam características de macrófagos M2 e função imunossupressora, favorecendo o crescimento tumoral pela secreção IL-10 e TGF- β (STEIDL et al., 2010; BELGIOVINE et al., 2016).

Estudos *in vitro* demonstraram que macrófagos estimulados com IL-4 e/ou IL-13, ou seja, M2, apresentam baixa capacidade de apresentar antígenos aos linfócitos T, produzem baixos níveis de citocinas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, apresentam dificuldades de eliminar patógenos intracelulares (EDWARDS et al., 2006).

Diversos microrganismos utilizam da plasticidade/polarização dos macrófagos para subverter e evadir do sistema imune. O *Mycobacterium tuberculosis*, por exemplo, induz a polarização dos macrófagos para um perfil M2 e a produção de altas quantidade de IL-10, favorecendo seu crescimento intracelular (HUANG et al., 2015). Em infecções por helmintos, é possível observar a maior expressão de IL-4, arginase-1 e do receptor de manose CD206 (MOSSER & EDWARDS, 2008), perfil fenotípico dos macrófagos M2, o que impede a eliminação do parasito e estimula o reparo tecidual de tecidos danificados (BESCHIN et al., 2012).

Assim, enquanto a polarização dos macrófagos para perfil M1 restringe o desenvolvimento do microorganismo, controlando a infecção, a polarização para perfil M2 limita os danos teciduais associados a inflamação, mas suporta o desenvolvimento de infecções crônicas (LIN et al., 2013; TUNDUP et al., 2012).

Na malária, durante o ciclo eritrocítico, macrófagos são ativados e polarizados para o perfil M1, produzindo IFN- γ e controlando a parasitemia. Entretanto, altos níveis de IFN- γ contribuem para a gravidade da doença, como o desenvolvimento da MC (GAZZINELLI et al., 2014; LIN et al., 2013). Interessantemente, a administração de IL-33 durante a infecção de camundongos C57BL/6 com *Plasmodium berghei* ANKA, modelo experimental de MC, induziu a polarização de macrófagos esplênicos para o perfil M2 e reduziu os sinais clínicos da MCE (BESNARD et al., 2015). Ou seja, as ações pró e anti-inflamatória das células as envolvidas na resposta imune do hospedeiro devem ser cuidadosamente balanceadas afim de controlar a infecção e mitigar as imunopatologias associadas a doença.

Como mencionado anteriormente, a microglia é considerada uma célula de origem embrionária única, auto renovável e distribuída pelo sistema nervoso central (SNC) (AJAMI et al., 2007; PERDIGUERO et al., 2015). São responsáveis pela busca de alterações no microambiente cerebral e manutenção das funções normais do SNC. Quando ativadas, são capazes de secretar citocinas pró e anti-inflamatórias, além de apresentarem alta capacidade fagocítica, removendo células apoptóticas e debris celulares (NEUMANN et al., 2009). Ou seja, microglias são células alta plasticidade, podendo adotar diferentes fenótipos em resposta a diferentes estímulos (MA, Y. et al., 2017).

Microglias do tipo M1 são capazes de produzir mediadores pró-inflamatórios (IL-1 β , TNF- α , IL-6), aumentar a expressão de marcadores de ativação na superfície (CD40, CD86) e de iNOS. Por outro lado, microglias do tipo M2 são capazes liberar mediadores anti-inflamatórios (IL-10, TGF- β) e aumentar expressão do de receptor de manose (CD206) (KALKMAN & FEUERBACH, 2016; PARK et al., 2016).

Já foi observado que durante a hemorragia na MC, a microglia é capaz de fagocitar eritrócitos parasitados, ao mesmo tempo, esta célula é capaz de produzir citocinas pró-inflamatórias que comprometem a integridade da BHE. Por outro lado, logo após as células endoteliais, as microglias são as principais células produtoras de NO no cérebro capaz de preservar a integridade da BHE, visto que, essa molécula tem papel fundamental em regular o tônus vascular (DA FONSECA et al., 2014; FU et al., 2014).

1.6 Neutrófilos: origem e função

Os neutrófilos são células do sistema imune inato produzidas na medula óssea durante a hematopoiese. São os primeiros leucócitos recrutados para o sítio inflamatório, onde produzem e secretam citocinas, quimiocinas e proteínas/peptídeos antimicrobianos presentes em seus diferentes grânulos. Estas células são ativadas por distintos receptores, como os TLRs, pelos PAMPs e DAMPs presentes no local (KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013).

Essas células mieloides também são capazes de fagocitar microorganismos e eliminá-los de forma extremamente eficaz (MANTOVANI et al., 2011). Durante a infecção pelo *Plasmodium* sp., sabe-se que neutrófilos circulantes no sangue são capazes de fagocitar parasitos e eritrócitos parasitados *in vivo*, controlando o crescimento parasitário (AITKEN et al., 2018). Diferentes estudos já observaram neutrófilos contendo pigmento malárico circulando na corrente sanguínea de pacientes infectados (AMODU et al., 1998; LYKE et al., 2003). Contudo, a hemozoína presente nestas células reduz a explosão respiratória da mesma e, conseqüentemente, sua capacidade de eliminação do parasito fica comprometida e o indivíduo ainda torna-se mais suscetíveis à coinfeções (CUNNINGTON et al., 2012; TYBERGHEIN et al., 2014).

Outra estratégia desempenhada pelos neutrófilos para a eliminação dos parasitos é a liberação de redes extracelulares, conhecidas como NETs (PAPAYANNOPOULOS, 2018). As NETs são formadas pelo material nuclear dos neutrófilos, como cromatina e

histonas descondensadas, e diferentes proteínas granulares antimicrobianas que podem capturar, neutralizar e matar uma diversidade de microrganismos (BRINKMANN et al., 2004). Recentemente, observou-se NETs são induzidas na vasculatura de paciente com malária e sua presença correlaciona com o sequestro de parasitos e a gravidade da doença (KHO et al., 2018; KNACKSTEDT et al., 2019).

A migração dos neutrófilos e de diferentes outras subpopulações de células, como monócitos, NK e células T ativadas para o cérebro coincide com os sinais neurológicos da MCE (BELNOUE et al., 2002; HANSEN et al., 2007). A associação entre a migração de neutrófilos ativados para o endotélio cerebral com piores quadros de MC humana também foi observada (FEINTUCH et al., 2016). Em pacientes infectados com *Plasmodium vivax* e em modelos experimentais foi descrito que IFN do tipo I é capaz de modular a migração dessas células para o fígado, sendo possível associar a presença dos neutrófilos ativados com danos hepáticos na malária. A liberação do conteúdo dos seus grânulos (proteases e mieloperoxidasas) pode contribuir para o dano tecidual observado (ROCHA et al., 2016); (OTTERDAL et al., 2018).

Os neutrófilos também modulam o desenvolvimento da resposta imune à diferentes parasitos pela sua direta interação com outras células inflamatórias e residentes no local de infecção (MANTOVANI et al., 2011; AITKEN et al., 2018). Dependendo do seu estado de ativação, neutrófilos são capazes de ativar ou suprimir a resposta subsequente. Na malária, Já foi observado que neutrófilos de paciente se comportam de forma diferente quando comparados com indivíduos não infectados (CUNNINGTON et al., 2012; ROCHA et al., 2016).

2 JUSTIFICATIVA

A malária é uma parasitose causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, com cerca de 228 milhões de casos e 405 mil mortes no ano de 2017 (WHO, 2019). A MC é a manifestação clínica de maior gravidade e é caracterizada, principalmente, pelo acúmulo de eritrócitos infectados na microvasculatura cerebral (BAUER *et al.*, 2002; WASSMER; GRAU, 2018). Apesar dos mecanismos envolvidos na patogênese da doença ainda não estarem totalmente esclarecidos, acredita-se que a obstrução da microvasculatura cerebral pela citoaderência de eritrócitos ao endotélio vascular é ampliada por uma resposta imune pró-inflamatória exacerbada e, conseqüentemente, imunopatogênica. Uma série de evidências já mostrou que alta concentração de citocinas pró-inflamatórias no soro e plasma de pacientes infectados com *P. falciparum* estão associadas com a severidade da MC. Na MCE, estudos indicam que o desequilíbrio da resposta imune pró- e anti-inflamatória, envolvendo uma forte resposta imune do tipo 1 (Th1) (BELNOUE *et al.*, 2008; HIGGINS *et al.*, 2011), contribuem para o sequestro de eritrócitos infectados e leucócitos, levando a sérios danos teciduais e extravasamento vascular (GHAZANFARI *et al.*, 2018).

Devido à dificuldade em estudar os mecanismos imunes envolvidos no desenvolvimento ou não da MC em humanos, o uso dos modelos murinos de MCE têm sido extensivamente empregados. Embora nenhum modelo único de MCE reflita exatamente a doença em humanos, a infecção da linhagem suscetível de camundongos C57BL/6 com *Plasmodium berghei* ANKA (*P. berghei* ANKA) é uma ferramenta valiosa para a compreensão da MC humana, já que compartilha muitas das suas características fisiológicas e também imunológicas (CABRALES *et al.*, 2013). Com isso, o presente trabalho se justifica pela necessidade de compreender melhor o papel do sistema imune inato, sobretudo o papel de macrófagos esplênicos, no desenvolvimento ou não da malária cerebral.

3 HIPÓTESE

Acreditamos que após a infecção por *Plasmodium berghei* ANKA, macrófagos dos camundongos suscetíveis (C57BL/6) diferenciam-se em células classicamente ativadas (M1), modelando o desenvolvimento da resposta imune adaptativa pró-inflamatória (Th1) e, conseqüentemente, a suscetibilidade à MCE.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar o papel dos monócitos, neutrófilos e macrófagos que podem determinar o desenvolvimento da MC através do uso dos modelos experimentais de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.

4.2 Objetivos específicos

- 1.** Caracterizar o curso da infecção a partir do peso, temperatura corporal, parasitemia e sobrevida em modelos experimentais de resistência e suscetibilidade ao desenvolvimento de MC;
- 2.** Avaliar a disfunção da barreira hematoencefálica em modelos experimentais de resistência e suscetibilidade ao desenvolvimento de MC;
- 3.** Investigar diferenças na resposta inflamatória, através do padrão de citocinas séricas, do tamanho do baço, número total de esplenócitos e cinética de recrutamento das células inflamatórias mieloides para esse órgão, nos modelos experimentais de resistência e suscetibilidade ao desenvolvimento de MC;
- 4.** Identificar o perfil M1 e/ou M2 de macrófagos esplênicos em modelos experimentais de resistência e suscetibilidade ao desenvolvimento de MC;
- 5.** Identificar o perfil M1-like e/ou M2-like de microglias em modelos experimentais de resistência e suscetibilidade ao desenvolvimento de MC.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais e aspectos éticos

Foram utilizados camundongos C57BL/6 e BALB/c fêmeas com média de 6 a 8 semanas de idade e peso aproximado de 20 gramas (g). Os animais foram fornecidos pelo Instituto de Ciências e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fiocruz e mantidos no biotério do Pavilhão Leônidas Deane em condições controladas de temperatura, luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) e com livre acesso à água e ração. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz (licença: L-041/2016) (ANEXO 1).

5.2 Parasito e infecção

Foi utilizada a cepa de *Plasmodium berghei* ANKA expressando a proteína verde fluorescente (*PbA-GFP*), gerada e mantida como descrito previamente (FRANKE-FAYARD et al., 2004). Alíquotas de sangue contendo eritrócitos parasitados com *PbA-GFP* foram conservadas em nitrogênio líquido. Anterior à infecção dos grupos experimentais, 1-2 camundongos, denominados “animais passagem”, foram infectados via intraperitoneal (i.p.) com 100-150 µl do sangue criopreservado. No quarto dia após a infecção, os “animais passagem” foram anestesiados, com a injeção i.p. de 100 µl de uma solução contendo Solução Tamponada com Fosfatos (PBS), quetamina (150 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), e tiveram seu sangue coletado por punção cardíaca. Deste sangue foi avaliado o percentual de eritrócitos parasitados (*GFP*⁺) (parasitemia), por citometria de fluxo (BD FACSCANTO II), e o número de eritrócitos por milímetro cúbico (hematimetria), contados em câmara de Neubauer. Com base na parasitemia e hematimetria, o sangue foi diluído em PBS e ajustado para concentração final de 1×10^7 eritrócitos parasitados por ml. Os camundongos C57BL/6 e BALB/c (12-15 animais/linhagem) foram infectados no dia 0, via i.p., com $1 \times 10^6/100$ µl eritrócitos parasitados.

5.3 Avaliação do curso da infecção: sobrevivida, parasitemia, peso e temperatura corporal

Após infecção, os animais foram mantidos no biotério e monitorados diariamente para acompanhar a sobrevivida. Em um segundo grupo de experimentos, foram analisados, nos dias 1, 4 e/ou 6 após infecção, a parasitemia, peso e temperatura corporal (Figura 8). Animais não infectados (grupo Controle) foram avaliados em paralelo.

A parasitemia foi determinada por citometria de fluxo após diluição de 0.5 µl de sangue da cauda dos animais infectados em 500 µl de PBS. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSCANTO II e a porcentagem de eritrócitos parasitados (GFP⁺) determinado utilizando o programa FlowJo v.10.0 A temperatura corporal foi mensurada utilizando o termômetro retal (OAKTON). Posteriormente, os animais foram anestesiados (como descrito acima) e pesados em balança de precisão.

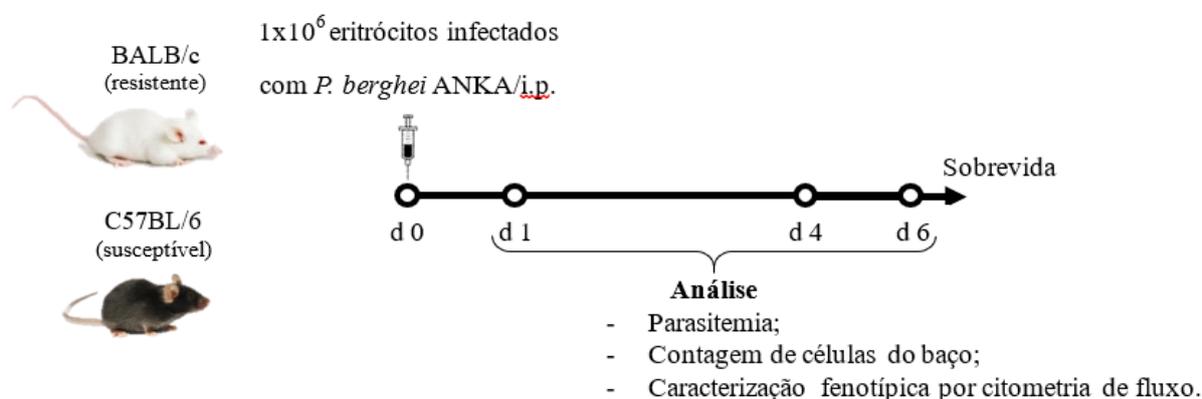


Figura 8. Desenho experimental. Camundongos BALB/c e C57BL/6 (12-15 animais/linhagem) foram infectados com 1 x10⁶ eritrócitos parasitados com *P. berghei* ANKA-GFP⁺ por via intraperitoneal. A sobrevivida dos animais infectados foi acompanhada até o dia 20 após infecção. Em um segundo grupo de experimentos, os camundongos parasitados foram analisados nos dias 1, 4 e/ou 6 após infecção. Foram avaliados a parasitemia, temperatura, peso, integridade da barreira hematoencefálica e coletados o sangue, baço e cérebro para dosagem de citocinas, contagem celular e caracterização fenotípica.

5.4 Avaliação da permeabilidade da barreira hematoencefálica

Para avaliar a permeabilidade da barreira hematoencefálica no 4º e 6º dia após a infecção, os animais foram anestesiados e receberam 100 µl do corante azul de Evans (Sigma) diluído a 2% em PBS, por via intravenosa (no plexo ocular). Após 1 hora da injeção do corante, os animais foram eutanasiados e tiveram seus cérebros removidos.

Os órgãos foram pesados e armazenados em tubos tipo Falcon de 15 ml, com 3 ml de formamida (Sigma) por 48 horas na estufa a 37 °C.

Para determinar a concentração do corante, a absorvância do sobrenadante de cada amostra foi avaliada por espectrofotometria, com comprimento de onda 630 nm. O valor da absorvância encontrado foi dividido pelo peso do cérebro para determinar a concentração de azul de Evans por grama de tecido.

5.5 Coleta e processamento dos tecidos/órgãos

5.5.1 Soro

Nos dias 1, 4 e/ou 6 após infecção, foi coletado o sangue total dos animais por punção cardíaca. O sangue foi transferido para tubo eppendorf de 1,5 ml e centrifugado por 5 minutos a 2400 g para obtenção do soro. Alíquotas do soro, individualizadas, foram armazenados em eppendorf e alocadas no freezer a -70 °C. O soro de camundongos BALB/c e C57BL/6 não infectados (grupos Controle) também foi preservado.

5.5.2 Baço

Em seguida, os animais foram submetidos a perfusão cardíaca com 10 ml de PBS gelado. O baço foi retirado, pesado e colocado, individualmente, sobre filtro celular (*Cell Strainer* - Falcon) de 70 µm em uma placa de 6 poços contendo PBS (2 ml) no gelo. Os baços foram picotados com tesoura, macerados com o auxílio de um êmbolo de seringa, lavados com PBS (5-8 ml), transferidos para tubos tipo Falcon de 15 ml e centrifugados por 10 minutos a 500 g. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuspendido. Para remoção dos eritrócitos, foi adicionado 1ml de tampão de lise de hemácias (Sigma) à suspensão celular por 1 a 2 minutos. Para interromper a ação do tampão de lise adicionamos 10ml de PBS contendo 5% de soro fetal bovino (PBS 5% SFB). A suspensão celular foi centrifugada novamente por 10 minutos a 500 g, o sobrenadante descartado e o sedimento celular em 5 ml de PBS 5% SFB. Para identificarmos o número total de esplenócitos, 10 µl da suspensão celular foi diluída em 0,1% de Azul de Tripán (Sigma) e contada na câmara de Neubauer (Kasvi). O valor encontrado na câmara foi multiplicado pelo valor da diluição e o fator de correção da câmara de Neubauer.

5.5.3 Cérebro

O cérebro dos animais também foi removido, pesado e armazenado em tubo tipo Falcon de 50 ml contendo 500 µl de PBS 5% de SFB no gelo. Individualmente, o cerebelo e o bulbo olfatório foram removidos e os cérebros picotados com tesoura sobre um filtro celular (*Cell Strainer* - Falcon) de 70 µm, macerados com o auxílio de um êmbolo de seringa e lavados com 20 ml de PBS 5% de SFB. A suspensão celular foi centrifugada por 10 minutos a 500 g e o sedimento celular ressuspenso em 5 ml de PBS contendo 30% de uma solução isotônica de Percoll (Sigma) a temperatura ambiente. A suspensão celular foi transferida para tubo tipo Falcon de 15 ml e centrifugada por 10 minutos a 700 g. Após centrifugação, a camada de mielina e o sobrenadante foi removido com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*. As células foram lavadas 2-3 vezes com 10 ml de PBS 5% de SFB e centrifugadas por 10 minutos a 500g. Ao final da última lavagem o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuspenso no volume residual.

5.6 Imunofenotipagem

5.6.1 Baço

A avaliação das subpopulações celulares foi realizada pela marcação de proteínas de superfície e intracelulares através de anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos.

Após obtenção da suspensão celular (etapa descrita no sub tópico 3.5.2), aproximadamente 1×10^6 células foram transferidas para placas 96 poços e de fundo “V” e centrifugadas por 10 minutos a 500 g. O sobrenadante foi descartado e as células incubadas em 50 µl do *pool* de anticorpos de superfície (Tabela 1) por 30 minutos a 4 °C e protegidas da luz. Posterior a incubação, as células foram lavadas com 150µl de PBS 5% de SFB, centrifugadas por 10 minutos a 500 g, sobrenadante descartado e as células ressuspenso em 200 µl de PBS 5% de SFB para aquisição.

Nos experimentos envolvendo marcação intracelular, anterior a identificação das moléculas de superfície, as células do baço foram pré-incubadas por 4 horas com GolgiPlug Brefeldin A e GolgiStop Monensin, ambos da BD Biosciences de acordo com as concentrações do fabricante e, em seguida, avaliadas quanto a viabilidade celular (Live/Dead BV421, Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Após 30

minutos a 4 °C de incubação com o Live/Dead, as células foram lavadas e marcadas com os anticorpos de superfície (Tabela 1).

Em seguida, as células foram fixadas e permeabilizadas utilizando o *Fixation/Permeabilization Solution Kit* (BD Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante, e então incubadas com o *pool* de anticorpos intracelulares (Tabela 1) diluídos no tampão de permeabilização, por 30-40 minutos a 4 °C e protegidas da luz. Ao final da incubação, as células foram lavadas 2 vezes com 150-200 µl do tampão de permeabilização. Para a leitura das amostras no aparelho FACS CANTO II (BD Bioscience), as células foram ressuspensas em 200 µl de PBS 5% de SFB. A análise dos dados foi realizada utilizando o programa FlowJo 10.0 (BD Biosciences).

Tabela 1. Lista de anticorpos utilizados para marcação de esplenócitos

	Marcador	Fluorescência	Clone	Marca
Superfície	CD11b	PE-Cy7	M1/70	BD
	CD11b	PerCP-Cy 5.5	M1/70	BD
	CD11c	PerCP-Cy 5.5	HL3	BD
	Ly6G	APC-Cy7	AL-21	BD
	Ly6C	APC	1A8	BD
	I-A/I-E	BB515	2G9	BD
	F4/80	PE	T45-2342	BD
	F4/80	Texas Red	BM8	Invitrogen
	CD68	eFluor 660	FA-11	Invitrogen
	CD206	PE-Cy7	MR6F3	Invitrogen
Intracelular	NOS2	e-Fluor 780	CXNFT	Invitrogen
	IL-12p35	FITC	27537	Invitrogen
	Arginase 1	APC	AlexF5	Invitrogen

5.6.2 Cérebro

Para avaliar a subpopulação de macrófagos residentes do sistema nervoso central, as células obtidas do cérebro (etapa descrita no sub tópico 3.5.3) foram transferidos para placa de 96 poços em fundo “V” e centrifugadas por 10 minutos a 500 g. O sobrenadante dos poços foi descartado e as células ressuspensas com 50µl do Kit de viabilidade celular (Live/Dead BV421, Invitrogen) diluído de acordo com o fabricante. A placa foi incubada protegida da luz a 4 °C por 30 minutos. Após o término da incubação as células foram lavadas com 100 µl de PBS com 5% de SFB e centrifugadas por 10 minutos a 500 g. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 50 µl do *pool* de anticorpos de superfície (Tabela 2) por 30 minutos a 4 °C protegidas da luz. Ao final da incubação, as células foram lavadas com 150 µl de PBS e centrifugadas por 10 minutos 500 g. Para a leitura das amostras no aparelho FACS CANTO II (BD Bioscience), as células foram ressuspensas em 200 µl de PBS 5% de SFB. A análise dos dados foi realizada utilizando o programa FlowJo 10.0 (BD Biosciences).

Tabela 2. Lista de anticorpos utilizados para marcação de microglia

	Marcador	Fluorescência	Clone	Marca
	CD11b	PerCP-Cy 5.5	M1/70	BD
	CD45.2	FITC	104	BD
Superfície	F4/80	PE	T45-2342	BD
	I-A/I-E	BB515	2G9	BD
	CD206	Pe-Cy7	MR6F3	Invitrogen
Intracelular	NOS2	e-Fluor 780	CXNFT	Invitrogen

5.7 Dosagem de citocinas séricas

Os níveis séricos das citocinas dos diferentes grupos experimentais-foram avaliados pelo Kit Cytokine Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences) de acordo com as especificações do fabricante. A leitura das amostras foi feita no FACSCANTO II (BD Bioscience) e os dados analisados no programa FCAP Array (versão 3.0).

5.8 Análise estatística

Os dados obtidos foram processados no software GraphPad Prism 7.0 e apresentados como \pm média do erro padrão (SEM). Para a análise da curva de sobrevida foi utilizado o teste estatístico *Log-Rank*, sendo o valor de $P \leq 0,0001$ (****). As demais análises estatísticas foram realizadas através do teste *t* não-pareado, sendo os valores de $P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,005$ (**), $P \leq 0,0005$ (***), $P \leq 0,0001$ (****).

6 RESULTADOS

6.1 Camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA apresentam a mesma parasitemia e diferentes sinais clínicos da doença

Para confirmar a suscetibilidade e resistência das linhagens de camundongos C57BL/6 e BALB/c, respectivamente, ao desenvolvimento de MCE, os animais foram inoculados com 1×10^6 eritrócitos infectados com *P. berghei* ANKA e sua sobrevivência acompanhada. Todos os animais C57BL/6 morreram no 7º dia (Figura 9A). Apenas 25% dos camundongos BALB/c morreram entre os dias 6 e 9, enquanto os demais vieram a óbito tardiamente ou foram eutanasiados no 20º dia após infecção, de acordo com as normas do Comitê de Ética. Outros sinais clínicos do desenvolvimento de MCE como perda de peso, hipotermia e quebra da barreira hematoencefálica (BHE) também foram avaliados. Camundongos C57BL/6 apresentaram, no 6º dia após infecção, uma significativa perda de peso (média= $-2,94 \pm 0,31$) (Figura 9B), queda de temperatura corporal (média= $-8,98 \pm 1,05$) (Figura 9C) e uma grave quebra da BHE (média= $16,2 \pm 1,8$) (Figura 9D e E) quando comparados aos controles não infectados. Apesar da maioria dos animais BALB/c infectados não desenvolverem MCE, eles apresentaram significativa perda de peso (média= $-1,96 \pm 0,53$) (Figura 9B), sutil queda de temperatura corporal (média= $-1,71 \pm 0,49$) (Figura 9C) e leve extravasamento de proteínas plasmáticas para o tecido cerebral (média= $6,61 \pm 1,46$) (Figura 9D e E) no 6º dia após infecção, quando comparados aos animais não infectados.

As diferenças observadas no curso clínico da doença nestes modelos experimentais, entretanto, não estão diretamente correlacionadas com a parasitemia desenvolvida. Ao avaliarmos o percentual de eritrócitos parasitados GFP⁺ (Figura 9F), podemos notar que a parasitemia foi similar entre os animais ao longo da infecção (Figura 9G). Assim, estes dados sugerem que a replicação do parasito *per se* não dita o desenvolvimento da MCE.

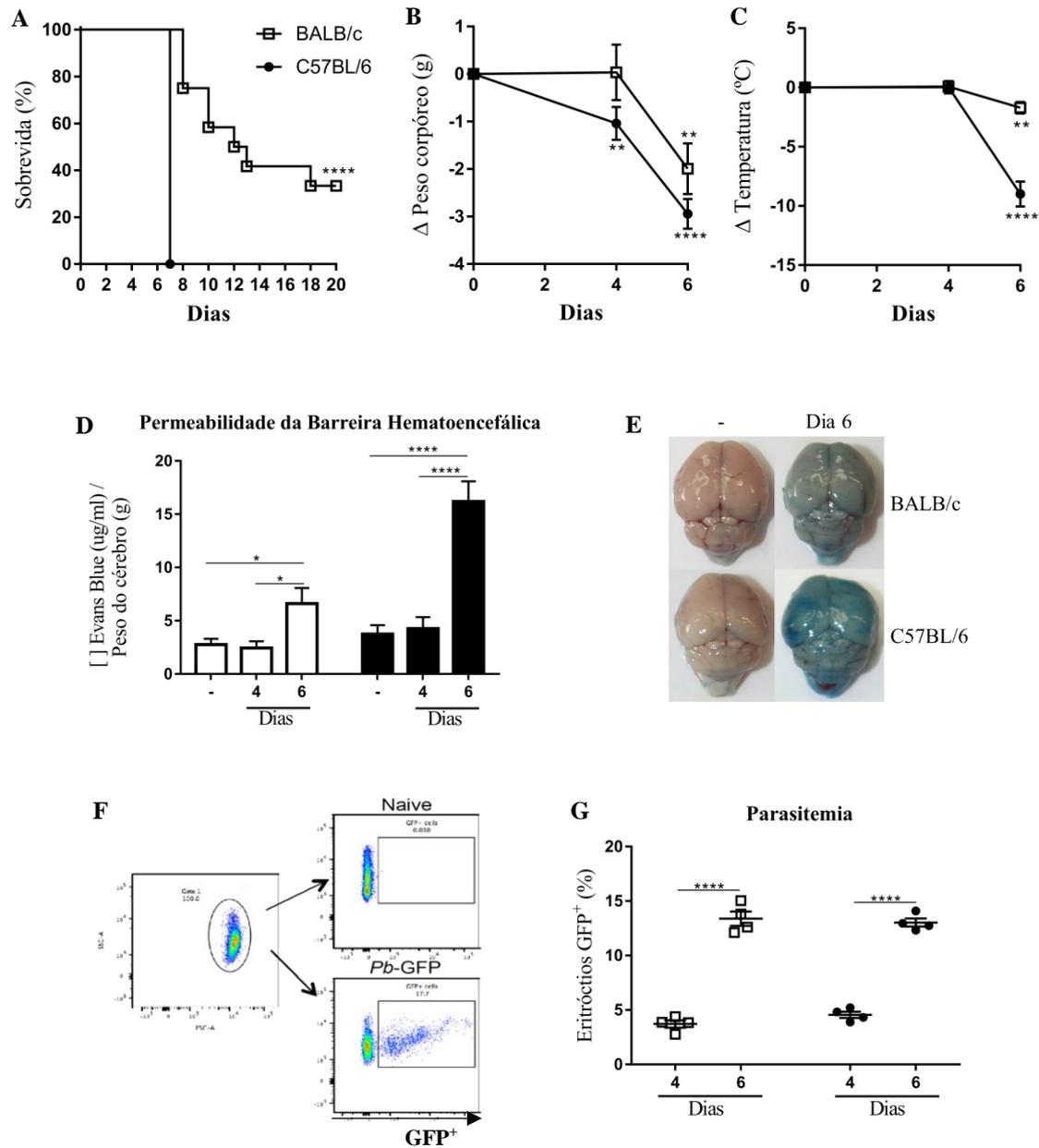


Figura 9. Avaliação do curso da infecção e progressão da doença. Sobrevida (A), variação do peso corpóreo (B) e temperatura (C), concentração do Azul de Evans por grama do tecido cerebral (D), imagens representativas de cérebros após injeção de Azul de Evans (E), gráficos *dot plots* representativos de eritrócitos parasitados (*PbA-GFP⁺*) ou não (controle) (F), e percentagem de eritrócitos parasitados (*GFP⁺*) (G) de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados ou não com *P. berghei* ANKA. Grupos: Controle (-), 4 dias (4d) e 6 dias (6d) após infecção. Gráficos B, C e D, dados compilados de 3 experimentos independentes (N=12-18 animais/grupo). Gráficos A e G, dados representativos de 3 experimentos independentes (N=4-6 animais/grupo). Para a análise da curva de sobrevida foi utilizado o teste estatístico *Log-Rank*, sendo o valor de $P \leq 0,0001$ (****). As demais análises estatísticas foram realizadas através do teste *t* não-pareado, sendo os valores de $P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,005$ (**), $P \leq 0,0005$ (***), $P \leq 0,0001$ (****).

6.2 Neutrófilos e monócitos inflamatórios apresentam cinética de recrutamento diferenciada para o baço de camundongos suscetíveis e resistentes à malária cerebral

Ao analisarmos o baço dos animais no 4º dia após infecção por *P. berghei* ANKA, observamos um aumento no peso do órgão em ambos os grupos de animais parasitados, BALB/c (média=0,328±0,008) e C57BL/6 (média=0,163±0,004), quando comparado aos camundongos não infectados, BALB/c (média=0,155±0,005) e C57BL/6 (média=0,085±0,006) (Figura 10A). É notável, no entanto, que a contagem de células do baço também aumentou no 4º e 6º dia após infecção dos camundongos BALB/c (média=208,4±21,7 e média=370,2±58,7, respectivamente) em relação aos animais controles (média=139,7±15,6). Em contraste, os camundongos C57BL/6 infectados apresentaram um número total de células dia 6 (média=79±15,1) ligeiramente reduzido ou mesmo semelhante em comparação com o dia 4 (média 4dpi=109,3±10,0) após a infecção e com os animais controles não infectados (média= 73,3±5,7), respectivamente (Figura 10B).

O aumento da celularidade do baço dos animais infectados (C57BL/6 e BALB/c) ocorreu, em parte, pelo recrutamento de células mieloides. As subpopulações de células mieloides foram identificadas através de seu tamanho e granulosidade, pela expressão da molécula CD11b, e posteriormente classificadas baseado na expressão de marcadores adicionais em neutrófilos (CD11b⁺Ly6C^{int}Ly6G⁺) e monócitos inflamatórios (CD11b⁺Ly6C^{hi}Ly6G⁻) (Figura 10C-F). Ao avaliarmos o número total de células mieloides CD11b⁺, observamos o aumento destas células durante a infecção em ambos os grupos experimentais (Figura 10G). E, assim como observado no número total de células no baço, camundongos C57BL/6 infectados não apresentaram um aumento significativo do número total de células CD11b⁺ entre o 4º e o 6º dia após infecção. Dentre as subpopulações de células CD11b⁺, observamos influxo de neutrófilos entre o 1º e 4º após infecção. Nos animais C57BL/6, no entanto, os neutrófilos atingiram o pico de recrutamento em torno do dia 4, seguido por uma queda nos números já evidentes no dia 6 após a infecção. Nos animais BALB/c, o influxo destas células se manteve constante, ampliando seus números no 6º dia após infecção (Figura 10H). Diferente dos neutrófilos, o número total de monócitos inflamatórios nos camundongos C57BL/6, assim como nos camundongos BALB/c, aumentou ao longo da infecção, embora em diferentes proporções (Figura 10I).

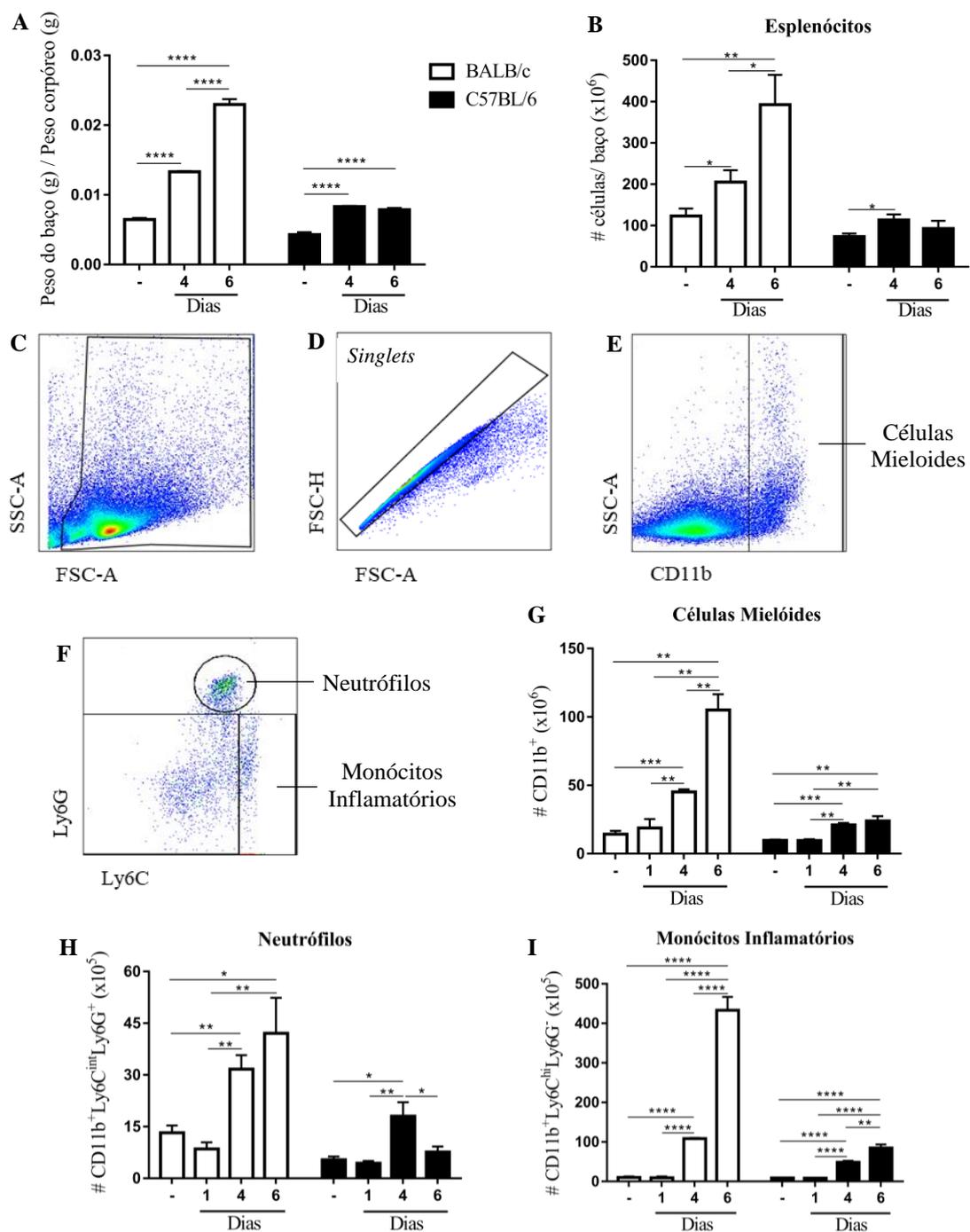


Figura 10. Cinética do recrutamento de células mielóides para o baço de animais BALB/c e C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA. Razão entre peso do baço (g) e peso corpóreo (g) (A), número total de esplenócitos (B), gráficos *dot plots* representativos da estratégia de *gates* utilizada para identificação das células mielóides de acordo com os parâmetros de tamanho e granulosidade (C), seleção das *singlets* (D), das células CD11b⁺ (E) e avaliação dos marcadores Ly6C e Ly6G para identificação dos neutrófilos (CD11b⁺Ly6C^{int}Ly6G⁺) e monócitos inflamatórios (CD11b⁺Ly6C^{hi}Ly6G⁻) (F), número total de células mielóides CD11b⁺, (G), neutrófilos (H) e monócitos inflamatórios (I) presentes no baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados ou não com *P. berghei* ANKA. Grupos: Controle (-), 4 dias (4d) e 6 dias (6d) após infecção. Gráficos compilados de 3 experimentos independentes. N=12-18 animais/grupo. Análise estatística feita pelo teste *t* não pareado, sendo $P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,005$ (**), $P \leq 0,0005$ (***), $P \leq 0,0001$ (****).

6.3 A infecção por *Plasmodium berghei* ANKA promove alterações nas populações de macrófagos esplênicos em camundongos BALB/c e C57BL/6

Macrófagos presentes no baço são responsáveis pela fagocitose de patógenos e eritrócitos, além de estarem envolvidos no processamento e apresentação de antígenos à células do sistema imune adaptativo. O número total de macrófagos da polpa vermelha ($CD11b^{low/int}F4/80^+$) e da polpa branca ($CD11b^{low/int}CD68^+$) foram investigado a partir de seus marcadores de superfície ao longo da infecção (Figura 11).

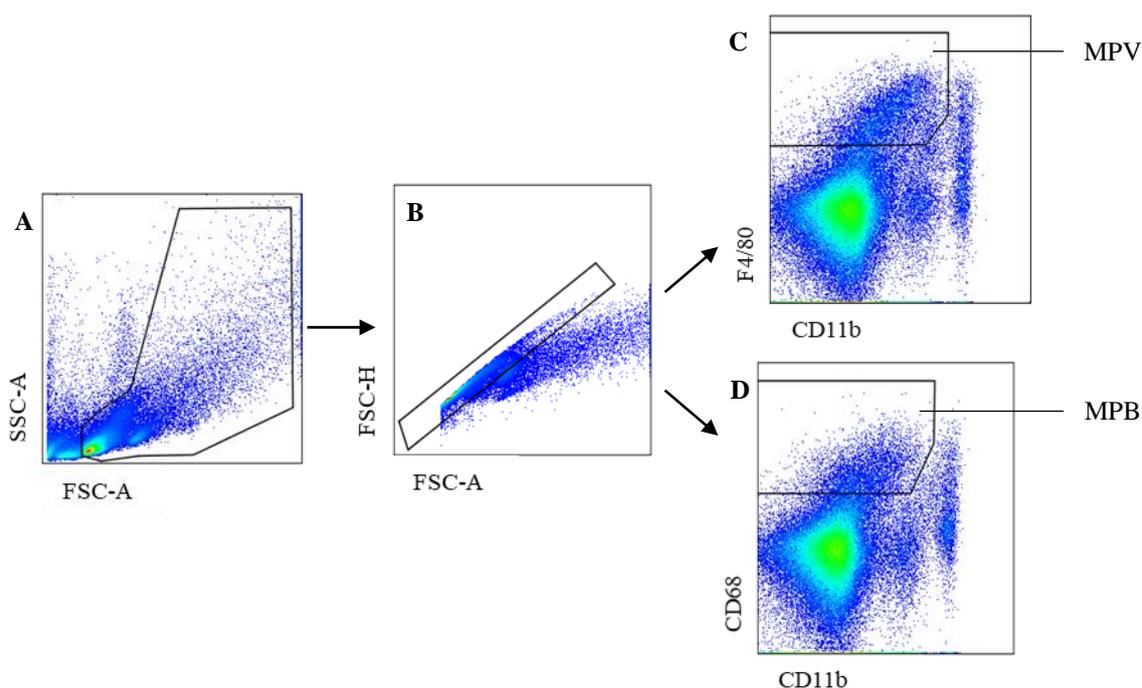


Figura 11. Estratégia de gates utilizada para análise dos macrófagos da polpa vermelha e polpa branca. Gráficos *dot plots* representativos da estratégia utilizada para identificação das subpopulação de macrófagos utilizando os parâmetros de tamanho e granulosidade (A), seleção das células *singlets* (B), identificação dos macrófagos da polpa vermelha (MPV) pela expressão de F4/80 e CD11b (C) e dos macrófagos da polpa branca (MPB) pela expressão de CD68 e CD11b (D) presentes no baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

Os animais BALB/c infectados não apresentaram mudanças no número total de macrófagos da polpa vermelha (Figura 12A). Por outro lado, a avaliação do número total de macrófagos da polpa branca destes animais expôs um aumento destas células detectado no 6º dia após infecção (Figura 12B). Já os animais suscetíveis à malária cerebral, C57BL/6, exibiram uma diminuição significativa no número total de macrófagos da polpa vermelha, entre o 4º e 6º dia após infecção, e nenhuma diferença no número total de macrófagos da polpa branca (Figura 12A e B).

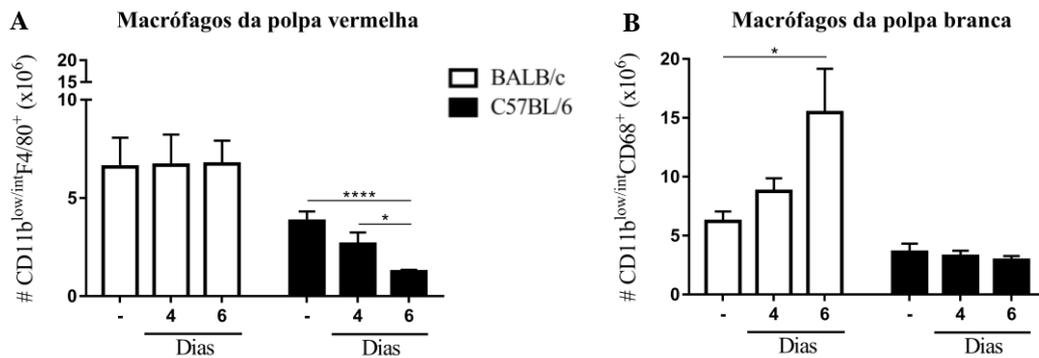


Figura 12. Análise dos macrófagos presentes no baço de animais BALB/c e C57BL/6 ao longo da infecção por *Plasmodium berghei* ANKA. Número total dos macrófagos da polpa vermelha (CD11b^{low/int}F4/80⁺) (A) e da polpa branca (CD11b^{low/int}CD68⁺) (B) por baço e em diferentes tempos após infecção de camundongos BALB/c e C57BL/6. Grupos: Controle (-), 4 dias (4d) e 6 dias (6d) após infecção. Gráficos compilados de 2 experimentos independentes. N=8-12 animais/grupo. Análise estatística feita pelo teste *t* não pareado, sendo $P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,005$ (**), $P \leq 0,0005$ (***), $P \leq 0,0001$ (****).

6.4 A infecção de camundongos BALB/c por *Plasmodium berghei* ANKA promove aumento no percentual de macrófagos da polpa vermelha esplênica que expressam o receptor de manose CD206

Ao avaliarmos a expressão do receptor de manose CD206 nas subpopulações de macrófagos esplênicos, observamos que os animais BALB/c não infectados apresentaram aproximadamente 40% dos macrófagos da polpa vermelha (CD11b^{low/int}F4/80⁺) expressando o receptor de manose CD206 (Figura 13A-D). Esse valor passou para 80% no 4º dia após infecção, com ligeira queda deste percentual observada no 6º dia após infecção. Interessantemente, não houve mudança no número total de macrófagos da polpa vermelha CD206⁺ (Figura 13E). Entretanto, nos animais C57BL/6, o percentual de macrófagos da polpa vermelha expressando o receptor CD206, se manteve constante, enquanto o total destas células CD206⁺ reduziu ao longo do curso da infecção (Figura 13E). Embora em diferentes proporções, o valor percentual e número total de macrófagos da polpa vermelha expressando arginase (Figura 13H-I) seguiu uma cinética semelhante a observada para a expressão do receptor de manose.

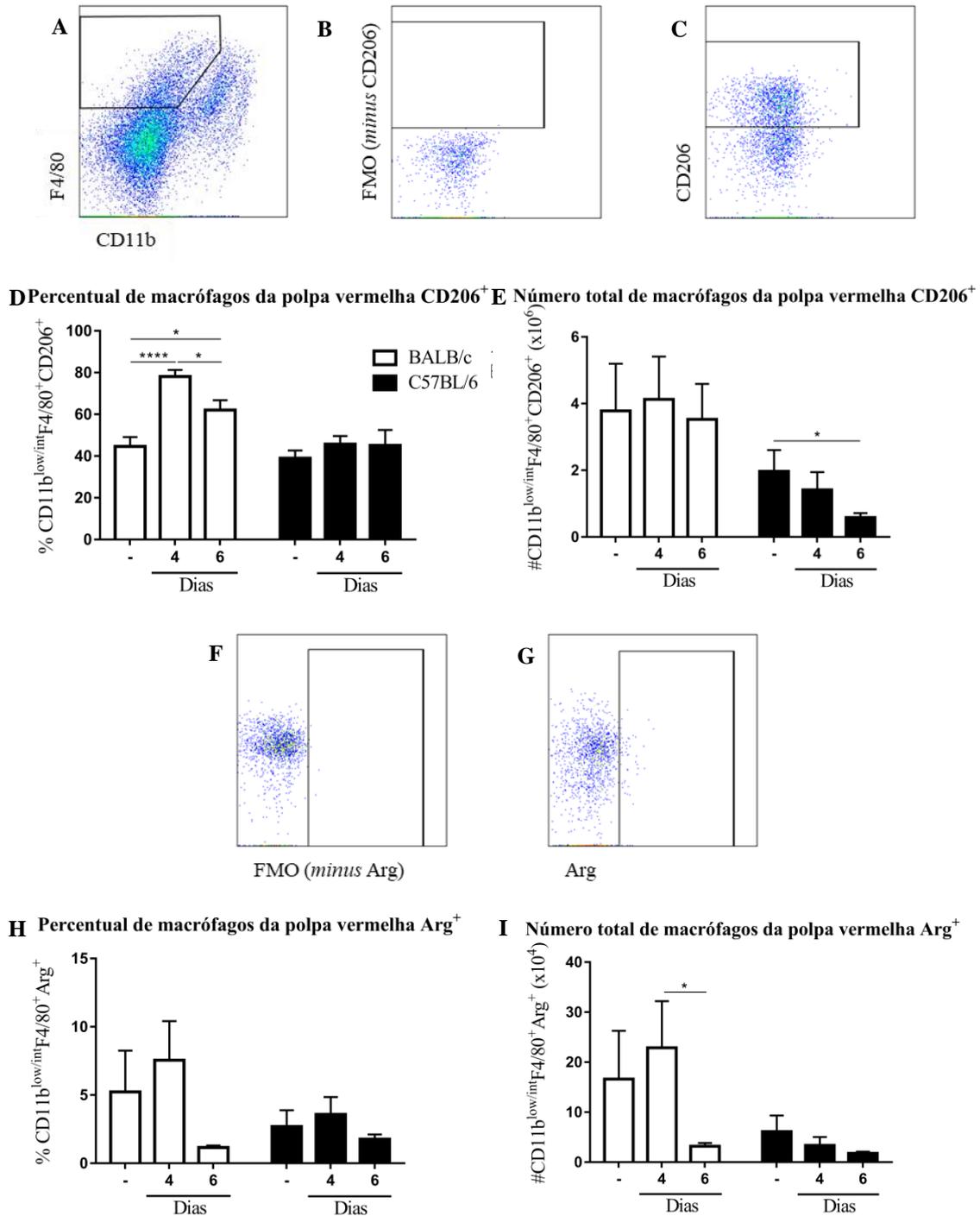


Figura 13. Análise da expressão de CD206 e arginase nos macrófagos da polpa vermelha do baço de animais BALB/c e C57BL/6 ao longo da infecção com *Plasmodium berghei* ANKA. Gráficos dot plots representativos da estratégia de gate utilizada para identificar macrófagos da polpa vermelha (A), controle negativo (FMO, *minus* CD206) (B) e da marcação específica do receptor de manose CD206 (C). Percentual de macrófagos da polpa vermelha CD206⁺ em relação ao total de macrófagos da polpa vermelha (D) e número total de macrófagos da polpa vermelha CD206⁺ por baço (E), em diferentes tempos após infecção de camundongos BALB/c e C57BL/6. Gráficos dot plots representativos da estratégia de gate demonstrando o controle negativo (FMO, *minus* arginase) (F) e da marcação específica para arginase (G). Percentual de macrófagos da polpa vermelha ARG⁺ em relação ao total de macrófagos da polpa vermelha (H) e número total de macrófagos da polpa vermelha ARG⁺ por baço (I), em diferentes tempos após infecção de camundongos BALB/c e C57BL/6. Grupos: Controle (-), 4 dias (4d) e 6 dias (6d) após infecção. Gráficos compilados de 2 ou 3 experimentos independentes. N=8-18 animais/grupo. Análise estatística feita pelo teste t não pareado, sendo $P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,005$ (**), $P \leq 0,0005$ (***), $P \leq 0,0001$ (****).

6.5 A infecção de camundongos C57BL/6 por *Plasmodium berghei* ANKA promove aumento no percentual e número total de macrófagos da polpa vermelha que expressam iNOS

Complementar aos dados previamente apresentados, o valor percentual e número total de macrófagos da polpa vermelha expressando iNOS não apresentou variação estatística ao longo da infecção dos animais BALB/c, embora no 4º dia após-infecção foi possível observar uma ligeira diminuição das células CD11b^{low/int}F4/80⁺iNOS⁺ (Figura 14A-E). Nos animais C57BL/6, entretanto, foi possível observar que o valor percentual, assim como o número total, dos macrófagos da polpa vermelha expressando iNOS mais que dobrou, passando de 2% nos animais não infectados e infectados no 4ª dia após infecção para cerca de 5% no 6º dia após infecção (Figura 14A-E).

Ao avaliarmos o valor percentual e número total de macrófagos da polpa vermelha que expressam IL-12, identificamos que tanto os animais BALB/c quanto os animais C57BL/6 apresentaram valores similares durante o curso da infecção (Figura 14F-H). Embora tenha sido observada variação do valor percentual e número total no 4º dia após infecção em relação aos controles, foi possível observar diferenças estatísticas apenas na avaliação do número total destas células em camundongos C57BL/6 (Figura 14I). Entre o 4º e 6º dia após infecção os animais C57BL/6 foram capazes de retomar ao mesmo valor total dos animais não infectados, enquanto os animais BALB/c foram capazes de superar o número total destes macrófagos quando comparado aos valores encontrados nos camundongos não infectado.

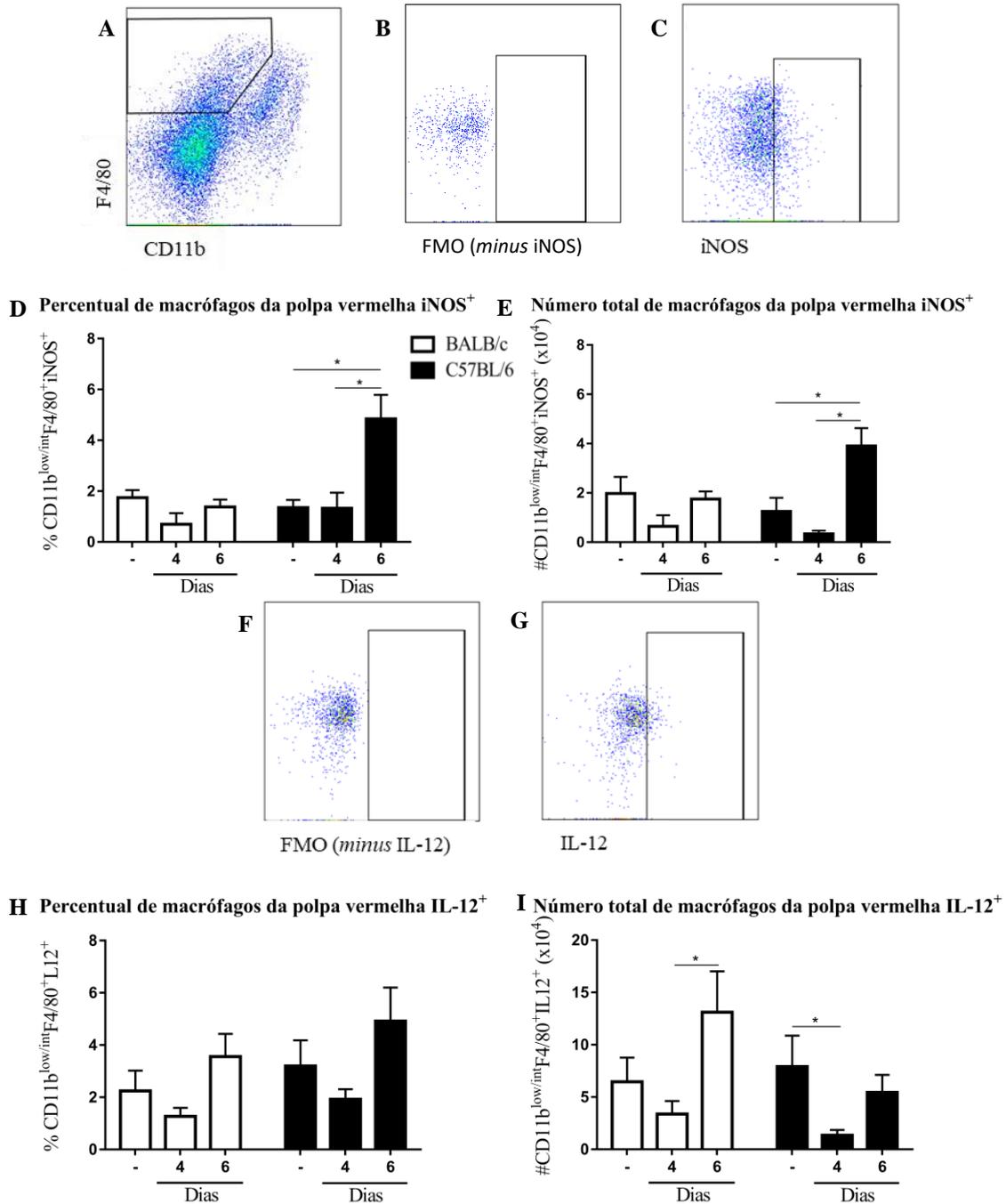


Figura 14. Análise da expressão de iNOS e IL-12 nos macrófagos da polpa vermelha em animais BALB/c e C57BL/6 ao longo da infecção com *Plasmodium berghei* ANKA. Gráficos dot plots representativos da estratégia de gate utilizada para identificar macrófagos da polpa vermelha (A), controle negativo (FMO, *minus* iNOS) (B) e da marcação específica de iNOS (C). Percentual de macrófagos da polpa vermelha iNOS⁺ em relação ao total de macrófagos da polpa vermelha (D) e número total de macrófagos da polpa vermelha iNOS⁺ por baço (E), em diferentes tempos após infecção de camundongos BALB/c e C57BL/6. Gráficos dot plots representativos do controle negativo (FMO, *minus* IL-12) (F) e da marcação específica para a citocina IL-12 (G). Percentual de macrófagos da polpa vermelha IL-12⁺ em relação ao total de macrófagos da polpa vermelha (H) e número total de macrófagos da polpa vermelha IL-12⁺ por baço (I), em diferentes tempos após infecção de camundongos BALB/c e C57BL/6. Grupos: Controle (-), 4 dias (4d) e 6 dias (6d) após infecção. Gráficos compilados de 2 ou 3 experimentos independentes. N=8-18 animais/grupo. Análise estatística feita pelo teste t não pareado, sendo $P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,005$ (**), $P \leq 0,0005$ (***), $P \leq 0,0001$ (****).

6.6 Redução no percentual e número total de macrófagos da polpa branca expressando o receptor de manose CD206 após infecção de camundongos BALB/c e C57BL/6 por *Plasmodium berghei* ANKA

Os animais BALB/c não infectados apresentaram aproximadamente 30% de seus macrófagos da polpa branca ($CD11b^{low/int}CD68^+$) expressando receptor de manose CD206 (Figura 15A-D). Observamos que esse valor percentual se manteve constante no 4º dia após infecção e reduziu apenas no 6º dia após infecção, quando o valor percentual passou para 12%. Os animais C57BL/6 não infectados apresentaram valor percentual similar aos animais BALB/c controles. Entretanto, nos animais C57BL/6, foi possível observar redução percentual dessa população de macrófagos $CD206^+$ no 4º e, estatisticamente significativo, no 6º dia após infecção.

A análise do número total de macrófagos da polpa branca, de ambas as linhagens, mostrou variações semelhantes as observadas na avaliação percentual destas células (Figura 15E).

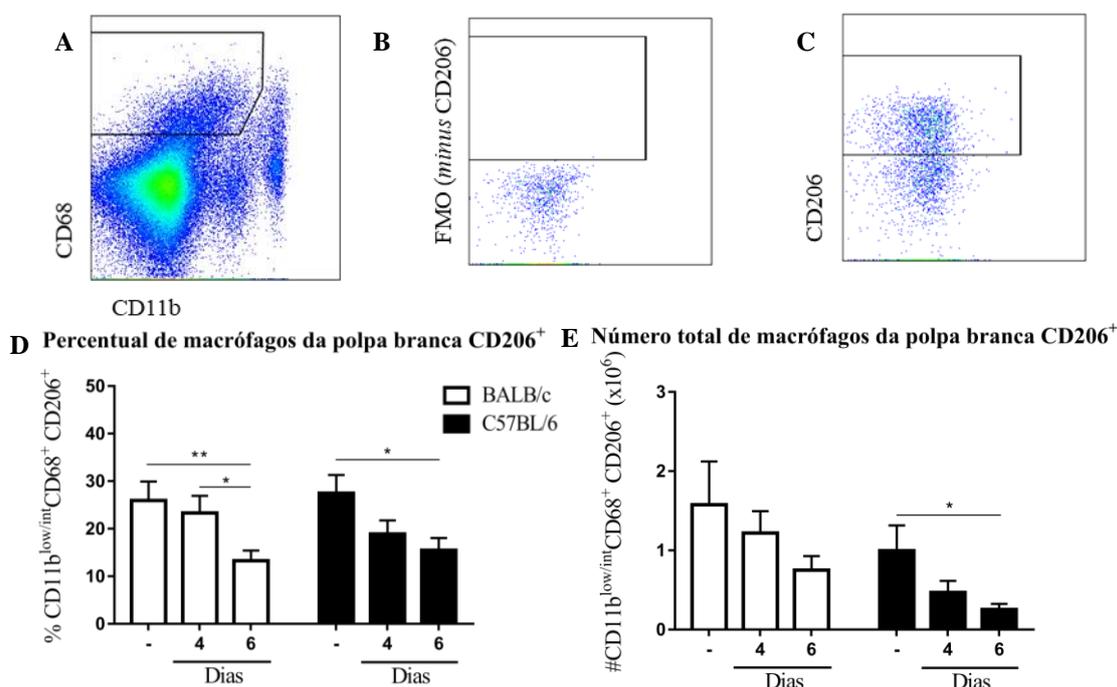
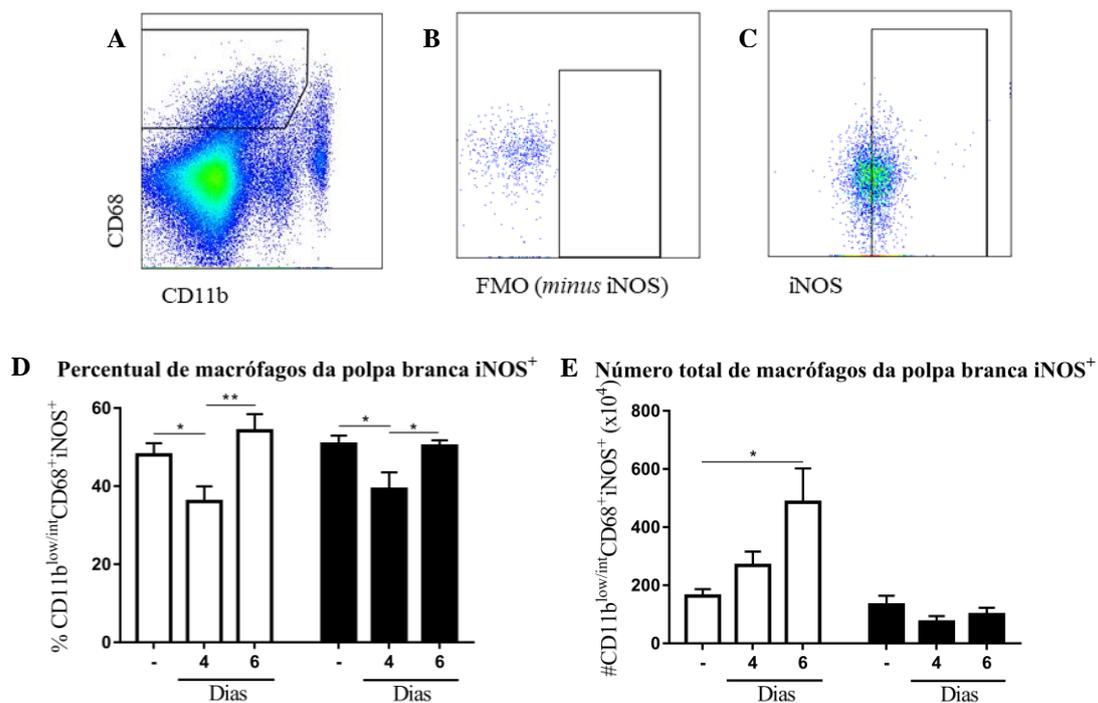


Figura 15. Análise da expressão de CD206 em macrófagos da polpa branca de animais BALB/c e C57BL/6 ao longo da infecção com *Plasmodium berghei* ANKA. Gráficos dot plots representativos da estratégia de gate utilizada para identificar macrófagos da polpa branca (A), controle negativo (FMO, minus CD206) (B), e da marcação específica para CD206 (C). Percentual de macrófagos da polpa branca $CD206^+$ em relação ao total de macrófagos da polpa branca (D) e número total de macrófagos da polpa branca $CD206^+$ por baço (E), em diferentes tempos após infecção de camundongos BALB/c e C57BL/6. Grupos: Controle (-), 4 dias (4d) e 6 dias (6d) após infecção. Gráficos compilados de 3 experimentos independentes. N=12-18 animais/grupo. Análise estatística feita pelo teste t não pareado, sendo $P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,005$ (**), $P \leq 0,0005$ (***), $P \leq 0,0001$ (****).

6.7 A infecção de camundongos BALB/c por *Plasmodium berghei* ANKA promove aumento no número total de macrófagos da polpa branca que expressam iNOS e IL-12

Verificamos que o valor percentual dos macrófagos da polpa branca que expressam iNOS seguiu cinética semelhante, após infecção, em ambas as linhagens utilizadas. Os animais BALB/c e C57BL/6, quando não infectados, apresentaram valor percentual dos macrófagos da polpa branca iNOS⁺ de aproximadamente 45%, seguida por queda desses valores no 4º dia após infecção. Entre o 4º e 6º dia após infecção o percentual dos macrófagos da polpa branca iNOS⁺ retomou valores similares aos observados nos animais controles (Figura 16D). Ao contrário do valor percentual, a cinética do número total dos macrófagos da polpa branca iNOS⁺ foi diferente entre os animais. Nos animais BALB/c o número total desses macrófagos aumentou, enquanto nos animais C57BL/6 se manteve constante ao longo da infecção (Figura 16E).

Constatamos também que o valor percentual e número total dos macrófagos da polpa branca expressando IL-12, em ambas as linhagens de camundongos, aumenta durante o curso da infecção (Figura 16F-I).



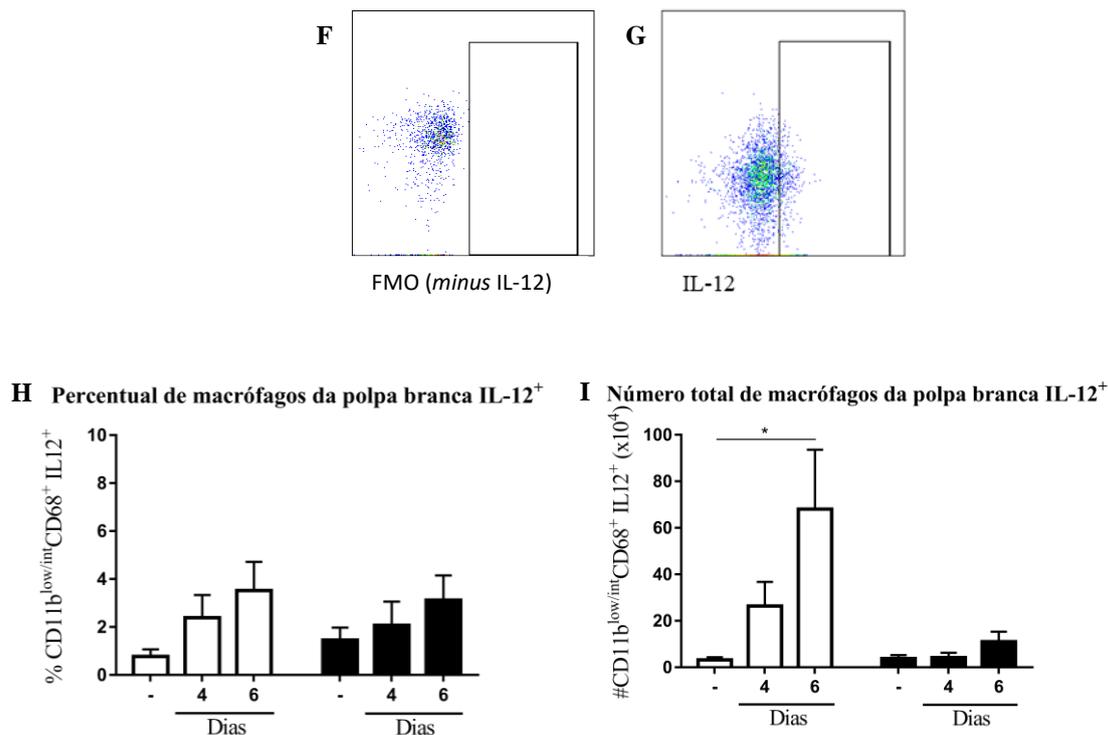
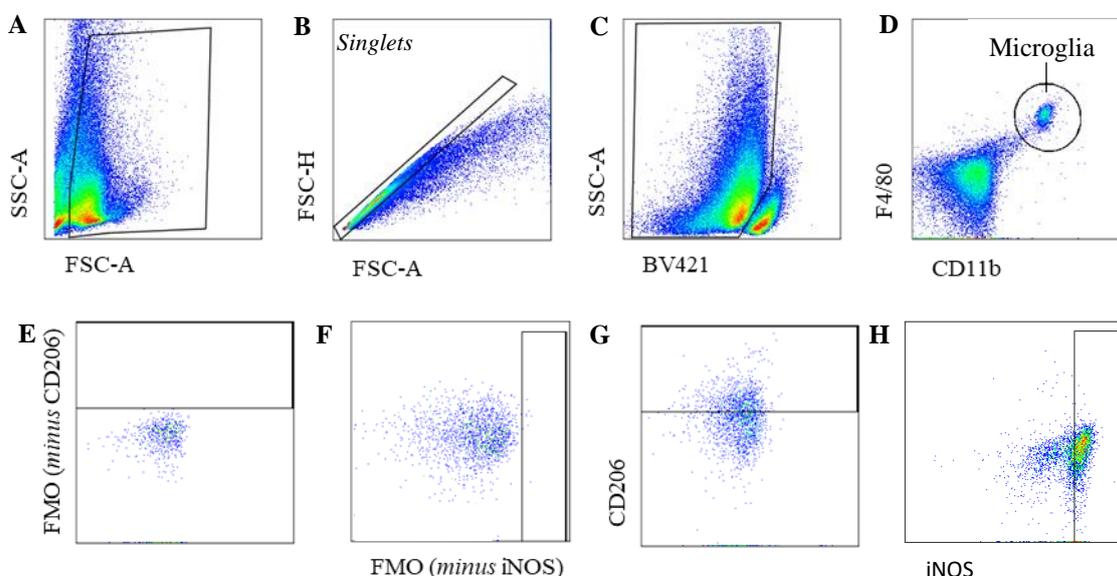


Figura 16. Análise da expressão de iNOS e IL-12 em macrófagos da polpa branca de animais BALB/c e C57BL/6 ao longo da infecção com *Plasmodium berghei* ANKA. Gráficos *dot plots* representativos da estratégia de *gate* utilizada para identificar macrófagos da polpa branca (A), controle negativo (FMO, minus iNOS) (B) e da marcação específica para iNOS (C). Percentual de macrófagos da polpa branca iNOS⁺ em relação ao total de macrófagos da polpa branca (D) e número total de macrófagos da polpa branca iNOS⁺ por baço (E), em diferentes tempos após infecção de camundongos BALB/c e C57BL/6. Gráficos *dot plots* representativos do controle negativo (FMO, minus IL-12) (F) e da marcação específica da citocina IL-12 (G). Percentual de macrófagos da polpa branca IL-12⁺ em relação aos macrófagos da polpa branca (H) e número total de macrófagos da polpa branca IL-12⁺ por baço (I), em diferentes tempos após infecção de camundongos BALB/c e C57BL/6. Grupos: Controle (-), 4 dias (4d) e 6 dias (6d) após infecção. Gráficos compilados de 3 experimentos independentes. N=12-18 animais/grupo. Análise estatística feita pelo teste *t* não pareado, sendo $P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,005$ (**), $P \leq 0,0005$ (***), $P \leq 0,0001$ (****).

6.8 Microglias de camundongos BALB/c infectados com *Plasmodium berghei* ANKA reduzem rapidamente a expressão da enzima iNOS

O perfil de polarização das micróglia foi avaliado de acordo com a expressão do receptor de manose (CD206) e iNOS (Figura 17A-H). Os resultados obtidos mostraram que a cinética de expressão do receptor de manose CD206 é semelhante em ambos os grupos de animais ao longo da infecção (Figura 17I). Ambas as linhagens de animais não infectados apresentaram cerca de 20% das micróglia expressando o receptor CD206. Até o 4º dia após infecção não foi observado diferenças na expressão de CD206. Apenas entre o 4º e 6º dia após infecção, houve um aumento significativo do percentual de micróglia expressando o receptor de manose, passando a ser expresso por quase 80% das micróglia.

Quando avaliado o valor percentual de micróglia expressando iNOS (Figura 17J), observamos que os animais BALB/c, apresentaram redução significativa na expressão desta enzima já no 4º dia após infecção. Essa redução foi ainda maior no 6º dia após infecção. Por outro lado, nos animais C57BL/6, a infecção não diminuiu, rapidamente, o percentual de micróglia expressando iNOS. O valor percentual de micróglia iNOS⁺ no 4º dia após infecção se manteve igual ao controle. A redução de micróglia iNOS⁺, nos animais C57BL/6 parasitados, foi observada apenas no 6º dia após-infecção.



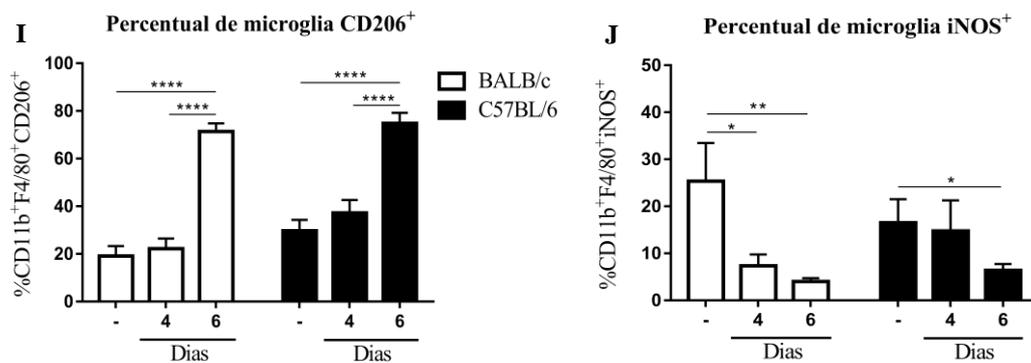


Figura 17. Análise da expressão de CD206 e iNOS em microglias de animais BALB/c e C57BL/6 ao longo da infecção com *Plasmodium berghei* ANKA. Gráficos *dot plots* representativos da estratégia utilizada para identificação das microglias utilizando os parâmetros de tamanho e granulosidade (A), seleção das células *singlets* (B), seleção das células viáveis (Live/Dead) (C), identificação da microglia pela expressão de F4/80 e CD11b (D), controle negativo (FMO, *minus* CD206 e iNOS) (E, F) e da marcação específica de CD206 e iNOS (G, H). Percentual de microglias que expressam receptor de manose CD206 (I) e iNOS (J) em diferentes tempos após infecção de camundongos BALB/c e C57BL/6. Grupos: Controle (-), 4 dias (4d) e 6 dias (6d) após infecção. Gráficos compilados de 2 experimentos independentes. N=8-12 animais/grupo. Análise estatística feita pelo teste *t* não pareado, sendo $P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,005$ (**), $P \leq 0,0005$ (***), $P \leq 0,0001$ (****).

6.9 Camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA apresentam níveis séricos elevados de TNF- α e IL-6 no 4º dia após infecção

Análise de citocinas presentes no soro revelou que os animais BALB/c apresentaram uma forte produção de IFN- γ no 4º dia, seguida por uma queda observada entre o 4º e 6º dia após infecção (Figura 18A). Embora em proporções menores, os animais C57BL/6 apresentaram uma cinética semelhante. A produção de TNF- α foi crescente ao longo da infecção nos camundongos resistentes, já os camundongos suscetíveis, apresentaram um pico dessas citocinas no 4º dia após infecção (tendo mais TNF- α que os animais resistentes) (Figura 18B). A produção de IL-6 (Figura 18C) ocorreu de forma análoga a TNF- α , embora em grandezas diferentes.

A citocina IL-10 pertence ao grupo das citocinas anti-inflamatórias, importante no controle de respostas inflamatórias. Os animais BALB/c apresentaram um aumento evidente dessa citocina no soro durante a infecção, sugerindo o desenvolvimento de maior capacidade regulatória.

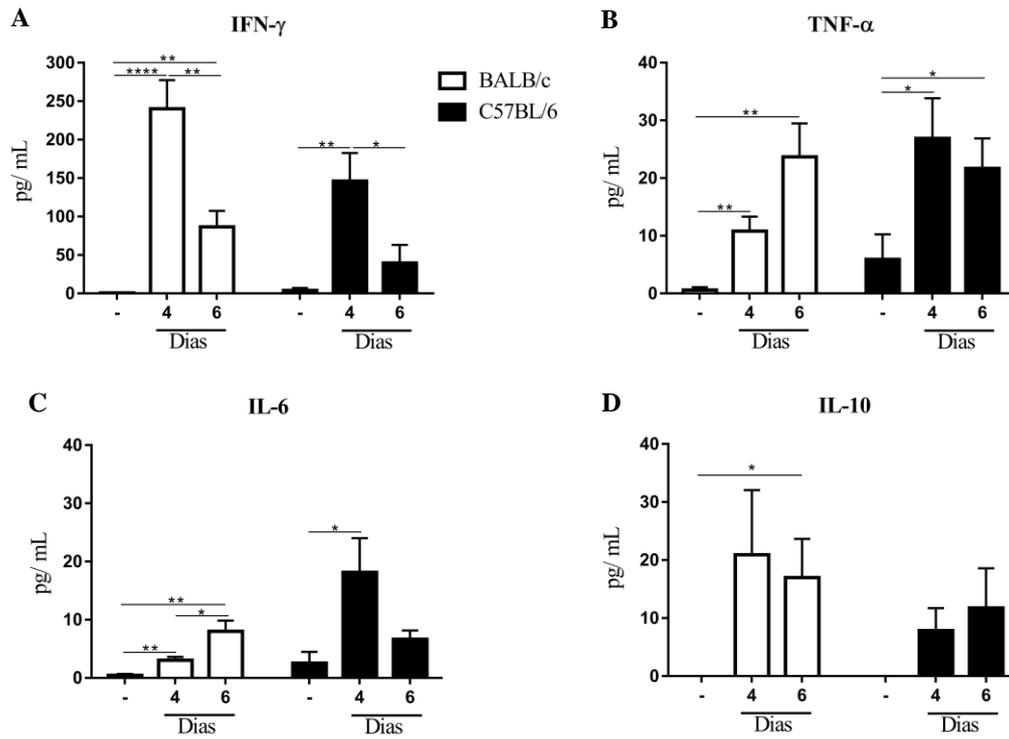


Figura 18. Análise do perfil de citocinas presentes no soro de animais infectados com *Plasmodium berghei* ANKA. Dosagem das citocinas IFN- γ (A), TNF- α (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) presentes no soro de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados ou não com *P. berghei* ANKA. Grupos: Controle (-), 4 dias (4d) e 6 dias (6d) após infecção. Gráficos compilados de 2 experimentos independentes. N=8-12 animais/grupo. Análise estatística feita pelo teste t não pareado, sendo $P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,005$ (**), $P \leq 0,0005$ (***), $P \leq 0,0001$ (****).

7 DISCUSSÃO

A MC é o resultado de uma resposta inflamatória sistêmica excessiva, envolvendo a produção de citocinas pró-inflamatórias e consequente ativação de células endoteliais, sequestro de eritrócitos parasitados e leucócitos, aumento da permeabilidade vascular e hemorragia cerebral (HORA et al., 2016; NISHANTH & SCHLÜTER, 2019). Portanto, o balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias pode determinar o curso e gravidade da infecção. No presente trabalho exploramos o papel das células da imunidade inata, sobretudo os macrófagos e sua plasticidade/polarização no desenvolvimento da MCE. Observamos que os neutrófilos, monócitos inflamatórios, macrófagos esplênicos e microglias de camundongos suscetíveis e resistentes à MCE responderam de forma diferenciada à infecção pelo *P. berghei* ANKA.

Fatores genéticos do hospedeiro tem importante papel no balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias, e na suscetibilidade e resistência à diferentes doenças. Camundongos C57BL/6 são resistentes a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* e *Leishmania major*, enquanto os animais BALB/c são suscetíveis (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002; ARKO-MENSAH et al., 2009). Na malária, no entanto, animais C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA desenvolvem MCE, ao contrário dos animais BALB/c parasitados (SHIBUI et al., 2009). Essa diferença entre a suscetibilidade e resistência à MCE entre as linhagens de animais mencionadas é decorrente do perfil da resposta imune orquestrada por eles. Os camundongos C57BL/6 são caracterizados por desenvolver forte resposta pró-inflamatória, do tipo Th1, em resposta a diferentes microrganismos, tornando-os capazes de controlar as infecções por *M. tuberculosis* e *L. major*. Porém, esse mesmo perfil de resposta imune pode desencadear as patologias associadas à MCE.

Em nosso estudo confirmamos dados prévios da literatura sobre a suscetibilidade e resistência à MCE das linhagens de camundongos C57BL/6 e BALB/c, respectivamente, após infecção com *P. berghei* ANKA (SHIBUI et al., 2009; MARTINS et al., 2013). Após inoculação intraperitoneal de 1×10^6 eritrócitos parasitados, os animais C57BL/6 desenvolveram sinais clínicos de MCE (hipotermia, perda de peso acentuada, paralisia e coma) e não resistiram à infecção por mais de 7 dias. Já a maioria dos animais BALB/c parasitados foram capazes de sobreviver por mais de 20 dias. De acordo com SCHMIDT et al. (2011), estes animais morrem decorrente de uma alta parasitemia e anemia. Variações na concentração do inóculo utilizado para infecção dos animais podem gerar

pequenas mudanças no tempo de desenvolvimento dos sinais clínicos da doença e morte dos animais parasitados (AMANI, R. et al., 1998; FAUCONNIER et al., 2012).

Diferente do observado por SHIBUI et al (2009), no qual os animais C57BL/6 apresentaram parasitemia maior que os animais BALB/c após infecção com *P. berghei* ANKA, nosso estudo demonstrou que ambas as linhagens de animais exibem o mesmo percentual de eritrócitos parasitados durante o curso da infecção, sugerindo que a parasitemia dos animais não está relacionada com o desenvolvimento da MCE.

A resposta imune inata representa a primeira linha de defesa e é essencial para a ativação da resposta imune adquirida (CAMPANELLA et al., 2008). Células mieloides, como neutrófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas são células do sistema imune inato importantes para uma resposta imune efetiva contra a maioria dos patógenos. Em humanos e em modelos experimentais murinos foi observado aumento no número de células mieloides no baço durante o estágio agudo da malária (PRAKASH et al., 2006; THUMA et al., 2011). A esplenomegalia é um dos principais sintomas associados a gravidade da malária (LEONI et al., 2015). Em paralelo ao aumento da celularidade do baço, já foi observado desorganização da microestrutura do baço de primatas não humanos infectados (ALVES et al., 2015). A avaliação do baço de camundongos C57BL/6 após infecção com *P. berghei* ANKA corrobora a hipertrofia deste órgão. No entanto, a análise comparativa entre os animais suscetíveis e resistentes revelou que, surpreendentemente, os animais BALB/c desenvolveram um quadro mais acentuado de esplenomegalia em relação aos animais C57BL/6 parasitados. Esse aumento na celularidade durante o curso da infecção (em ambos modelos experimentais) foi, em parte, pela expansão e recrutamento de novas células para o órgão.

KESWANI & BHATTACHARYYA (2013) mostraram que a infecção de camundongos suíços com *P. berghei* ANKA (suscetíveis à MCE) induz a apoptose de esplenócitos. Os autores sugerem que apoptose observada está relacionada com altos níveis de TNF- α e baixos níveis de TGF- β encontrados no soro dos animais parasitados. Corroborando com KESWANI & BHATTACHARYYA (2013), observamos maiores níveis de TNF- α no soro do nosso modelo experimental suscetível à MCE e ausência de progresso no número de esplenócitos, entre o 4^o e 6^o dia após infecção. A estagnação observada no número de esplenócitos, nos animais C57BL/6, pode estar relacionada com

um balanço entre apoptose, influxo e egresso de células neste órgão (LACERDA-QUEIROZ et al., 2017).

Os eventos imunes que acontecem no baço durante a infecção por *P. berghei* ANKA são fundamentais para a resistência ou suscetibilidade à MCE (CURFS et al., 1989; GORDON et al., 2015). O recrutamento de neutrófilos para o baço é importante para a eliminação dos parasitos. Os neutrófilos participam da fagocitose e são capazes de liberar ROS, impedindo o crescimento do parasito (AITKEN et al., 2018). De acordo com SENGUPTA et al. (2019), o recrutamento de neutrófilos para o baço é importante para o desenvolvimento de uma resposta eficiente contra o *Plasmodium* sp.. Apesar de sua função antiparasitária, diversos trabalhos associam os neutrófilos com o desenvolvimento de injúria pulmonar, hepática e até mesmo cerebral (PORCHERIE et al., 2011; ROCHA et al., 2016; SERCUNDES et al., 2016). Nossos dados revelaram um aumento significativo do número de neutrófilos (CD11b⁺Ly6C^{int}Ly6G⁺) no baço dos animais resistentes ao longo da infecção. Já nos animais suscetíveis, o recrutamento de neutrófilos foi transiente e seus números, no 6º dia após infecção, retornaram aos valores encontrados nos animais não infectados. Sabendo disso, montamos três diferentes, mas não excludentes, hipóteses para justificar a queda no número de neutrófilos no baço dos animais C57BL/6: (1º) os neutrófilos que chegaram ao baço dos animais parasitados estão morrendo devido ao ambiente altamente pró-inflamatório, (2º) podem estar migrando para outros órgãos como cérebro e pulmão, como já mencionado anteriormente, e (3º) a produção destas células na medula óssea pode estar comprometida. Para melhor compreensão do papel protetor ou imunopatogênico dos neutrófilos na MCE, alguns trabalhos realizaram sua depleção, mas seus resultados são contraditórios (DEY et al., 2012; SCHUMAK et al., 2015; SERCUNDES et al., 2016). A divergência nos resultados obtidos incide pelo uso de anticorpos inespecíficos para depleção, pela dose inadequada e/ou tratamento em momentos não propícios, sendo assim, mais estudos sobre o papel dos neutrófilos na MC devem ser realizados.

Além dos neutrófilos, os monócitos também são importantes células no controle parasitário por meio da fagocitose, apresentação de antígenos e produção de citocinas (ORTEGA-PAJARES & ROGERSON, 2018). Embora a secreção de citocinas pró-inflamatórias também contribua para acúmulo de eritrócitos parasitados, sobretudo, no cérebro. A análise da cinética de recrutamento dos monócitos inflamatórios (CD11b⁺Ly6C^{hi}Ly6G⁻), demonstrou que ambas as linhagens de animais apresentaram

aumento, embora em proporções diferentes, no número desta célula durante infecção. Trabalhos, como o de PAI et al. (2014), utilizando animais C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA, observaram aumento no número total de monócitos no cérebro dos animais no 7º dia após infecção. Sendo assim, mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, secretadas por monócitos deve ser controlada para que não haja consequências fatais ao organismo. Nesse sentido, SCHUMAK et al. (2015) mostrou que a depleção dos monócitos inflamatórios preveniu o desenvolvimento da MCE em animais C57BL/6 infectados. Além disso, essas células expressam receptores de quimiocina CCR2, responsável pelo seu recrutamento para o sítio de inflamação. Nos tecidos, como baço, os monócitos podem se diferenciar em células dendríticas e/ou macrófagos (ORTEGA-PAJARES & ROGERSON, 2018).

Em nosso trabalho caracterizamos os macrófagos da polpa vermelha (MPV) pela expressão das moléculas CD11b^{low/int} e F4/80⁺ (DAVIES et al., 2013; GORDON & PLÜDDEMANN, 2017) e os macrófagos da polpa branca (MPB) pela expressão de CD11b^{low/int} e CD68⁺ (DAVIES et al., 2013; GORDON & PLÜDDEMANN, 2017; SENGUPTA et al., 2019).

Os MPV apresentam papel importante na eliminação de eritrócitos parasitados e debris celulares (SENGUPTA et al., 2019) e liberam citocinas pró-inflamatórias do tipo 1 que auxiliam nesta função (KIM et al., 2012). Mostramos que os animais resistentes à MCE não apresentaram alteração no número total de MPV, enquanto animais suscetíveis à MCE exibiram redução desses macrófagos. Essas células, podem morrer após fagocitarem eritrócitos infectados, devido a presença da hemozoína. Por serem células residentes do baço, são capazes de se auto renovarem, contudo, de forma lenta. Assim, para manter o controle da infecção, MPV podem ser substituídos por macrófagos derivados de monócitos circulantes do sangue (BORGES DA SILVA et al., 2015). Também observamos que, já no 4º dia após infecção, nos animais BALB/c (resistente), houve um aumento no percentual de MPV expressando o receptor de manose CD206, marcador de macrófagos com perfil M2. Sugerindo que a polarização dos macrófagos para um perfil M2 pode estar relacionado com a resistência à MCE. De acordo com BESNARD et al. (2015), o tratamento de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA com IL-33 promove o aumento da expressão de marcadores fenotípicos associados ao perfil M2 em macrófagos esplênicos e estes animais tornam-se resistentes à MCE.

Em paralelo, constatamos uma redução no número total de MPV CD206⁺ no baço dos animais C57BL/6 (suscetível). Ressaltamos ainda que, apesar do número total de MPV reduzirem ao longo da infecção nos animais suscetíveis, o percentual e número total dos macrófagos expressando iNOS aumentaram quando comparados aos animais não infectados e resistentes, o que pode estar diretamente relacionado ao agravamento da doença. Em outras palavras, os MPV de camundongos BALB/c (resistentes) infectados apresentam maior perfil anti-inflamatório, enquanto os MPV dos camundongos C57BL/6, que ali restaram, apresentam maior perfil pró-inflamatório.

Mostramos ainda que ocorreu um aumento no número total de MPB nos animais resistentes à MCE e nenhuma alteração nos animais suscetíveis. Esse aumento pode ter ocorrido pela proliferação desses macrófagos e/ou influxo e diferenciação a partir de monócitos. Diferente do observado com os MPV, os MPB, de ambas as linhagens, apresentaram redução no percentual e número total de células CD206⁺. Interessantemente, MPB IL12⁺ e iNOS⁺ aumentaram em número total ao longo da infecção em animais BALB/c. Como evidenciado por FENG et al. (2017), células CD68⁺ esplênicas de pacientes acometidos por trombocitopenia, são as capazes de expressar altos níveis de iNOS, levando ao agravamento da doença.

Nosso trabalho sugere que, apesar dos animais BALB/c apresentarem esplenomegalia mais acentuada, eles exibiram um melhor balanço entre o perfil M1/M2 dos macrófagos, quando comparado aos animais C57BL/6. Em outras palavras, os animais BALB/c apresentaram um número de macrófagos M2 mais evidente, fazendo controle do perfil inflamatório dos macrófagos M1, algo que não foi observado nos animais C57BL/6.

Apesar de apresentarmos dados sólidos a respeito da polarização dos macrófagos esplênicos dos animais, JABLONSKI et al. (2015) mostrou que a utilização dos marcadores CD38 e Egr 2 são mais evidentes para identificar macrófagos M1 e M2, respectivamente. Com isso, futuras análises utilizando novos marcadores serão realizadas.

Microglias são células imunes residentes do sistema nervoso central, com alta plasticidade funcional, podendo atuar de forma neuroprotetora ou neurotóxica. A distinção dos macrófagos de outras APCs utilizando parâmetros morfológicos não é precisa devido às suas semelhanças. A maneira mais segura para realizar tal distinção é

através da análise da expressão de moléculas de superfície compartilhadas e específicas (BROWN & WITTWER, 2000).

Alterações na BHE permite o acesso de mediadores inflamatórios presentes na circulação ao sistema nervoso central (SONNEVILLE et al., 2013). Por outro lado, PAIS & CHATTERJEE (2005) mostraram que macrófagos residentes são ativados antes da inflamação cerebral característica da MCE, através do aumento de IFN, TNF ou proteínas parasitárias. Ao avaliarmos marcadores associados a polarização em microglias de animais infectados, ou não, com *P. berghei* ANKA notamos que os animais apresentaram cinética de expressão do receptor de manose (CD206) semelhante e nenhuma diferença significativa na expressão desta molécula entre as linhagens. A expressão de moléculas associadas ao perfil M2, pode ser observada associada com um papel neuroprotetor no trabalho de PARK et al., (2016) e MA et al. (2019). No entanto, de acordo com nossos resultados, não encontramos associação entre a expressão do receptor de manose e proteção ao desenvolvimento da MCE.

Outro marcador associado a polarização avaliado, desta vez para o perfil M1, foi a expressão de iNOS. Em ambas as linhagens de animais encontramos redução na expressão de iNOS pelas microglias. No entanto nos animais resistentes à MCE, foi possível observar redução já no 4º dia após infecção. Em contra partida, nos animais que desenvolvem MCE, a redução ocorreu de forma tardia (6º dia após infecção). Acreditamos que essa redução tardia da expressão de iNOS nos animais C57BL/6 seja favorável ao desenvolvimento de MCE, visto que iNOS já foi associado aos danos causados durante isquemia cerebral (ZHOU et al., 2013). Além disso, diferentes trabalhos usando modelos murinos para o estudo da esclerose lateral amiotrófica e doença de Huntington mostraram que a elevada secreção de citocinas e mediadores pró-inflamatórios pelas microglias contribuem para a progressão da doença (HSIAO et al., 2014; LIAO et al., 2014).

No trabalho de SARKAR et al. (2017), utilizando animais camundongos suíços infectados com *P. berghei* ANKA, foi possível observar aumento de marcadores pró-inflamatórios (TNF- α , IFN- γ , IL-17) e diminuição de marcadores anti-inflamatórios (IL-10 e FoxP3) no córtex e cerebelo de animais infectados. Além disso, também foi observado aumento da expressão do marcador de ativação CD11c nas microglias dos animais.

Diferentes trabalhos mostram uma produção elevada de citocinas pró-inflamatórias durante infecções pelo *P. falciparum* e *P. vivax* (WALTHER et al., 2006; ANDRADE et al., 2010), e sugerem que o desenvolvimento de complicações na malária pode estar relacionado a maior concentração destas citocinas no soro, por induzirem uma cascata neuroinflamatória (QUIN et al., 2007). Ambos animais (resistentes e suscetíveis) apresentaram altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, contudo, a cinética das citocinas foi diferenciada entre os animais. Mostramos que camundongos C57BL/6 apresentaram alta concentração das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 em momentos anteriores (4º dia após infecção) ao surgimento dos sintomas da MCE, enquanto que, nos animais BALB/c esse aumento foi observado apenas no 6º dia após infecção. Esta diferença na cinética pode estar relacionada ao desenvolvimento da MCE.

Já foi relatado o papel do IFN- γ no desenvolvimento da MC em humanos (AMANI, V. et al., 2000). Nos animais resistentes, observamos maior produção de IFN- γ no 4º dia após infecção quando comparado aos animais suscetíveis. Por isso acreditamos que esta citocina, *per se*, não está associada ao desenvolvimento da MCE, sendo necessário o envolvimento de outras citocinas.

Ao mesmo tempo, observamos que a IL-10, citocina reguladora, também encontra-se elevada no 4º dia após infecção nos animais resistentes à MCE. Sugerindo que esta citocina seja crucial para o controle da resposta pró-inflamatória. O papel que IL-10 desempenha, controlando/prevenindo a imunopatogênese da MC já foi encontrado em outros trabalhos (KOSSODO et al., 1997; SCHMIDT et al., 2018). Assim, nossos dados sugerem que o desenvolvimento da MC está diretamente relacionado a uma não harmonia entre a resposta do tipo 1 e 2.

8 CONCLUSÃO

Nossos resultados de sobrevivência, peso, temperatura e disfunção da barreira hematoencefálica (BHE) estão em consonância com os dados já descritos na literatura que relatam a resistência e susceptibilidade ao desenvolvimento de MCE dos modelos BALB/c e C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA, respectivamente. Verificamos, entretanto, que o percentual de eritrócitos parasitados aumenta ao longo da infecção de forma semelhante entre as linhagens de camundongos, comprovando que a parasitemia não está diretamente relacionada com o desenvolvimento da MCE.

A análise dos diferentes modelos experimentais também revelou que a esplenomegalia, o maior influxo de neutrófilos e monócitos para o baço e níveis séricos elevados de IFN- γ não são fatores associados com o desenvolvimento de MCE. Esses dados também sugerem que a associação da esplenomegalia, observada em pacientes *post mortem*, e o desenvolvimento da malária grave em humanos não deve ser praticada.

Já a avaliação do perfil fenotípico de subpopulações de macrófagos esplênicos enriqueceu o estudo ao sugerir uma correlação entre a polarização imediata dos macrófagos da polpa vermelha (MPV) para o perfil M2 e a resistência à MCE. Os MPV de camundongos BALB/c (resistentes) ampliam a expressão do receptor de manose CD206, marcador fenotípico de macrófagos com perfil anti-inflamatório (M2), em momentos iniciais da infecção por *P. berghei* ANKA. Por outro lado, nos animais C57BL/6 (suscetíveis) parasitados, evidenciamos uma redução no número total de MPV e de MPV CD206⁺ (células com perfil anti-inflamatório ou M2), e ao mesmo tempo aumento de MPV iNOS⁺ (células com perfil pró-inflamatório ou M1).

Averiguamos ainda que a subpopulação de macrófagos esplênicos da polpa branca (MPB) responde à infecção reduzindo a expressão do receptor de manose CD206, em ambos os modelos experimentais estudados. Mas que, apenas nos camundongos BALB/c o número total de MPB iNOS⁺ e MPB IL-12⁺ ampliaram ao longo da infecção pelo *P. berghei* ANKA, denotando aumento do perfil pró-inflamatório ou M1 dessas células nos animais resistentes.

Ao explorarmos o cérebro desses animais, verificamos que a microglia dos animais BALB/c e C57BL/6 respondem a infecção aumentando a expressão do receptor de manose CD206 igualmente, entretanto, a expressão de iNOS pelas microglias dos animais BALB/c diminui antes de qualquer sinal clínico de MCE. Já a redução no percentual de microglias iNOS⁺ nos animais C57BL/6 é observado mais tardiamente, paralelamente a quebra da BHE, ao desenvolvimento de sinais clínicos da MCE e morte desses animais.

Em resumo, nossos dados sugerem que apesar dos camundongos BALB/c desenvolverem uma forte resposta imune ao parasito, o animal é favorecido pelo desencadeamento de um perfil anti-inflamatório de resposta, como a ativação de macrófagos do tipo M2 e produção de citocinas regulatórias em momentos iniciais da infecção, o que gera um melhor balanço entre o perfil pró e anti-inflamatório. Enquanto que os animais suscetíveis ao desenvolvimento da MCE respondem à infecção montando uma resposta inicial (observada no 4^o dia após infecção) com perfil pró-inflamatório, evidenciado através do aumento no número de macrófagos com perfil M1 e pela produção de citocinas como TNF e IL-6. Nesses animais, a tentativa de controle da resposta imune pró-inflamatória exacerbada é observada apenas em momentos tardios da infecção, quando a forma grave da doença já está estabelecida.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

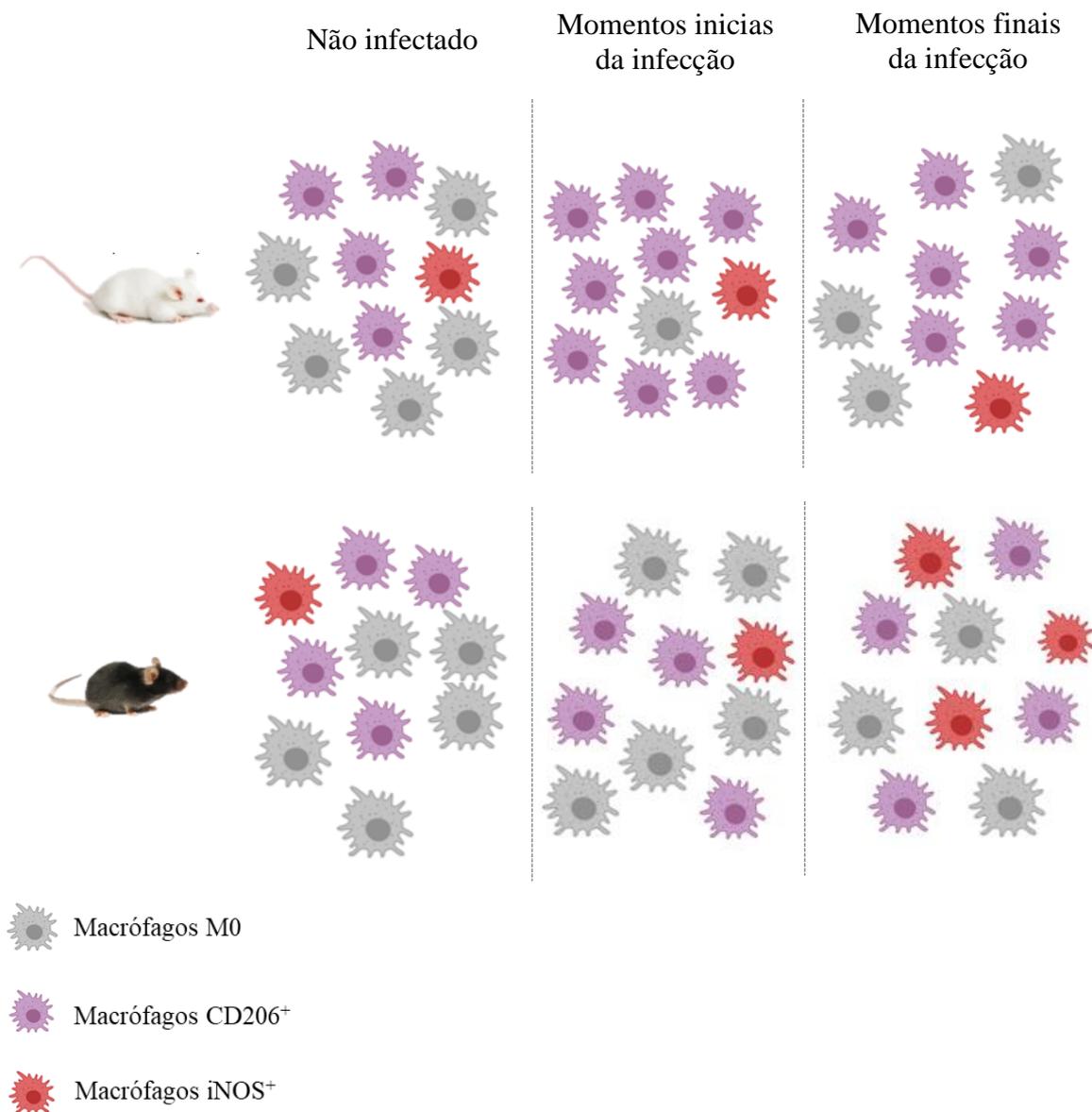


Figura 19. Perfil de polarização de macrófagos esplênicos de animais infectados com *Plasmodium berghei* ANKA. Quando não infectados, os animais BALB/c e C57BL/6 apresentam o mesmo balanço entre os macrófagos da pulpa vermelha iNOS⁺ (M1) e CD206⁺ (M2). Em momentos iniciais a infecção, apenas os animais BALB/c apresentam mudança dos macrófagos esplênicos, ocorrendo a polarização para o perfil M2, ao passo que não foi observada mudanças nas populações de macrófagos esplênicos nos animais C57BL/6. Em contra partida, em momentos tardios da infecção, apenas os animais C57BL/6 apresentaram aumento dos macrófagos M1, algo não visto nos animais BALB/c, o que pode estar relacionado ao desenvolvimento da malária cerebral experimental.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANTES, P.; SILVEIRA, H. Alterações climáticas na Europa: efeito nas doenças parasitárias humanas. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, v. 27, n. 2, p. 71–86, 2009.
- ADAMS, J. H.; MUELLER, I. The biology of plasmodium vivax. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 7, n. 9, p. 1–12, 2017.
- AITKEN, E. H.; ALEMU, A.; ROGERSON, S. J. Neutrophils and Malaria. *Frontiers in immunology*, v. 9, n. December, 2018.
- AJAMI, B. *et al.* Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nature neuroscience*, v. 10, n. 12, p. 1538–1543, 2007.
- ALVES, F. A. *et al.* Splenic architecture disruption and parasite-induced splenocyte activation and anergy in Plasmodium falciparum -infected Saimiri sciureus monkeys. *Malaria Journal*, p. 1–11, 2015.
- AMANI, R. *et al.* Cloned Lines of Plasmodium berghei ANKA Differ in Their Abilities To Induce Experimental Cerebral Malaria. *American Society for Microbiology*, v. 66, n. 9, p. 4093–4099, 1998.
- AMANI, V. *et al.* Involvement of IFN- γ receptor-mediated signaling in pathology and anti-malarial immunity induced by Plasmodium berghei infection. *European Journal of Immunology*, v. 30, n. 6, p. 1646–1655, 2000.
- AMINO, R. *et al.* Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nature Medicine*, v. 12, n. 2, p. 1–5, 2006.
- AMODU, O. K. *et al.* Intraleucocytic malaria pigment and clinical severity of malaria in children. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 92, n. 1, p. 54–56, 1998.
- ANDRADE, B. B. *et al.* Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malaria Journal*, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2010.
- ANGRISANO, F. *et al.* Malaria parasite colonisation of the mosquito midgut - Placing the Plasmodium ookinete centre stage. *International Journal for Parasitology*, v. 42, n. 6, p. 519–527, 2012.
- ANTINORI, S. *et al.* Biology of f Human Malaria Plasmodia Including Plasmodium Knowlesi. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, v. 4, n. 1, 2012.
- ARKO-MENSAH, J. *et al.* Resistance to mycobacterial infection: A pattern of early immune responses leads to a better control of pulmonary infection in C57BL / 6 compared with BALB / c mice. *Vaccine*, v. 27, n. 52, p. 7418–7427, 2009.
- ASHLEY, E. A.; PYAE PHYO, A.; WOODROW, C. J. Malaria. *The Lancet*, v. 391, n. 10130, p. 1608–1621, 2018.
- BAUER, P. R. *et al.* Regulation of endothelial cell adhesion molecule expression in an experimental model of Cerebral Malaria. *Microcirculation*, p. 463–470, 2002.

- BELGIOVINE, C. *et al.* Tumor-associated macrophages and anti-tumor therapies: complex links. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016.
- BELNOUE, E *et al.* Control of pathogenic CD8 + T cell migration to the brain by IFN- γ during experimental cerebral malaria. *Parasite immunology*, v. 30, n. 10, p. 544–553, 2008.
- BELNOUE, ELODIE *et al.* On the pathogenic role of brain-sequestered $\alpha\beta$ CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. *The Journal of Immunology*, v. 169, n. 11, 2002.
- BENEDETTO, P. DI *et al.* Macrophages with regulatory functions, a possible new therapeutic perspective in autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, v. 18, n. 10, p. 102369, 2019.
- BERNABEU, M.; SMITH, J. D. EPCR and malaria severity: the center of a perfect storm. *Trends in Parasitology*, v. 33, n. 4, p. 295–308, 2018.
- BESCHIN, A.; BAETSELIER, P. DE; GINDERACHTER, J. A. VAN. Contribution of myeloid cell subsets to liver fibrosis in parasite. *Journal of Pathology*, p. 186–197, 2012.
- BESNARD, A. G. *et al.* IL-33-Mediated Protection against Experimental Cerebral Malaria Is Linked to Induction of Type 2 Innate Lymphoid Cells, M2 Macrophages and Regulatory T Cells. *PLoS Pathogens*, v. 11, n. 2, p. 1–21, 2015.
- BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology*, v. 11, n. 10, p. 889–896, 2010.
- BORGES DA SILVA, H.; REGINA, M.; LIMA, D. I. Splenic macrophage subsets and their function during blood-borne infections. *Frontiers in Immunology*, v. 6, n. September, 2015.
- BRASIL, P. *et al.* Articles Outbreak of human malaria caused by Plasmodium simium in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *The Lancet Global Health*, v. 5, n. 10, p. 1038–1040, 2017.
- BRINKMANN, V. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*, v. 303, n. March, p. 1532–1536, 2004.
- BROWN, H. *et al.* Evidence of blood – brain barrier dysfunction in human cerebral malaria. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, p. 331–340, 1999.
- BROWN, M. B. *et al.* M1 / M2 macrophage polarity in normal and complicated pregnancy. *Frontiers in Immunology*, v. 5, n. November, p. 1–10, 2014.
- BROWN, M.; WITTEWER, C. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clinical chemistry*, v. 46, n. 8, p. 1221–1229, 2000.
- BRUNEEL, F. Human cerebral malaria: 2019 mini review. *Revue Neurologique*, p. 6–11, 2019.
- CABRALES, P. *et al.* Cerebral tissue oxygenation impairment during experimental cerebral malaria. *Virulence*, v. 4, n. 8, p. 686–697, 2013.
- CAMINADE, C. *et al.* Impact of climate change on global malaria distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 111, n. 9, p. 3286–3291, 2014.

- CAMPANELLA, G. S. V *et al.* Chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9 and CXCL10 are required for the development of murine cerebral malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 12, p. 4814–4819, 2008.
- CARLOS, B. C. *et al.* A comprehensive analysis of malaria transmission in Brazil. *Pathogens and Global Health*, v. 113, n. 1, p. 1–13, 2019.
- CARROLO, M. *et al.* Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection. *Nature Medicine*, v. 9, n. 11, p. 1363–1369, 2003.
- CHAKRAVARTY, S. *et al.* CD8 + T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. *Nature Medicine*, v. 13, n. 9, p. 1035–1041, 2007.
- CHOTIVANICH, K. *et al.* Central Role of the Spleen in Malaria Parasite Clearance. *Journal of Infectious Diseases*, v. 185, n. 10, p. 1538–1541, 2002.
- CLARK, I. A.; COWDEN, W. B. *The pathophysiology of falciparum malaria*. [S.l.: s.n.], 2003. v. 99.
- COBAN, C. *et al.* Tissue-specific immunopathology during malaria infection. *Nature Publishing Group*, 2018.
- COLE, S. L. *et al.* M1-like monocytes are a major immunological determinant of severity in previously healthy adults with life-threatening influenza. *JCI insight*, v. 2, n. 7, p. 1–19, 2017.
- CORREALE, J. The role of microglial activation in disease progression. *Multiple Sclerosis Journal*, v. 20, n. 10, p. 1288–1295, 2014.
- COWMAN, A. F. *et al.* Malaria: Biology and Disease. *Cell*, v. 167, n. 3, p. 610–624, 2016.
- CUNNINGTON, A J *et al.* Malaria impairs resistance to Salmonella through heme- and heme oxygenase-dependent dysfunctional granulocyte mobilization. *Nature Medicine*, v. 18, n. 1, p. 120–127, 2012.
- CUNNINGTON, AUBREY J *et al.* Prolonged Neutrophil Dysfunction after Plasmodium falciparum Malaria Is Related to Hemolysis and Heme Oxygenase-1 Induction. *The Journal of Immunology*, v. 189, n. 11, 2012.
- CURFS, J. H. A. J. *et al.* Immunological aspects of cerebral lesions in murine malaria. *Clinical & experimental immunology*, v. 75, n. 1, p. 136–140, 1989.
- DA FONSECA, A. C. C. *et al.* The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. *Frontiers in cellular neuroscience*, v. 8, n. November, p. 1–13, 2014.
- DANEMAN, R.; PRAT, A. The Blood – Brain Barrier. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 7, n. 1, p. 1–24, 2015.
- DAVIES, L. C. *et al.* Tissue-resident macrophages. *Nature Immunology*, v. 14, n. 10, 2013.
- DAVIS, M. J. *et al.* Macrophage M1 / M2 Polarization Dynamically Adapts to Changes in Cytokine Microenvironments in Cryptococcus neoformans Infection. *MBio*, v. 4, n. 3, p. 1–10, 2013.

- DE SOUSA, L. P. *et al.* Long-term effect of uncomplicated Plasmodium berghei ANKA malaria on memory and anxiety-like behaviour in C57BL/6 mice. *Parasites and Vectors*, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2018.
- DE SOUZA, J.B. *et al.* Cerebral malaria: Why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. *Parasitology*, v. 137, n. 5, p. 755–772, 2010.
- DEMEURE, C. E. *et al.* Anopheles Mosquito Bites Activate Cutaneous Mast Cells Leading to a Local Inflammatory Response and Lymph Node Hyperplasia . *The Journal of Immunology*, v. 174, n. 7, p. 3932–3940, 2005.
- DEY, S. *et al.* Impact of Intravascular Hemolysis in Malaria on Liver Dysfunction. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 32, p. 26630–26646, 2012.
- DING, Y. *et al.* The Plasmodium Circumsporozoite Protein, a Novel NF- κ B Inhibitor , Suppresses the Growth of SW480. *Pathology & Oncology Research*, v. 18, n. 4, p. 895–902, 2012.
- EDWARDS, J. P. *et al.* Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *Journal of leukocyte biology*, v. 80, n. 6, p. 1298–1307, 2006.
- EMILE, G.; GRAU, R.; CRAIG, A. G. Cerebral malaria pathogenesis: revisiting parasite and host contributions. *Future microbiology*, v. 7, n. 2, p. 291–302, 2012.
- ENGWERDA, C. *et al.* Experimental Models of Cerebral Malaria. *Immunology and immunopathogenesis of malaria*, v. 1, p. 103–143, 2005.
- FAUCONNIER, M. *et al.* IL-12R β 2 Is Essential for the Development of Experimental Cerebral Malaria. *The Journal of Immunology*, v. 188, n. 4, p. 1905–1914, 2012.
- FEINTUCH, C. M. *et al.* Activated Neutrophils Are Associated with Pediatric Cerebral Malaria Vasculopathy in Malawian Children. *MBio*, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2016.
- FENG, Q. *et al.* High-dose dexamethasone or all-trans-retinoic acid restores the balance of macrophages towards M2 in immune thrombocytopenia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 15, p. 1845–1858, 2017.
- FERIOTTI, C. *et al.* Mannosyl-Recognizing Receptors Induce an M1-Like Phenotype in Macrophages of Susceptible Mice but an M2-Like Phenotype in Mice Resistant to a Fungal Infection. *PLoS ONE*, v. 8, n. 1, 2013.
- FERREIRA, M. U.; CASTRO, M. C. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malaria Journal*, v. 15, n. 1, p. 1–18, 2016.
- FRANKE-FAYARD, B. *et al.* A Plasmodium berghei reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 137, n. 1, p. 23–33, 2004.
- FREVERT, U. *et al.* Nomadic or sessile: Can Kupffer cells function as portals for malaria sporozoites to the liver? *Cellular Microbiology*, v. 8, n. 10, p. 1537–1546, 2006.
- FREVERT, U.; NACER, A. Fatal cerebral malaria : a venous efflux problem. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 4, n. November, p. 1–7, 2014.
- FU, R. *et al.* Phagocytosis of Microglia in the Central Nervous System Diseases. *Molecular neurobiology*, v. 49, n. 3, p. 1422–1434, 2014.

- GAZZINELLI, R. T. *et al.* Innate sensing of malaria parasites. *Nature Reviews Immunology*, v. 14, n. 11, p. 744–757, 2014.
- GHAZANFARI, N.; MUELLER, S. N.; HEATH, W. R. Cerebral Malaria in Mouse and Man. *Frontiers in Immunology*, v. 9, n. September, p. 1–11, 2018.
- GORDON, E. B. *et al.* Inhibiting the Mammalian Target of Rapamycin Blocks the Development of Experimental Cerebral Malaria. *MBio*, v. 6, n. 3, p. 1–17, 2015.
- GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative Activation of Macrophages : Mechanism and Functions. *Immunity*, v. 32, n. 5, p. 593–604, 2010.
- GORDON, S.; PLÜDDEMANN, A. Tissue macrophages: heterogeneity and functions. *BMC biology*, v. 15, n. 1, p. 53, 2017.
- GORDON, S.; PLÜDDEMANN, A.; MARTINEZ, F. Macrophage heterogeneity in tissues : phenotypic diversity and functions. *Immunological reviews*, v. 262, n. 1, p. 36–55, 2014.
- GRAMAGLIA, I. *et al.* A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria : sequestration , inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. v. 22, n. 11, 2006.
- HAFALLA, J. C.; SILVIE, O.; MATUSCHEWSKI, K. Cell biology and immunology of malaria. *Immunological Reviews*, v. 240, n. 1, p. 297–316, 2011.
- HANDAYANI, S. *et al.* High deformability of Plasmodium vivax-infected red blood cells under microfluidic conditions. *The Journal of infectious diseases*, v. 199, n. 3, p. 445–450, 2009.
- HANSEN, D. S. *et al.* NK cells stimulate recruitment of CXCR3+ T cells to the brain during Plasmodium berghei-mediated cerebral malaria. *The Journal of Immunology*, v. 178, n. 9, p. 5779–5788, 2007.
- HEINSBROEK, S. E. M.; GORDON, S. The role of macrophages in inflammatory bowel diseases. *Expert reviews in molecular medicine*, v. 11, n. May, p. 1–19, 2009.
- HIGGINS, S. J.; KAIN, K. C.; LILES, W. C. Immunopathogenesis of falciparum malaria: implications for adjunctive therapy in the management of severe and cerebral malaria. *Expert review of anti-infective therapy*, v. 9, n. 9, p. 803–819, 2011.
- HOLT, P. G.; JONES, C. A. The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy*, v. 55, n. 8, p. 688–697, 2000.
- HORA, R. *et al.* Cerebral malaria – clinical manifestations and pathogenesis. *Metabolic brain disease*, v. 31, n. 2, p. 225–237, 2016.
- HSIAO, H. *et al.* Inhibition of soluble tumor necrosis factor is therapeutic in Huntington ' s disease. *Human Molecular Genetics*, v. 23, n. 16, p. 4328–4344, 2014.
- HUANG, Z. *et al.* Mycobacterium tuberculosis -Induced Polarization of Human Macrophage Orchestrates the Formation and Development of Tuberculous Granulomas In Vitro. *PLoS ONE*, v. 10, n. 6, 2015.
- IDRO, R. *et al.* Cerebral Malaria: mechanisms of brain injury and strategies for improved neurocognitive outcome. *Pediatric research*, v. 68, n. 4, p. 267–274, 2010.

- IHEKWEREME, C. P.; ESIMONE, C. O.; NWANEGBO, E. C. Hemozoin inhibition and control of clinical malaria. *Advances in Pharmacological Sciences*, v. 2014, 2014.
- IMWONG, M. *et al.* Asymptomatic Natural Human Infections With the Simian Malaria Parasites *Plasmodium cynomolgi* and *Plasmodium knowlesi*. *The Journal of infectious diseases*, v. 219, n. Figure 1, p. 695–702, 2019.
- ISHINO, T.; CHINZEI, Y.; YUDA, M. A *Plasmodium* sporozoite protein with a membrane attack complex domain is required for breaching the liver sinusoidal cell layer prior to hepatocyte infection. *Cellular Microbiology*, v. 7, p. 199–208, 2005.
- JABLONSKI, K. A. *et al.* Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 10, n. 12, 2015.
- JARAMILLO, M. *et al.* Hemozoin-Inducible Proinflammatory Events In Vivo: Potential Role in Malaria Infection. *The Journal of Immunology*, v. 172, n. 5, p. 3101–3110, 2004.
- JOHN, C. C. *et al.* Cerebral Malaria in children is associated with long-term cognitive impairment. *Bone*, v. 122, n. 1, p. 92–99, 2008.
- JOICE, R. *et al.* Evidence for spleen dysfunction in malaria-HIV co-infection in a subset of pediatric patients. *Modern Pathology*, v. 29, n. 4, p. 381–390, 2016.
- JOICE, R. *et al.* *Plasmodium falciparum* transmission stages accumulate in the human bone marrow. *Science Translational Medicine*, v. 6, n. 244, 2014.
- KALKMAN, H. O.; FEUERBACH, D. Antidepressant therapies inhibit inflammation and microglial M1- polarization. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 163, p. 82–93, 2016.
- KAMBAYASHI, T.; LAUFER, T. M. Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? *Nature Immunology*, v. 14, n. November, 2014.
- KESWANI, T.; BHATTACHARYYA, A. Splenocyte apoptosis in *Plasmodium berghei* ANKA infection: possible role of TNF- α and TGF- β . *Parasite immunology*, v. 35, n. August 2012, p. 73–90, 2013.
- KHAN, Z. M.; VANDERBERG, J. P. Specific inflammatory cell infiltration of hepatic schizonts in BALB / c mice immunized with attenuated *Plasmodium yoelii* sporozoites. *International Immunology*, v. 4, n. 7, p. 711–718, 1992.
- KHO, S. *et al.* Circulating Neutrophil Extracellular Traps and Neutrophil Activation Are Increased in Proportion to Disease Severity in Human Malaria. *Journal of Infectious Diseases*, v. 219, n. 12, p. 1994–2004, 2018.
- KIM, C. C. *et al.* Splenic Red Pulp Macrophages Produce Type I Interferons as Early Sentinels of Malaria Infection but Are Dispensable for Control. *PLoS ONE*, v. 7, n. 10, p. 1–12, 2012.
- KLOTZ, C.; FREVERT, U. *Plasmodium yoelii* sporozoites modulate cytokine profile and induce apoptosis in murine Kupffer cells. *International Journal for Parasitology*, v. 38, n. 14, p. 1639–1650, 2008.
- KNACKSTEDT, S. L. *et al.* Neutrophil extracellular traps drive inflammatory pathogenesis in malaria. *Science Immunology*, v. 4, n. 40, p. 1–18, 2019.

- KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 13, n. 3, p. 159–175, 2013.
- KOSSODO, S. DE; GRAU, G. E. Profiles of cytokine production in relation with susceptibility to cerebral malaria. *Journal of Immunology*, v. 151, n. 9, p. 4811–4820, 1993.
- KOSSODO, S. *et al.* Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria. *Immunology*, v. 91, n. 4, p. 536–540, 1997.
- LACERDA-QUEIROZ, N. *et al.* Mechanism of splenic cell death and host mortality in a *Plasmodium yoelii* malaria model. *Scientific Reports*, n. August, p. 1–12, 2017.
- LAMAGNA, C.; AURRAND-LIONS, M.; IMHOF, B. A. Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis. *Journal of leukocyte biology*, v. 80, n. 4, p. 705–713, 2006.
- LEONI, S. *et al.* The hyper-reactive malarial splenomegaly: a systematic review of the literature. *Malaria journal*, v. 14, n. 1, p. 185, 2015.
- LIAO, B. *et al.* Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Experimental neurology*, v. 237, n. 1, p. 147–152, 2014.
- LIEHL, P. *et al.* Host-cell sensors for *Plasmodium* activate innate immunity against liver-stage infection. *Nature Medicine*, v. 20, n. 1, p. 47–53, 2014.
- LIN, C. *et al.* Monocytes and macrophages in malaria : protection or pathology ? *Trends in Parasitology*, v. 29, n. 1, p. 26–34, 2013.
- LINDNER, S. E.; MILLER, J. L.; KAPPE, S. H. I. Malaria Parasite Pre-erythrocytic Infection: Preparation Meets Opportunity. *Cell Microbiology*, v. 14, n. 3, p. 316–324, 2012.
- LYKE, K. E. *et al.* Association of intraleukocytic *Plasmodium falciparum* malaria pigment with disease severity, clinical manifestations, and prognosis in severe malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 69, n. 3, p. 253–259, 2003.
- MA, K. *et al.* Toll-Like Receptor 2 – Mediated Autophagy Promotes Microglial Cell Death by Modulating the Microglial M1 / M2 Phenotype. *Inflammation*, p. 1–11, 2019.
- MA, Y. *et al.* The biphasic function of microglia in ischemic stroke. *Progress in Neurobiology*, v. 157, p. 247–272, 2017.
- MAC-DANIEL, L. *et al.* Local Immune Response to Injection of *Plasmodium* Sporozoites into the Skin. *The Journal of Immunology*, v. 193, n. 3, p. 1246–1257, 2014.
- MANTOVANI, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*, v. 25, n. 12, 2004.
- MANTOVANI, A.; CASSATELLA, M. A.; COSTANTINI, C. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Publishing Group*, v. 11, n. 8, p. 519–531, 2011.
- MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation : time for reassessment. *F1000prime reports*, v. 6, n. March, p. 1–13, 2014.

- MARTINS, Y. C. *et al.* Slow and continuous delivery of a low dose of nimodipine improves survival and electrocardiogram parameters in rescue therapy of mice with experimental cerebral malaria. *Malaria Journal*, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2013.
- MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. *Nature Reviews Immunology*, v. 5, n. August, p. 606–616, 2005.
- MIGLIACCIO, G. *et al.* Human Embryonic Hemopoiesis. *The Journal of clinical investigation*, v. 78, n. 1, p. 51–60, 1986.
- MILLER, J. L. *et al.* Interferon-Mediated Innate Immune Responses against Malaria Parasite Liver Stages. *Cell Reports*, v. 7, n. 2, p. 436–447, 2014.
- MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, v. 8, n. 12, p. 958–969, 2008.
- MOTA, M. M. *et al.* Migration of Plasmodium Sporozoites Through Cells Before Infection. *Science*, v. 291, n. 5501, p. 141, 2001.
- MYERS, K. V; AMEND, S. R.; PIENTA, K. J. Targeting Tyro3 , Axl and MerTK (TAM receptors): implications for macrophages in the tumor microenvironment. *Molecular Cancer*, p. 1–14, 2019.
- NAKAJIMA, H. Role of Transcription Factors in Differentiation and Reprogramming of Hematopoietic Cells. *The Keio journal of medicine*, v. 60, n. 2, p. 47–55, 2011.
- NEUMANN, H.; KOTTER, M. R.; FRANKLIN, R. J. M. Debris clearance by microglia : an essential link between degeneration and regeneration. *Brain*, v. 132, n. 2, p. 288–295, 2009.
- NISHANTH, G.; SCHLÜTER, D. Blood–Brain Barrier in Cerebral Malaria: Pathogenesis and Therapeutic Intervention. *Trends in Parasitology*, v. 35, n. 7, p. 516–528, 2019.
- OLIVIER, M. *et al.* Malarial pigment hemozoin and the innate inflammatory response. *Frontiers in Immunology*, v. 5, n. February, p. 1–10, 2014.
- ORTEGA-PAJARES, A.; ROGERSON, S. J. The Rough Guide to Monocytes in Malaria Infection. *Frontiers in immunology*, v. 9, n. 2888, p. 1–10, 2018.
- OTTERDAL, K. *et al.* Soluble markers of neutrophil , T-cell and monocyte activation are associated with disease severity and parasitemia in falciparum malaria. *BMC infectious diseases*, v. 18, n. 1, p. 1–8, 2018.
- PAI, S. *et al.* Real-Time Imaging Reveals the Dynamics of Leukocyte Behaviour during Real-Time Imaging Reveals the Dynamics of Leukocyte Behaviour during Experimental Cerebral Malaria Pathogenesis. *PLoS pathogens*, n. July, 2014.
- PAIS, T. F.; CHATTERJEE, S. Brain macrophage activation in murine cerebral malaria precedes accumulation of leukocytes and CD8+ T cell proliferation. *Journal of Neuroimmunology*, v. 163, n. 1–2, p. 73–83, 2005.
- PAIS, T. F.; PENHA-GONÇALVES, C. Brain Endothelium : The “ Innate Immunity Response Hypothesis ” in Cerebral Malaria Pathogenesis. *Frontiers in Immunology*, v. 9, n. January, p. 1–8, 2019.

- PAPAYANNOPOULOS, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature Reviews Immunology*, v. 18, n. 2, 2018.
- PARK, H. J. *et al.* Mesenchymal stem cells enhance α - synuclein clearance via M2 microglia polarization in experimental and human parkinsonian disorder. *Acta Neuropathologica*, 2016.
- PASTERNAK, N. D.; DZIKOWSKI, R. PfEMP1: An antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 41, n. 7, p. 1463–1466, 2009.
- PERDIGUERO, E. G. *et al.* Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature*, v. 518, n. 7540, p. 547, 2015.
- POLLARD, J. W. Trophic macrophages in development and disease. *Nature Reviews Immunology*, v. 9, n. 4, p. 259–270, 2009.
- PONGPONRATN, E. *et al.* An ultrastructural study of the brain in fatal *Plasmodium falciparum* malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 69, n. 4, p. 345–359, 2003.
- PORCHERIE, A. *et al.* Critical role of the neutrophil-associated high-affinity receptor for IgE in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Journal of experimental medicine*, v. 208, n. 11, 2011.
- POSTELS, D. G.; BIRBECK, G. L. *Cerebral malaria*. 1. ed. [S.l.]: © 2013, Elsevier B.V. All rights reserved., 2013. v. 114.
- PRAKASH, D. *et al.* Clusters of Cytokines Determine Malaria Severity in *Plasmodium falciparum* – Infected Patients from Endemic Areas of Central India. *The Journal of infectious diseases*, v. 194, n. 2, p. 198–207, 2006.
- PRATO, M. *et al.* Phagocytosis of haemozoin (malarial pigment) enhances metalloproteinase-9 activity in human adherent monocytes: Role of IL-1 β and 15-HETE. *Malaria Journal*, v. 7, p. 1–9, 2008.
- PRUDÊNCIO, M.; RODRIGUEZ, A.; MOTA, M. M. The silent path to thousands of merozoites : the *Plasmodium* liver stage. *Nature Reviews*, v. 4, n. November, p. 849–856, 2006.
- RADTKE, A. J. *et al.* Lymph-Node Resident CD8 α + Dendritic Cells Capture Antigens from Migratory Malaria Sporozoites and Induce CD8+ T Cell Responses. *PLoS Pathogens*, v. 11, n. 2, p. 1–23, 2015.
- RILEY, E. M.; STEWART, V. A. Immune mechanisms in malaria: New insights in vaccine development. *Nature Medicine*, v. 19, n. 2, p. 168–178, 2013.
- ROCHA, B. C. *et al.* Type I interferon transcriptional signature in neutrophils and high frequency of low-density granulocytes are associated with tissue damage in malaria. *Cell Reports*, v. 13, n. 12, p. 2829–2841, 2016.
- ROLAND, J. *et al.* NK Cell Responses to *Plasmodium* Infection and Control of Intrahepatic Parasite Development. *The Journal of Immunology*, v. 177, n. 2, p. 1229–1239, 2006.
- SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature reviews immunology*, v. 2, n. 11, 2002.

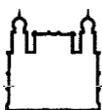
- SAHU, P. K. *et al.* Pathogenesis of cerebral malaria : new diagnostic tools , biomarkers , and therapeutic approaches. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 5, n. October, p. 1–13, 2015.
- SAMPAIO, V. S. *et al.* Malaria in the state of amazonas: A typical brazilian tropical disease influenced by waves of economic development. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 48, n. Suppl I, p. 4–11, 2015.
- SARKAR, S. *et al.* Differential modulation of glial cell mediated neuroinflammation in Plasmodium berghei ANKA infection by TGF β and IL 6. *Cytokine*, v. 99, n. May, p. 249–259, 2017.
- SCHMIDT, K. E. *et al.* Doxycycline inhibits experimental cerebral malaria by reducing inflammatory immune reactions and tissue-degrading mediators. *PLoS ONE*, v. 13, n. 2, p. 1–20, 2018.
- SCHMIDT, K. E. *et al.* Induction of pro-inflammatory mediators in Plasmodium berghei infected BALB / c mice breaks blood-brain-barrier and leads to cerebral malaria in an IL-12 dependent manner. *Microbes and Infection*, v. 13, n. 10, p. 828–836, 2011.
- SCHUMAK, B. *et al.* Specific Depletion of Ly6C hi Inflammatory Monocytes Prevents Immunopathology in Experimental Cerebral Malaria. *PLoS ONE*, v. 10, n. 4, p. 1–22, 2015.
- SENGUPTA, A. *et al.* Impact of autophagic regulation on splenic red pulp macrophages during cerebral malarial infection. *Parasitology International*, v. 71, n. November 2018, p. 18–26, 2019.
- SERCUNDES, M. K. *et al.* Targeting Neutrophils to Prevent Malaria- Associated Acute Lung Injury / Acute Respiratory Distress Syndrome in Mice. *PLoS Pathogens*, v. 12, n. 12, 2016.
- SEYDEL, K. B. *et al.* Brain Swelling and Death in Children with Cerebral Malaria. *The New England journal of medicine*, v. 372, n. 12, p. 1126–1137, 2015.
- SHAPOURI-MOGHADDAM, A. *et al.* Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*, v. 233, n. 9, p. 6425–6440, 2018.
- SHIBUI, A.; HOZUMI, N.; SHIRAIISHI, C. CD4 + T cell response in early erythrocytic stage malaria : Plasmodium berghei infection in BALB / c and C57BL / 6 mice. *Parasitology research*, v. 105, n. 1, p. 281–286, 2009.
- SICA, A. *et al.* Macrophage polarization in pathology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2015.
- SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization : in vivo veritas. *The Journal of clinical investigation*, v. 122, n. 3, p. 787–795, 2012.
- SILVA-JUNIOR, F. C. DA; ODONGO, F. C. A.; DULLEY, F. L. Hematopoietic stem cells: uses and perspectives. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 31, p. 53–58, 2009.
- SINGH, A. P. *et al.* Plasmodium Circumsporozoite Protein Promotes the Development of the Liver Stages of the Parasite. *Cell*, v. 131, n. 3, p. 492–504, 2007.
- SINGH, J. *et al.* Retinopathy as a prognostic marker in cerebral malaria. *Indian Pediatrics*, v. 53, n. 4, p. 315–317, 2016.

- SINNIS, P.; ZAVALA, F. The Skin: Where Malaria Infection and the Host Immune Response Begin. *Seminars in immunopathology*, v. 34, n. 6, p. 787–792, 2012.
- SKOROKHOD, O. A. *et al.* Hemozoin (Malarial Pigment) Inhibits Differentiation and Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells A Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ -Mediated Effect. *The Journal of Immunology*, v. 173, n. 3, p. 4066–4074, 2004.
- SONNEVILLE, R. *et al.* Understanding brain dysfunction in sepsis. *Annals of Intensive Care*, v. 3, n. 1, p. 1, 2013.
- SOUZA, J BRIAN DE; RILEY, E. M. Cerebral malaria : the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes and Infection*, v. 4, p. 291–300, 2002.
- STANIMIROVIC, D. B.; FRIEDMAN, A. Pathophysiology of the neurovascular unit : disease cause or consequence ? *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, v. 32, n. 7, p. 1207–1221, 2012.
- STEIDL, C. *et al.* Tumor-Associated Macrophages and Survival in Classic Hodgkin's Lymphoma. *The New England journal of medicine*, v. 362, n. 10, p. 875–885, 2010.
- STIJLEMANS, B. *et al.* African Trypanosomiasis-Associated Anemia : The Contribution of the interplay between Parasites and the Mononuclear Phagocyte System. *Frontiers in cellular neuroscience*, v. 9, n. February, p. 218, 2018.
- STURM, A. *et al.* Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*, v. 313, n. 5791, p. 1287–1290, 2006.
- SZEKANECZ, Z.; KOCH, A. E. Macrophages and their products in rheumatoid arthritis. *Current opinion in rheumatology*, v. 19, n. 3, p. 289–295, 2007.
- TAVARES, J. *et al.* Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. *Journal of experimental medicine*, v. 210, n. 5, p. 905–915, 2013.
- TAYLOR, T. E. *et al.* Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. *Nature Medicine*, v. 10, n. 2, p. 986–988, 2004.
- THUMA, P. E. *et al.* Distinct Clinical and Immunologic Profiles in Severe Malarial Anemia and Cerebral Malaria in Zambia. *Journal of Infectious Diseases*, v. 203, n. 2, p. 211–219, 2011.
- TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; TACIANE, B.; ASSOLINI, J. P. Macrophage Polarization in Leishmaniasis : Broadening Horizons. *Frontiers in Immunology*, v. 9, n. October, p. 1–12, 2018.
- TUNDUP, S.; SRIVASTAVA, L.; HARN, D. A. Polarization of host immune responses by helminth-expressed glycans. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1253, p. 1–13, 2012.
- TYBERGHEIN, A. *et al.* Immunopathological effects of malaria pigment or hemozoin and other crystals. *Biofactors*, v. 40, n. 1, p. 59–78, 2014.
- VANDERBERG, J. P.; FREVERT, U. Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immobilisation of Plasmodium berghei sporozoites injected into skin by mosquitoes q. *International Journal for Parasitology*, v. 34, p. 991–996, 2004.

- VILLAVERDE, C. *et al.* Clinical comparison of retinopathy-positive and retinopathy-negative cerebral Malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 96, n. 5, p. 1176–1184, 2017.
- WALKER, O. *et al.* Prognostic risk factors and post mortem findings in cerebral malaria in children. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 86, n. 5, p. 491–493, 1992.
- WALTHER, M. *et al.* Innate Immune Responses to Human Malaria : Heterogeneous Correlate with Parasitological and Clinical Outcomes 1. *The Journal of Immunology*, v. 177, n. 8, p. 5736–5745, 2006.
- WASSMER, S. C.; GRAU, G. R. Severe malaria: what's new on the pathogenesis front? *International Journal for Parasitology*, v. 47, p. 145–152, 2018.
- WHITE, N. J. *et al.* The murine cerebral malaria phenomenon. *Cell Press*, n. November, p. 11–15, 2009.
- WHO. *World malaria report*. [S.l: s.n.], 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/en/>>.
- WHO. *World Malaria Report*. [S.l: s.n.], 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/publications-detail/world-malaria-report-2019>>.
- WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Macrophage biology in development , homeostasis and disease. *Nature*, v. 496, n. 7446, p. 445–455, 2013.
- YAMAUCHI, L. *et al.* Plasmodium sporozoites trickle out of the injection site. *Cellular Microbiology*, v. 9, n. 5, p. 1215–1222, 2007.
- YIN, M. *et al.* Tumor-Associated Macrophages (TAMs): A Critical Activator In Ovarian Cancer Metastasis. *Oncotarget and therapy*, v. 12, p. 8687–8699, 2019.
- ZHOU, M. *et al.* Microglial CD14 activated by iNOS contributes to neuroinflammation in cerebral ischemia. *Brain Research*, v. 1506, p. 105–114, 2013.
- ZINGMAN, B. S.; VINER, B. L. Splenic complications in malaria: case report and review. *Clinical Infectious Diseases*, v. 16, n. 2, p. 223–232, 1993.
- ZUZARTE-LUIS, V.; MOTA, M. M.; VIGÁRIO, A. M. Malaria infections: What and how can mice teach us? *Journal of Immunological Methods*, p. 113–122, 2014.

11 ANEXOS

11.1 Licença do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA)



Instituto Oswaldo Cruz Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/ IOC

LICENÇA

L-041/2016

Certificamos que o protocolo (CEUA/IOC-035/2016), intitulado “Importância do recrutamento, diferenciação e ativação de células do sistema imune inato e adquirido na malária”, sob a responsabilidade de **FLÁVIA LIMA RIBEIRO GOMES** 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 30/09/2020 e inclui o uso total de:

Camundongo, cepa:

C57-BL/6 – 403 animais fêmeas – 6-8 semanas – 18-20g

BALB/c – 403 animais fêmeas – 6-8 semanas – 18-20g

Mus musculus – 403 animais fêmeas – 6-8 semanas – 18-20g

Observação: Esta licença não substitui outras licenças necessárias, como Certificado de Qualidade em Biossegurança para animais geneticamente modificados, certificado do IBAMA para captura de animais silvestres ou outros.

Rio de Janeiro, 06 de outubro de 2016.

Flávio Alves Lara

Coordenador da CEUA/Instituto Oswaldo Cruz

Fundação Oswaldo Cruz

FIOCRUZ-Fundação Oswaldo Cruz/IOC-Instituto Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - Brasil