

MINISTÉRIO DA SAÚDE

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

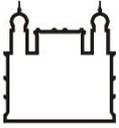
Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE CÉLULAS DA
IMUNIDADE INATA NO ESTABELECIMENTO DA MALÁRIA PULMONAR
MURINA

MARCOS VINICIUS RANGEL FERREIRA

Rio de Janeiro

Fevereiro de 2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MARCOS VINICIUS RANGEL FERREIRA

Caracterização fenotípica e funcional de células da imunidade inata no estabelecimento da malária pulmonar murina

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

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Lima Ribeiro Gomes

Rio de Janeiro

Fevereiro de 2021

Rangel Ferreira, Marcos Vinicius .

Caracterização fenotípica e funcional de células da imunidade inata no estabelecimento da malária pulmonar murina / Marcos Vinicius Rangel Ferreira. - Rio de Janeiro, 2021.

105 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2021.

Orientadora: Flávia Lima Ribeiro Gomes.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Malária Pulmonar. 2. Imunidade inata . 3. Macrófago alveolar. 4. Plasmodium sp. 5. Polarização de macrófagos. I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: MARCOS VINICIUS RANGEL FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE CÉLULAS DA
IMUNIDADE INATÁ NO ESTABELECIMENTO DA MALÁRIA PULMONAR
MURINA**

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Lima Ribeiro Gomes

Aprovada em: 11/02/2021

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins - Presidente (Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ)

Profa. Dra. Tatiana Maron Gutierrez – Membro (Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ)

Profa. Dra. Alessandra D' Almeida Filardy– Membro (Instituto de Microbiologia, UFRJ)

Profa. Dra. Dalma Maria Banic – Suplente (Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ)

Profa. Dra. Marcela de Freitas Lopes – Suplente (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho-UFRJ)

Rio de Janeiro, 11 de fevereiro de 2021



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa da dissertação de mestrado acadêmico em Biologia Celular e Molecular de **Marcos Vinícius Rangel Ferreira**, sob orientação da Dr.^a Flávia Lima Ribeiro Gomes. Ao décimo primeiro dia do mês de fevereiro de dois mil vinte e um, realizou-se às nove horas e trinta minutos, de forma síncrona remota, o exame da dissertação de mestrado acadêmico intitulada: **"Caracterização fenotípica e funcional de células da imunidade inata no estabelecimento da malária pulmonar murina"**, no programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Farmacologia e Imunologia, na linha de pesquisa: Mecanismos Imunológicos Envolvidos na Patologia de Doenças Autoimunes Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr.^a Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins – IOC/FIOCRUZ (Presidência), Dr.^a Tatiana Marín Gutiérrez– IOC/FIOCRUZ, Dr.^a Alessandra D'Almeida Filardy – UFRJ/RJ, e como suplentes: Dr.^a Dalma Maria Banio-IOC/FIOCRUZ e Dr.^a Marcela de Freitas Lopes – UFRJ/RJ. Após arquir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovação da defesa da dissertação de mestrado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Presidente da Banca alesia a decisão e a participação do aluno e de todos o membros da banca de forma síncrona remota. A Coordenadora do Programa Dr.^a Leila de Mendonça Lima, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 11 de fevereiro de 2021.

Dr.^a Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins (Presidente da Banca)

Dr.^a Leila de Mendonça Lima (Coordenadora do Programa)

FONTE DE FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -
Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Ao meu pai/avô por todo ensinamento a mim dado. A primeira pessoa a saber que eu começaria esta jornada. Gostaria de lhe abraçar e dizer que eu consegui. Onde estiver saiba que este trabalho é dedicado a você.

AGRADECIMENTOS

As boas energias transmitidas pelos meus mentores e guias que me conduziram até aqui me concedendo forças e coragem para seguir essa trajetória.

À minha avó que sempre esteve ao meu lado entendendo qual o meu papel de cientista na sociedade. Obrigado por toda compreensão mesmo que sem falar nada, muitas das vezes, mas que foi fundamental para minha chegada até aqui.

Aos meus pais, Marcia e Marcos. Obrigado. pelo carinho, atenção e força em forma de mensagem no dia a dia.

À Dr^a Flávia Lima Ribeiro Gomes pelo acolhimento e confiança desde a primeira vez que trocamos e-mail e começamos essa jornada até aqui. Obrigado pelos ensinamentos de bancada, questionamentos, desenvolvimento de senso crítico científico e incentivo nos momentos mais difíceis dessa fase. Agradeço toda atenção e paciência durante o desenvolvimento do meu aprendizado e por toda preocupação até mesmo em assuntos não referentes ao laboratório.

Ao Immuno Team, Carina, Lucas, Mônica e Uyla, pelo apoio neste trabalho. A presença de vocês foi muito importante em todas as longas jornadas de trabalho. Em especial, agradeço a Carina, que além de colega de trabalho é uma grande amiga. Obrigado pela escuta neutra e sincera, pelo apoio em momentos de estresse, pelo colo em momentos de desânimo e dificuldades.

Ao Laboratório de Pesquisa em Malária pelo fornecimento estrutural e insumos para o desenvolvimento desse projeto. Ao Laboratório de Pesquisa sobre o Timo. Ao Laboratório de Inflamação.

À Barbara Simonson, por ser essa grande amiga/psicóloga que sempre dedicou seu tempo em saber se eu estava bem, me dar conselhos, fazer longas chamadas para que eu pudesse dissipar toda tensão acumulada. Obrigado pelos carinhos e chamegos que sem dúvidas tornaram a caminhada mais agradável.

Aos amigos: Hugo, por todos os altos papos pelo telefone, risadas, sonhos compartilhados e conversas fiadas que me ajudaram a relaxar um pouco e não pirar. À Marayh pelo carinho e amizade de longas datas. Pelos projetos de vida compartilhados e pelas conversas. Te amo, my person.

As amigas Gi e Marcella por todo apoio e motivação sempre. Vocês são maravilhosas e todo suporte sempre foi muito válido.

À Xaile que foi paciente, instrutor e compreensivo nesse meio/final de jornada. Obrigado pelo apoio, pelas dicas, pelos conselhos, por aguentar minhas loucuras em dias difíceis e pelas ajudas acadêmicas. Além, é claro, das ligações que ajudaram a diminuir o estresse diário. Agradeço também por todos os momentos de descontração, risadas, caras e vozes doidas, entretenimento e baldão de sorvete só para molhar e relaxar.

À Elaine por horas de terapia aprendendo sempre ressignificar alguns conceitos, trazendo à tona a importância e a valorização do meu trabalho. Obrigado por me ajudar a organizar minhas confusões psíquicas.

À família da Penha, que foi colocada em minha vida, mãe, pai, Isa, Victor e Hugo. Agradeço por terem me ajudado no início dessa jornada, me dando suporte, abrigo, cuidado e confiança. Obrigado pela dedicação e entendimento que tiveram comigo no começo desse ciclo me impulsionando até aqui.

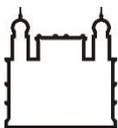
Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, por toda estrutura oferecida, organização e apoio. Em especial à Julimar, que como todos bem sabem, é engrenagem vital para esse programa. Obrigado pelo profissionalismo, comprometimento e carisma com cada aluno.

Ao IOC e todos por todos seus insumos e estruturas

Ao suporte financeiro: CAPES e INOVA-FIOCRUZ pelo fomento necessário para o projeto

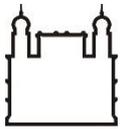
“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância.”

(Hipócrates)

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ****CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE CÉLULAS DA
IMUNIDADE INATÁ NO ESTABELECIMENTO DA MALÁRIA PULMONAR
MURINA****Resumo****DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Marcos Vinicius Rangel Ferreira

A malária é uma doença infecto-parasitária causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, e é um dos principais problemas de saúde pública mundial. A parasitose pode evoluir para formas graves com complicação pulmonar associada à síndrome do desconforto respiratório agudo (MA-SDRA). Infecções por *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* ou *P. knowlesi* podem levar ao quadro respiratório grave de MA-SDRA em humanos. Nestes, assim como nos modelos experimentais murinos, a MA-SDRA é caracterizada pelo aumento da permeabilidade do endotélio da microvasculatura pulmonar e inflamação. Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos imunoregulatorios associados à patogênese da MA-SDRA. O objetivo deste estudo foi investigar a cinética de recrutamento das células do sistema imune inato para o pulmão, e o perfil de polarização dos macrófagos alveolares após a infecção de camundongos C57BL/6 e BALB/c com *Plasmodium berghei* ANKA (*PbA*). Os camundongos C57BL/6 infectados apresentaram disfunção pulmonar e edema, este evidenciado pelo aumento no peso do órgão e no conteúdo de proteínas no lavado broncoalveolar (BAL) e interstício pulmonar. Os animais BALB/c parasitados, entretanto, apresentaram discreto aumento no peso do órgão e de proteínas quantificadas no BAL, alterações que não se refletiram em dano à função pulmonar. As subpopulações de células mieloides (monócitos inflamatórios, macrófago alveolar, neutrófilos e/ou eosinófilos) presentes no BAL e no tecido pulmonar foram analisadas por citometria de fluxo. Observamos diferenças no número percentual e/ou total de monócitos inflamatórios e neutrófilos, em ambos os compartimentos, ao longo da infecção em animais BALB/c e C57BL/6. Embora com cinética diferenciada, os animais parasitados, de ambas as linhagens, apresentaram redução no percentual e número total de macrófagos alveolares ao longo da doença. Interessantemente, os macrófagos alveolares de camundongos C57BL/6 exibiram maior expressão de CD206 e de MHC classe II e, redução no percentual de células expressando a enzima iNOS. Além disso, foi detectado aumento na atividade da enzima arginase e de óxido nítrico, no BAL dos animais C57BL/6 infectados. Nenhuma variação foi notada na população de eosinófilos ao longo da infecção em ambas as linhagens. Análise do perfil de citocinas revelou, no BAL dos animais BALB/c e C57BL/6, níveis aumentados de TNF α e IFN γ . Entretanto, no BAL dos camundongos C57BL/6 foi detectado um maior desbalanço quando relacionado com a IL-10, já nos camundongos BALB/c não observamos diferenças estatísticas. Em conclusão, nosso estudo mostrou que camundongos C57BL/6 e BALB/c apresentam uma dinâmica de populações celulares diferenciada no pulmão e distinta plasticidade dos macrófagos alveolares. Estes eventos podem estar associados ao desenvolvimento de complicações pulmonares observadas nos animais C57BL/6 e BALB/c.



INSTITUTO OSWALDO CRUZ

PHENOTYPIC AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF INNATE IMMUNITY CELLS IN THE ESTABLISHMENT OF MURINE PULMONARY MALARIA

Abstract

MASTERS DISSERTATION IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

Marcos Vinicius Rangel Ferreira

Malaria is an infectious-parasitic disease caused by a protozoa of the genus *Plasmodium*, and is one of the main public health problems worldwide. The parasitosis may progress to severe forms with pulmonary complications associated with acute respiratory distress syndrome (MA-ARDS). Infection with *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* or *P. knowlesi* can lead to severe respiratory symptoms of MA-ARDS in humans. In murine models of malaria, MA-ARDS is characterized by increased permeability of the pulmonary microvasculature endothelium and inflammation. However, little is known about the immunoregulatory mechanisms associated with the pathogenesis of MA-ARDS. The aim of this study was to investigate the kinetics of lung innate immune cell recruitment and the polarization profile of alveolar macrophages, after infection of C57BL/6 and BALB/c mice with *Plasmodium berghei* ANKA (*PbA*). C57BL/6 infected-mice showed pulmonary dysfunction and edema as attested by increased organ weight and protein content in the bronchoalveolar lavage (BAL) and pulmonary interstitium. In contrast, BALB/c mice showed a small increase in the organ weight and total proteins in the BAL, alterations that did not interfere with lung function. Subpopulations of myeloid cells (inflammatory monocytes, alveolar macrophages, neutrophils and/or eosinophils) present in the BAL and in the lung tissue were analyzed by flow cytometry. We observed differences in the percentage and/or total number of inflammatory monocytes and neutrophils, in both compartments, in BALB/c and C57BL/6 mice, throughout the infection. Infected mice of both strains, although exhibiting different kinetics, showed reduction in the percentage and total number of alveolar macrophages, throughout the disease. Interestingly, alveolar macrophages of C57BL/6 mice exhibited higher expression of CD206 and MHC class II as well as reduction in the percentage of positive cells for iNOS enzyme. In addition, an increase in the activity of the enzyme arginase and nitric oxide was detected in BAL of the infected C57BL/6 mice. No changes were noticed in the eosinophil population over the course of infection in both strains. Cytokine analysis in BAL from animals BALB/c and C57BL/6 revealed increased levels of TNF α and IFN γ . However, in the C57BL/6 mice, a greater imbalance was detected when related to IL-10, in BALB/c mice, we did not observe statistical differences. In conclusion, our study showed that C57BL/6 and BALB/c mice have different cellular dynamism in the lung and distinct alveolar macrophages polarization. These events may be associated with the development of pulmonary complications observed in animals C57BL/6 and BALB/c.

ÍNDICE

RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1.INTRODUÇÃO	19
1. 1 A malária.....	19
1.1.1 Histórico.....	19
1.1.2 Epidemiologia.....	21
1.1.3 O ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> spp	22
1.1.4 Imunopatogênese da malária grave.....	24
1.1.5 Fisiopatologia da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo associada à malária.....	27
1.2 Macrófagos	30
1.2.1 Macrófagos pulmonares.....	33
1.3 Granulócitos: eosinófilos e neutrófilos.....	33
1.4 Modelos experimentais: breve descrição do modelo murino	34
2.OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo geral.....	35
2.2 Objetivos específicos.....	35
3.METODOLOGIA	37
3.1 Animais	37
3.2 Parasito e infecção.....	37
3.3 Sobrevida e curso clínico	38
3.4 Avaliação da disfunção pulmonar	39
3.5 Avaliação da quebra da barreira hematoalveolar	39
3.6 Obtenção do lavado broncoalveolar (BAL).....	40

3.7 Obtenção de células do tecido pulmonar.....	40
3.8 Imunofenotipagem das células obtidas do lavado broncoalveolar e tecido pulmonar.....	41
3.9 Quantificação de proteínas totais e citocinas no lavado broncoalveolar	43
3.10 Dosagem de óxido nítrico	43
3.11 Dosagem da arginase	43
3.12 Análise estatística.....	44
4.RESULTADOS.....	45
4.1 Camundongos BALB/c e C57BL/6 parasitados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA apresentam curso clínico da doença diferente, embora parasitemia semelhante.....	45
4.2 A infecção com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA promove edema e disfunção pulmonar em camundongos C57BL/6.....	47
4.3 Variações no número de células presentes no BAL de camundongos C57BL/6 e BALB/c ao longo da infecção com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	50
4.4 Cinética de recrutamento de monócitos inflamatórios e neutrófilos para o tecido pulmonar de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	54
4.5 A infecção com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA acarreta alterações na expressão de CD206, MHC II e iNOS nos macrófagos alveolares de camundongos BALB/c e C57BL/6.....	55
4.6 Camundongos C57BL/6 infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA apresentam níveis elevados de óxido nítrico e arginase no lavado broncoalveolar.....	57

4.7 Perfil das citocinas presentes no lavado broncoalveolar de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	59
5. DISCUSSÃO.....	61
6. CONCLUSÃO	74
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
8. REFERÊNCIAS.....	76
9. ANEXOS.....	101
9.1 Licença do Comitê de Ética na Utilização de Animais.....	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Países com casos autóctones de malária e seus status epidemiológicos no ano de 2018..	22
Figura 2. Ciclo biológico do parasito.	24
Figura 3. Imunopatogênese da MA-SDRA.	29
Figura 4. Espectro esquemático dos tipos de macrófagos.	32
Figura 5. Desenho experimental.	38
Figura 6. Curso da infecção com <i>PbA</i> -GFP e progressão da doença.	46
Figura 7. Desenvolvimento de edema e disfunção pulmonar em camundongos C57BL/6 infectados com <i>PbA</i> .	48
Figura 8. <i>Dot plots</i> representativos da estratégia de gates utilizada para identificação das células mieloides presentes no lavado broncoalveolar durante a infecção com <i>PbA</i> .	42
Figura 9. Cinética de recrutamento das subpopulações de células mieloides durante o estabelecimento da malária pulmonar experimental.	52
Figura 10. Alteração na expressão do receptor de manose CD206, MCH classe II e óxido nítrico sintase (iNOS).	54
Figura 11. Níveis de óxido nítrico e atividade arginase no BAL camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com <i>PbA</i> .	56
Figura 12. Análise do perfil de citocinas presentes no BAL de animais infectados com <i>PbA</i> .	58
Figura 13. Análise de recrutamento de monócitos e neutrófilos para o tecido pulmonar durante a infecção com <i>PbA</i> .	60
Figura 14. Cinética de recrutamento de monócitos e polarização de macrófagos alveolares em camundongos infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de anticorpos utilizados para marcação das células do BAL e tecido pulmonar.....	42
---	-----------

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APC	Célula Apresentadora de Antígenos, do inglês <i>Antigen-presenting Cell</i>
BAL	Lavado broncoalveolar; do inglês <i>Bronchoalveolar lavage</i>
CBA	do inglês <i>Cytokines Beads Array</i>
CCR	Receptor de quimiocina; do inglês <i>Chemokine (C-C motif) Receptor</i>
CD	Grupamento de diferenciação; do inglês <i>Cluster of Differentiation</i>
CQ	Cloroquina
DAMPs	Padrões Moleculares Associado ao Dano; do inglês <i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
GFP	Proteína verde fluorescente; do inglês <i>Green Fluorescent Protein</i>
GPI	Glicosilfosfatidilinositol; do inglês <i>Glycophosphatidylinositol</i>
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular; do inglês <i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
IFN	Interferon; do inglês <i>Interferon</i>
IL	Interleucina; do inglês <i>Interleukin</i>
iNOS	Óxido Nítrico Sintase; do inglês <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
i.p.	Intraperitoneal
LPS	Lipopolissacarídeo
LPA	Lesão Pulmonar Aguda

MA-SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo associado à Malária
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
MCP-1	Proteína-1 quimioatraente de monócitos; do inglês <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
M1	Macrófagos tipo 1 (classicamente ativados)
M2	Macrófagos tipo 2 (alternativamente ativados)
MC	Malária cerebral
MCE	Malária cerebral experimental
MHC	Complexo de Principal de Histocompatibilidade; do inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i>
PAMPs	Padrões Moleculares Associado ao Patógeno; do inglês <i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
<i>PbA</i>	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
P/E	Penicilina e Estreptomicina
PfEMP1	Proteína da membrana eritrocitária do <i>Plasmodium falciparum</i> ; do inglês <i>Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1</i>
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrão; do inglês <i>Pathogen-Recognition Receptors</i>
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SFB	Soro Fetal Bovino
TGF	Fator de crescimento transformante beta; do inglês <i>Transforming Growth Factor</i>
TLR	Receptor do Tipo Toll; do inglês <i>Toll-like Receptor</i>

TNF Fator de Necrose Tumoral; do inglês *Tumor Necrosis Factor*

VCAM Molécula de Adesão de Células Vasculares; do inglês *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*

1. Introdução

1.1 A malária

1.1.1 Histórico

A malária é uma doença antiga, cujas possíveis primeiras referências do que seria esta enfermidade foram encontradas em documentos chineses que datam o ano de 2700 a.C (1). A palavra “malária” tem origem do italiano medieval *mal'aire* que significa “maus ares”. A doença era anteriormente conhecida como paludismo, do latim “palus” (pântano), ou febre dos pântanos devido à sua associação com terrenos alagados. Durante muitos anos acreditou-se que a malária, assim como a cólera, fazia parte das doenças causadas por uma “névoa venenosa” (miasma), rica em partículas oriundas do processo de decomposição (2). Antonie Van Leeuwenhoek, no decorrer do ano de 1676, observou e descreveu pela primeira vez os micro-organismos e concluiu que estes estavam presentes em qualquer recipiente exposto ao ar e não nasciam espontaneamente da putrefação, mas viajavam na água da chuva e no vento causando as doenças infecciosas (3,4). Esse grande achado de Antonie permitiu que, entre os anos de 1878 e 1879, Louis Pasteur e Robert Koch desenvolvessem uma teoria para a origem das infecções, derrubando a teoria do miasma (3,5) e intensificando a pesquisa pela causa da malária. Essa busca levou Charles Louis Aphonse Laveran, oficial do exército francês, durante seu trabalho na Argélia, a procurar pelo pigmento malárico já visto nos baços aumentados dos pacientes. Ele observou protozoários em diferentes formas dentro de leucócitos e glóbulos vermelhos (6) e identificou o parasito *Oscillaria malariae*, atualmente conhecido como *Plasmodium (P) falciparum*. As espécies responsáveis pelas febres terçã e quartã foram descobertas e descritas por Augusto Celli (*P. vivax*) e Camillo Golgi (*P. malariae*) entre os anos de 1885 e 1926. A quarta espécie, *P. ovale*, foi descrita pelo parasitologista John Stephens no ano de 1918 (7). Já a identificação do mosquito *Anopheles* como o vetor do parasito causador da malária humana foi feita por Giovanni Battista Grassi (2,8).

Atualmente são descritas seis espécies de *Plasmodium* que causam malária em humanos, são elas: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, *P. knowlesi* e *P. simium* (9,10). O *P. knowlesi* foi caracterizado pela primeira vez em 1932, em

macacos de cauda longa, *Macaca fascicularis* (9,11) e reportado como uma infecção exclusiva de primatas não humanos até o ano de 1965. Durante uma investigação de casos atípicos de uma possível infecção pelo *P. malariae*, em pacientes na Malásia, foram relatados sintomas não característicos e contagem alta de parasito (9,12). Ensaio de sequenciamento do DNA do parasito revelaram se tratar de infecções pelo *P. knowlesi*, e não pelo *P. malariae* (13). O *P. simium*, espécie identificada mais recentemente e classificada como zoonótica, também era citado como um parasito específico de macacos. A infecção de humanos pelo *P. simium* foi reportada pela primeira vez na região da Mata Atlântica brasileira, e pode ter sido erroneamente diagnosticada como *P. vivax* por muitos anos devido à não utilização de técnicas específicas para sua identificação (14).

No Brasil, a primeira grande epidemia de malária irrompe na região amazônica no final do século XIX (15). Mais de 10 mil pessoas morreram de malária ao longo de toda região colonizada do Brasil e a doença foi se agravando cada vez mais até o início dos anos de 1900 (16). Neste mesmo período, começaram a surgir medidas de controle da doença em São Paulo e Rio de Janeiro. Liderado por Adolpho Lutz, foi criado o primeiro mapa da malária no estado de São Paulo. No Rio de Janeiro, liderado por Oswaldo Gonçalves Cruz juntamente com Carlos Chagas e Arthur Neiva foram implementados métodos profiláticos que incluía o uso de larvicidas para a eliminação do vetor (15,16). Nos anos seguintes, foi criado o Departamento Nacional de Saúde Pública (DNSP) e implementado a Campanha de Erradicação da Malária (CEM), pelo médico sanitário Mario Pinotti (17,18). A campanha gerou ações promissoras no controle da malária, como a conscientização do problema grave de saúde pública gerado pela doença. Entretanto, algumas diretrizes não foram aplicadas de forma correta, como o uso incontrolado de diclorodifeniltricloroetano (DDT) e a adição de cloroquina (CQ) no sal de cozinha, favorecendo, mais tarde, o surgimento de vetores e parasitos resistentes às drogas utilizadas (19). Atualmente, as estratégias que visam o controle da malária no Brasil consistem no diagnóstico e tratamento imediato dos casos da doença, assim como métodos de combate da transmissão através da aplicação de medidas antivetoriais (18).

1.1.2 Epidemiologia

No ano de 2019, foram registrados cerca de 229 milhões de casos de malária e 409 mil mortes (20). Dentre os números de casos, estima-se que 207 mil mortes (64%) ocorreram no grupo mais vulnerável, crianças menores de 5 anos (21). Os casos se concentram na região Africana (93%), seguido pela região do Sudoeste Asiático (3,4%) e região oriental do Mediterrâneo (2,4%). 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 (22). Nas Américas, estima-se que aproximadamente 93% de todos os casos de malária estejam concentradas em seis países: Brasil, Colômbia, Guiana, Haiti, Peru e Venezuela (Figura 1) (23).

No Brasil, o número de casos de malária reportados vem caindo anualmente. O país registrou redução de 76,8% na incidência de malária entre os anos de 2000 e 2014, e em 2016 contribuía com 42% dos casos registrados de malária nas Américas (24). Essa redução foi possível devido ao diagnóstico imediato e as políticas de controle implementadas pelo Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) (25,26). Entretanto, o quadro epidemiológico da malária ainda é preocupante e a doença permanece como um grave problema de saúde pública. Aproximadamente 99,5% dos casos de malária no Brasil ocorrem dentro da Amazônia Legal e são causados predominantemente pelo *P. vivax* (27). Fora da região endêmica amazônica, os casos de malária estão localizados em 18 estados brasileiros, constituindo 0,5% das notificações que totalizam aproximadamente 1.300 casos (entre os anos de 2003-2013) (25,28).

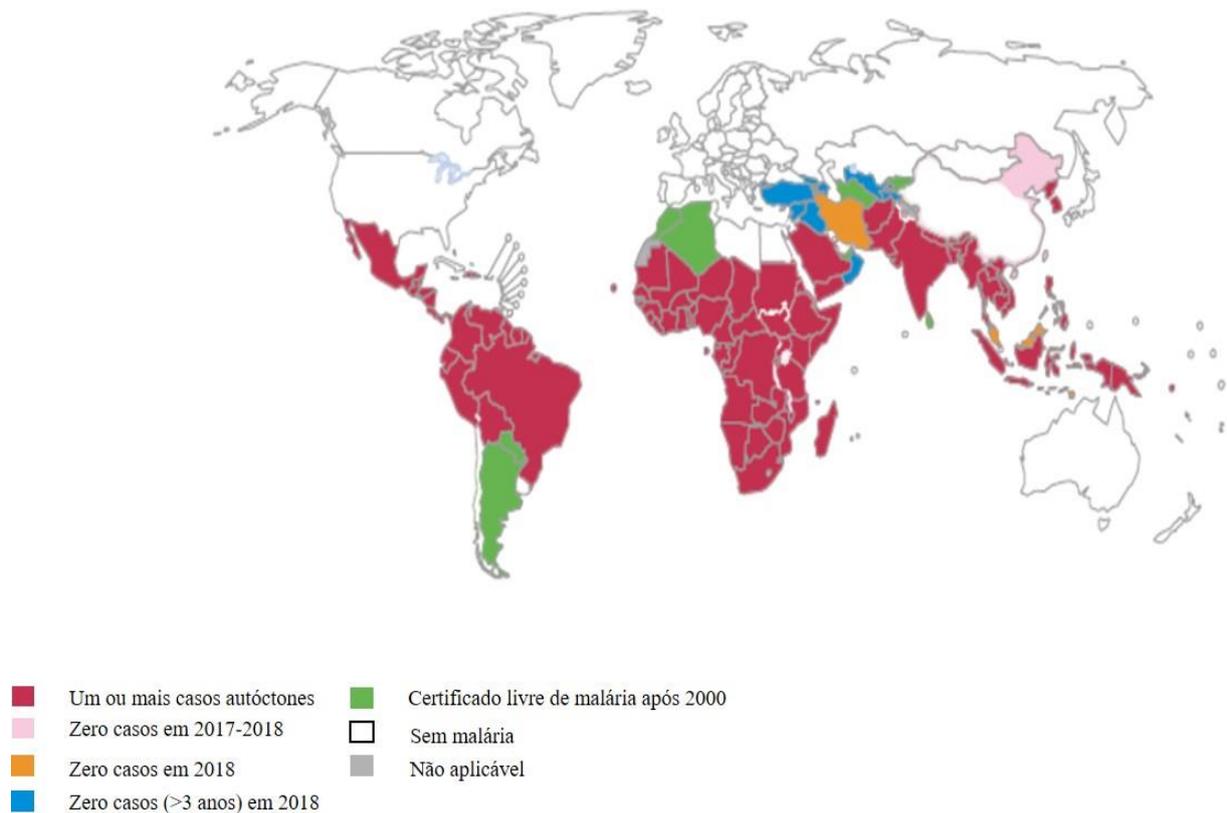


Figura 1. Países com casos autóctones de malária e seus status epidemiológicos no ano de 2018. Mapa representativo das áreas endêmicas para malária. Em vermelho pode-se observar áreas com um ou mais casos autóctones notificados em 2018; em rosa, zero casos dentre os anos de 2017 e 2018; em amarelo, áreas com zero casos em 2018; em azul, localidades com zero casos da doença há mais de 3 anos; em verde, áreas com certificado livre de malária desde 2000; em branco, localidades sem malária e em cinza, áreas com dados não fornecidos. Fonte: Adaptado WHO, 2019.

1.1.3 O ciclo biológico do *Plasmodium* spp

Protozoários do gênero *Plasmodium* são parasitos intracelulares pertencentes ao filo Apicomplexa (29), transmitidos pelos mosquitos do gênero *Anopheles* (30) e apresentam ciclo de vida heteroxênico (Figura 2), com uma fase assexuada no hospedeiro vertebrado e outra sexuada no vetor anofelino (31). O ciclo assexuado se inicia quando a fêmea do *Anopheles*, durante o repasto sanguíneo, inocula formas esporozoítas do parasito na derme do hospedeiro intermediário. Estas formas atingem os vasos linfáticos e sanguíneos (31). Na corrente sanguínea, os esporozoítas migram passivamente até o fígado e atravessam a barreira sinusoidal e diversas células do órgão até se alojar em um hepatócito (32). Dentro do vacúolo parasitóforo da célula hospedeira, os parasitos se transformam em trofozoítas hepáticos e iniciam o

processo denominado esquizogonia hepática ou exoeritrocítica, forma assexuada de multiplicação que resulta em milhares de merozoítos (33). Em determinadas espécies, como o *P. vivax* e *P. ovale*, alguns parasitos diferenciam-se em hipnozoítos e podem permanecer latentes no hospedeiro durante anos e subitamente desencadear uma infecção reincidente (34). Os merozoítos deixam o fígado dentro de uma vesícula formada a partir da membrana do hepatócito, denominada merossoma, e são carregados através da circulação hepática até a corrente sanguínea. Liberados na corrente sanguínea, os merozoítos invadem os eritrócitos onde se replicam. Os parasitos rompem os eritrócitos em períodos de 48-72 horas nas infecções em humanos, coincidindo com os quadros sintomáticos da malária. Durante esse período os parasitos se diferenciam em trofozoítos jovens (forma de anel), trofozoítos maduros e, em seguida, em novos merozoítos, que após a lise os eritrócitos, infectam novas células sadias, perpetuando o ciclo eritrocítico e sintomático da doença (35). Alguns merozoítos podem se diferenciar em gametócitos masculinos (microgametócitos) e femininos (macrogametócitos), formas responsáveis pela infecção de novos mosquitos durante o repasto sanguíneo e início do ciclo sexuado do *Plasmodium* no inseto vetor (36,37).

No intestino médio da fêmea anofelina, inicia-se a gametogênese (diferenciação dos gametócitos em gametas). O microgameta (gameta masculino) fecunda o macrogameta (gameta feminino) dando origem ao zigoto que, posteriormente, se diferencia em oocineto (forma móvel e invasiva). O oocineto perfura e atravessa a membrana peritrófica e o epitélio intestinal do mosquito e se aloja na lâmina basal do intestino médio do vetor onde transforma-se em oocisto (37,38). Dentro do oocisto ocorrem sucessivas divisões celulares (esporogonia) e formação de milhares de esporozoítos. Após romperem a membrana do oocisto, os esporozoítos alcançam a hemolinfa, migram até as glândulas salivares e, durante um novo repasto sanguíneo, são inoculados na derme do hospedeiro vertebrado completando o ciclo biológico do *Plasmodium* (39).

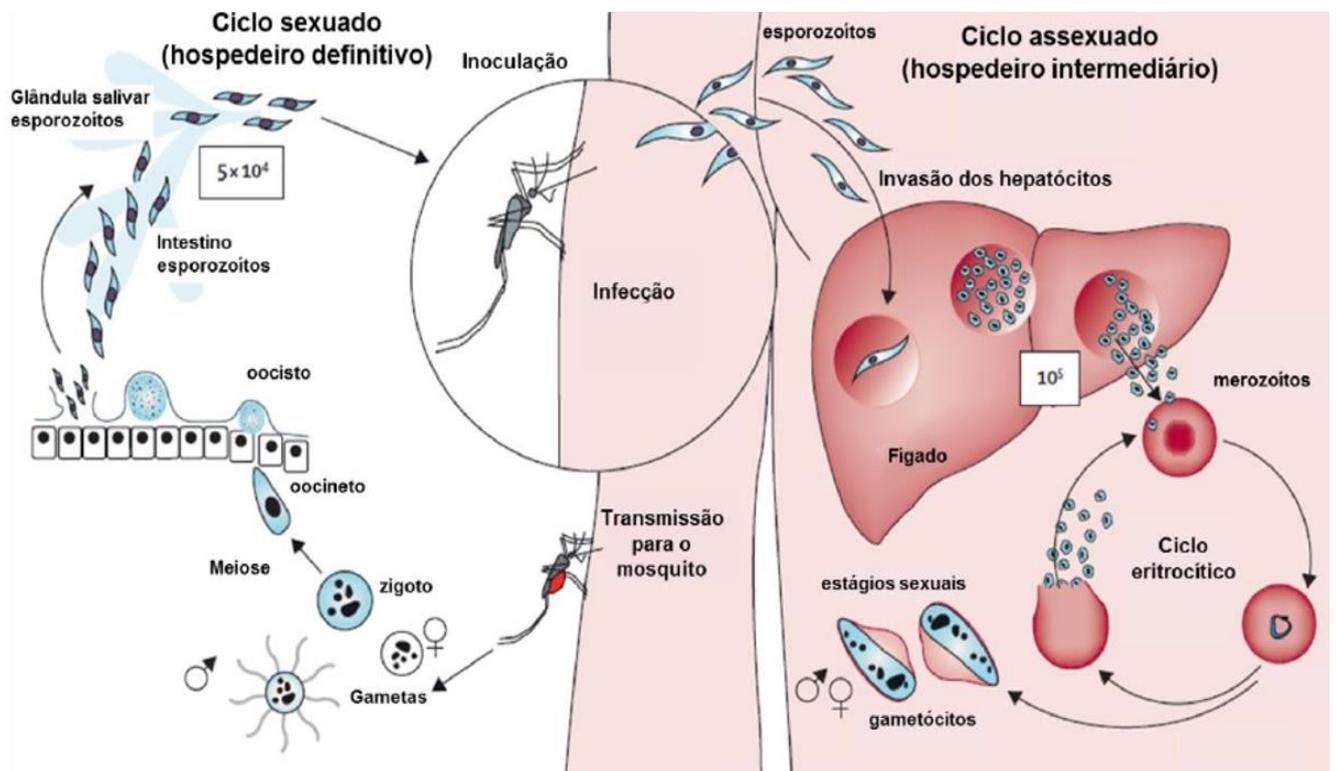


Figura 2. Ciclo biológico do parasito Ciclo sexuado (à esquerda): Após a fecundação no intestino do mosquito ocorre a formação do zigoto e posteriormente a diferenciação em oocineto. Oocineto atravessa o epitélio intestinal dos mosquitos se aloja na lâmina basal do intestino do vetor e transforma-se em oocisto. Após sucessivas divisões celulares e formação de esporozoítos, há o rompimento da membrana do oocisto onde os esporozoítos migram até as glândulas salivares. Ciclo assexuado (à direita) momento da infecção com a inoculação de esporozoítos na derme do hospedeiro vertebrado até a infecção dos hepatócitos e liberação dos merozoítos. Os eritrócitos são infectados repetidamente e quando também há a formação das formas sexuadas. Durante o repasto sanguíneo o mosquito ingere as formas sexuada presentes na corrente sanguínea perpetuando o ciclo. Fonte: Adaptado de White, N.J. e colaboradores, 2014.

1.1.4 Imunopatogênese da malária grave

Malária é uma doença sistêmica e a extensão de sua gravidade depende de fatores como a virulência do parasito, genética do hospedeiro, condições nutricionais, fatores socioeconômicos e infecções anteriores (40). Sintomas como cefaleia, fadiga e desconforto abdominal acompanhados por febre em diferentes momentos são reportados pelos pacientes, e são considerados manifestações leves da doença. Devido à infecção dos hepatócitos, pacientes adultos e crianças podem apresentar icterícia e aumento do fígado, respectivamente (41). Os casos mais graves da doença costumam ser atrelados à infecção pelo *P. falciparum*, entretanto, complicações graves da malária também têm sido reportadas em infecções pelo *P. vivax* e *P. knowlesi* (42,43). Danos associados à falha renal aguda já foram demonstrados em

pacientes infectados com *P. falciparum* e *P. vivax*, enquanto os pacientes infectados pelo *P. malariae* desenvolvem doenças crônicas e glomerulopatias progressivas (44).

As formas graves da doença estão associadas a uma série de eventos que ocorrem de forma sistêmica. A anemia é uma das complicações mais frequentes da malária e pode causar morbidade e mortalidade, principalmente em grávidas e crianças (45,46). A lise de eritrócitos parasitados, sua depuração pelos macrófagos esplênicos, assim como a inibição da eritropoiese na medula óssea pela ação de citocinas inflamatórias são as principais causas da complicação (47,48). Outras formas graves de malária, como a malária pulmonar e cerebral (MC), estão associadas ao sequestro de eritrócitos infectados aos órgãos, processo conhecido como citoaderência (47). Os eritrócitos infectados interagem com receptores do próprio hospedeiro como CD36, E-selectina, Moléculas de Adesão Intercelular-1 (ICAM-1) e Moléculas de Adesão Vascular-1 (VCAM-1), através de proteínas específicas do parasito como a proteína 1 de membrana eritrocitária associada ao *P. falciparum* (PfEMP1), por exemplo (49,50). O aumento dos níveis séricos de citocinas inflamatórias é um evento chave na ativação do endotélio, induzindo maior expressão de moléculas de adesão e aderência de leucócitos à microvasculatura periférica dos órgãos (51). Além da adesão leucocitária, as plaquetas também são encontradas interagindo com os eritrócitos infectados, monócitos e linfócitos na microvasculatura (52), ocasionando trombocitopenia. A adesão das células leucocitárias, plaquetas e rosetas eritrocíticas e a ativação endotelial geram o bloqueio dos vasos e, como consequência, a diminuição das trocas gasosas e depuração/excreção de metabólitos. Esse cenário leva a complicações, como hipoxemia e acidose metabólica, que determinam a progressão da doença para a sua forma grave (52,53).

A produção de óxido nítrico (NO) a partir das famílias de proteínas, óxido nítrico sintase, possui importante papel durante a fisiopatologia da malária (54). Entretanto, os mecanismos de ação ainda se mantêm controversos. Clarck e colaboradores, correlacionaram aumento da produção de NO com os severos danos cerebrais da malária (55). Contrariamente, Anstey e colaboradores, exibiram que a produção de NO é diminuída em casos não complicados e malária cerebral (56). Estudos “in vitro” também mostraram que não há papel do NO na eliminação do parasito, onde *P. falciparum* (57,58) e parasitos de roedor (*P. berghei* e *P. yoelli*) foram incubados com

solução de alta saturação de NO e não foi evidenciado a morte de parasito, sugerindo resistência à morte por NO (59,60).

A ativação exacerbada do sistema imune e desenvolvimento de um perfil de resposta pró-inflamatória também estão relacionados à gravidade da doença. A ativação do sistema imune se inicia com o reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) e ao dano tecidual (DAMPs) pelas células do sistema imune inato. A hemozoína, produto da metabolização do grupo heme dos eritrócitos pelo parasito, e o complexo hemozoína/DNA são exemplos de PAMPs. O reconhecimento destas moléculas por células fagocíticas, como macrófagos, monócitos, células dendríticas (DCs) e neutrófilos ocorre através dos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) (61,62) presentes na membrana plasmática e na membrana endossomal (receptores intracelulares). Os receptores do tipo Toll (TLRs) são exemplos de PRRs e sua ativação induz a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , e interferon (IFN) do tipo 1. Os cristais de hemozoína, quando fagocitados, podem desestabilizar a estrutura do fagolisossomo e, ao caírem no citoplasma, ativam o inflamassoma NLRP3, atuando como o segundo sinal da cascata, que leva a clivagem da prócaspase e, conseqüentemente, propicia a clivagem de pró-IL-1 β na proteína bioativa (50). Além disso, já foi demonstrado que o glicosilfosfatidilinositol (GPI) do patógeno é capaz de ativar TLR2, levando a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias via a molécula adaptadora de diferenciação mieloide 88 (MyD88). Estudos realizados com camundongos deficientes em MyD88 demonstraram que estes animais apresentam menor secreção de IL-12 e, interessantemente, menor dano tecidual (63). Além disso, os macrófagos (entre outras células do sistema imune inato) também podem reconhecer DAMPs, como as microvesículas derivadas de plaquetas e heme, via TLR-4 durante a infecção pelo *P. vivax* e *P. falciparum* (64).

As imunidades inata e adaptativa são indissociáveis. As citocinas produzidas pelas células do sistema imune inato guiam o curso da resposta imune adquirida (65). No microambiente esplênico, as DCs são importantes células apresentadora de antígenos (APCs) e produtoras de IL-12. As DCs apresentam os antígenos do parasito às células Th0 e induzem sua diferenciação em linfócitos T CD4 produtores de IFN- γ

(Th1) (51). As células NK, ativadas no microambiente rico em TNF- α e IL-12 também produzem IFN- γ , importante para a polarização da resposta Th1.

O sistema imune tenta balancear a resposta inflamatória frente à infecção com a produção de citocinas e fatores anti-inflamatórios, como a IL-10 e o fator de crescimento do tipo beta (TGF- β) (66,67). Entretanto, a produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias contribui para o acúmulo e o sequestro de eritrócitos infectados na microvasculatura, propiciando a inflamação local, obstrução do fluxo sanguíneo e o dano tecidual. No pulmão, levam a edema, hiperventilação e a síndrome do desconforto respiratório (43).

1.1.5 Fisiopatologia da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo associada à malária

Ao longo do processo evolutivo foram sendo selecionadas e desenvolvidas estruturas que possibilitaram a sobrevivência dos animais no meio terrestre (68). Isto é, estruturas que propiciassem a respiração fora do meio aquático. Registros e estudos ontológicos mostram que o pulmão dos vertebrados originou-se a partir de uma estrutura progenitora dos peixes ósseos e foi se desenvolvendo ao longo de milhares de anos até a estrutura que conhecemos nos dias atuais (68). Estruturas cartilaginosas, árvore brônquica, direcionam o ar inspirado para o lúmen dos alvéolos. Estes são recobertos por capilares sanguíneos, nos quais o sangue circula bem próximo ao ar inalado, separados apenas por uma barreira de epitélio alveolar. por difusão ocorre a hematose pulmonar (69).

A quebra na homeostasia por agentes patogênicos, como bactérias, vírus, parasitos e/ou fungos, pode levar a danos na morfologia tecidual e comprometimento das funções do órgão. A síndrome do desconforto respiratório (SDRA) é um exemplo de comprometimento pulmonar, na qual os principais sintomas são falta de ar e respiração acelerada. A SDRA durante muitos anos esteve correlacionada ou até mesmo sendo sinônimo de lesão pulmonar aguda (LPA) (70). Entretanto, em 1967, Ashbaugh e colaboradores propuseram a SDRA como uma síndrome distinta, que poderia ser definida pelos sinais clínicos de dispneia grave, taquipneia, cianose e perda da complacência pulmonar. A distinção da SDRA das demais síndromes respiratórias promoveu uma melhor abordagem na pesquisa sobre a sua patogênese,

e criou um padrão nas medidas de tratamentos e intervenção (71). No ano de 1988 foi proposto uma expansão da definição da SDRA adicionando um sistema de score da hipoxemia, da conformidade da respiração e critérios radiológicos. Com os conceitos expandidos, em 1994 ficou definido na Conferência América-Europa de Consenso que a distinção entre um quadro de LPA e SDRA também seria pelo critério da fração inspirada de oxigênio (FiO_2) e pressão arterial de oxigênio (PaO_2) (72). Com isso, determinou-se que o parâmetro da falha respiratória que define LPA seria de $PaO_2/FiO_2 \leq 300$ mmHg enquanto o que define a SDRA seria de $PaO_2/FiO_2 < 200$ mmHg. No ano de 2012, durante a Conferência de Berlin foi excluído o termo LPA e a SDRA passou a ser categorizada, de acordo com a oxigenação, em três estágios: leve ($200 < PaO_2/FiO_2 \leq 300$ mmHg), moderado ($100 < PaO_2/FiO_2 < 200$ mmHg) e severo ($PaO_2/FiO_2 \leq 100$ mmHg); acompanhada da radiografia torácica, a origem do edema e tempo da disfunção respiratória (73). Portanto a SDRA ficou caracterizada como uma forma específica de lesão pulmonar distinguida por quebra e disfunções da barreira pulmonar, resultando em edema alveolar formado pelo conteúdo plasmático (73).

Segundo dados clínicos, o pulmão é o segundo maior órgão afetado durante a malária grave, ocorrendo em 50% dos casos por infecção pelo *P. knowlesi* (85) e 20% da malária grave causada pelos parasitos *P. falciparum* (74) e *P. vivax* (75). Análise “post mortem” de casos de malária grave mostrou sinais característicos de SDRA induzida pela malária (MA-SDRA), como edema pulmonar rico em conteúdo plasmático, espessamento dos alvéolos, congestão dos vasos e infiltrado inflamatório. A MA-SDRA é mais frequentemente observada em adultos (20-40 anos) e muitas vezes progride para uma rápida deterioração e um prognóstico ruim com taxas de letalidade de até 80%, apesar do tratamento com antimalárico (76).

O sequestro de eritrócitos infectados nos vasos do tecido pulmonar desencadeia uma resposta inflamatória local (Figura 3), dano da barreira endotelial, aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de plasma para o interstício, resultando em edema (77). O comprometimento da barreira epitelial também pode ocorrer e promove o extravasamento de fluido para o alvéolo. Análise histológica do pulmão de pacientes “post-mortem” revelou o acúmulo de monócitos e macrófagos nos capilares, interstício e, em alguns casos, nos alvéolos. Quimiocinas, como CXCL1, estão relacionadas com o recrutamento e acúmulo leucocitário no parênquima do

pulmão (78). Os monócitos recrutados participam da remoção dos eritrócitos infectados (79).

Além dos monócitos e macrófagos, linfócitos e poucos neutrófilos também são encontrados no pulmão durante a MA-SDRA (80,81). Citocinas pró-inflamatórias, como $\text{IFN-}\gamma$ e $\text{TNF-}\alpha$, são capazes de aumentar a capacidade de processamento e apresentação de antígeno das células endoteliais promovendo a ativação dos linfócitos T CD8 via molécula de MHC I (77,82).

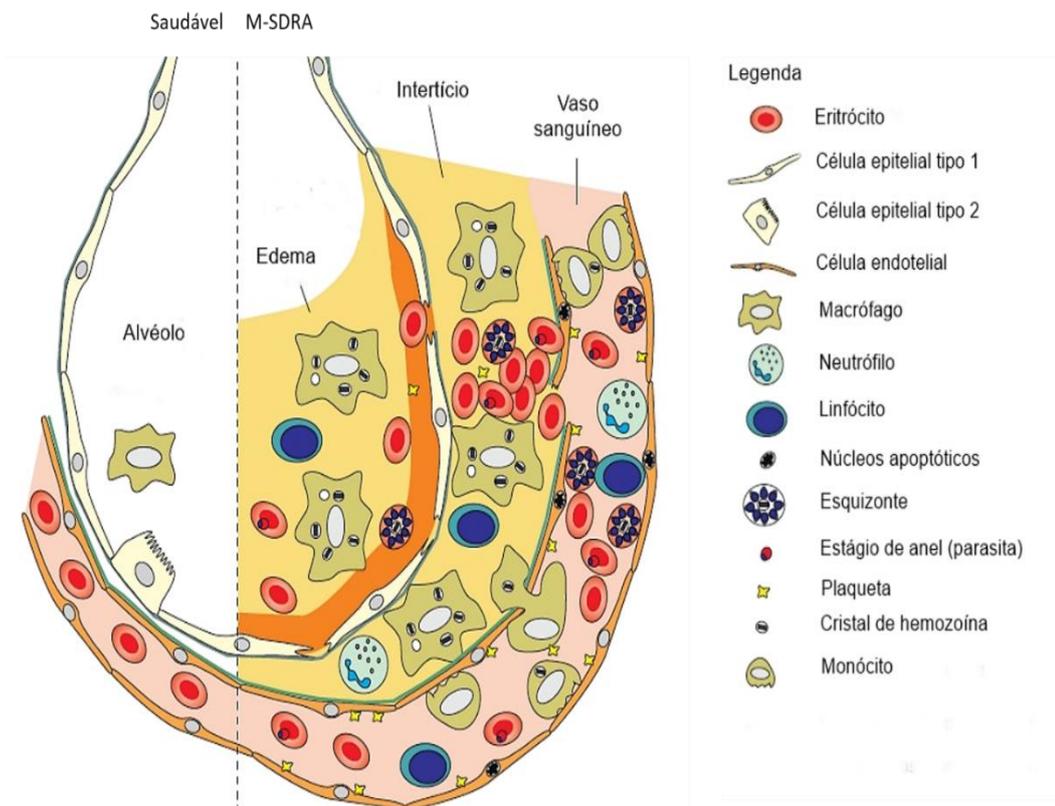


Figura 3. Imunopatogênese da MA-SDRA Componentes celulares envolvidos na síndrome do desconforto respiratório associada à malária (MA-SDRA). O sequestro de hemácias parasitadas ao endotélio desempenha um papel importante na iniciação e amplificação da imunopatologia local. Durante o sequestro há ativação do endotélio, fazendo com que haja aumento da permeabilidade vascular. Células da circulação principalmente monócitos, linfócitos e alguns neutrófilos podem atravessar a barreira hematoalveolar chegando ao interstício do pulmão, provocando o espessamento intersticial. Os cristais de hemozoína, produzidos pelo parasito, também podem ser encontrados em fagócitos, sendo capazes de induzir inflamação pulmonar. Danos e apoptose de células endoteliais resultam em rompimento da barreira endotelial e micro-hemorragias. O edema alveolar, espessamento do interstício e, presumivelmente, também diminuição do fluxo sanguíneo resultam em troca gasosa prejudicada e hipoxemia grave. Fonte: Adaptado de Van den Steen e colaboradores, 2013.

1.2 Macrófagos

Os macrófagos, assim como os monócitos e DCs são células que possuem precursores mieloides, componente da resposta de imunidade inata, e apresentam importante papel ao longo da infecção pelo parasito da malária. Os macrófagos podem ter diferentes origens: os residentes no tecido, têm origem do saco vitelino e fígado fetal, durante o estágio pré-natal, sendo programados de forma específica por fatores locais (83,84), e recebem nomenclaturas próprias, como micróglia (cérebro), células de Kupffer (fígado) e macrófago alveolar (pulmão) (85). Estes macrófagos são conhecidos como células de vida longa e que se auto renovam (86). Os macrófagos também podem ter origem a partir de monócitos circulantes recrutados da corrente sanguínea para o tecido. Ou seja, os macrófagos são células residentes do tecido ou infiltradas, críticos para a resposta imune, desenvolvimento normal do tecido, homeostasia e/ou reparo tecidual. A composição de macrófagos presentes em cada tecido/órgão é dependente de um balanço dinâmico de macrófagos recrutados e residentes do tecido. Este balanço é normalmente regulado por diferentes fatores, como a entrada de um patógeno no tecido/órgão. Mas independente de sua origem, os macrófagos são plásticos e podem apresentar fenótipos distintos em resposta a estímulos patogênicos e citocinas presentes em seu microambiente.

O potencial dos macrófagos em adotar diferentes fenótipos funcionais, em resposta a sinais patogênicos e de citocinas, levou a descrição pragmática (quase que para fins didáticos) de dois subtipos de macrófagos: os classicamente ativados (M1), e os alternativamente ativados M2. Macrófagos M1 são induzidos por PAMPs, DAMPs e citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α . Além disso, possuem alta atividade microbicida e tumoricida, e secretam citocinas e mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 β , IL-6, TNF- α e óxido nítrico (87). Embora os macrófagos M1 sejam importantes para a defesa do hospedeiro, principalmente contra patógenos intracelulares, sua ativação deve ser bem controlada. As citocinas e mediadores produzidos por estas células, se não regulados apropriadamente, podem levar ao dano tecidual e patologias, como observado na artrite reumatoide (88). Na malária, a produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos esplênicos está associada ao desenvolvimento de formas graves da doença (50). Já os macrófagos M2, tiveram sua nomenclatura expandida a M2a, M2b, M2c e M2d na tentativa de

incluir todos os outros tipos de macrófagos, que são induzidos por diferentes mediadores e apresentam funções distintas (89). Mesmo com a expansão na nomenclatura, esta ainda é uma forma simplificada de apresentação da plasticidade dessas células, onde todos os subtipos dos macrófagos não são contemplados.

Os macrófagos apresentam um estado funcional de contínua variação, dependendo do sinal ou conjuntos de sinais que esta célula está processando no momento. Atualmente, outra forma de classificação dos macrófagos tem sido utilizada (90). Baseado em suas funções, estas células podem ser classificadas em três populações: macrófagos classicamente ativados (envolvidos na defesa do hospedeiro), macrófagos regulatórios e macrófagos de reparo tecidual (Figura 4). A classificação dos macrófagos, na verdade, deve relacionar o fenótipo, função e contexto.

Os macrófagos de reparo tecidual são induzidos por citocinas como IL-4 e IL-13. Estes macrófagos expressam arginase-1 e o receptor de manose (CD206) e produzem TGF- β entre uma variedade de fatores que estimulam a proliferação, diferenciação e ativação de fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais e células-tronco e progenitoras que facilitam o reparo tecidual (91). Durante os estágios posteriores do processo de reparo, estimulados por IL-10 e pela fagocitose de células apoptóticas e imunocomplexos, eles assumem um fenótipo regulador pró-resolução. Os macrófagos regulatórios apresentam atividade anti-inflamatória, expressam arginase-1 e produzem citocinas imunossupressoras como IL-10 e TGF- β , garantindo que a resposta inflamatória que danifica o tecido seja suprimida e a arquitetura normal do tecido seja restaurada. Se o processo não for controlado de maneira eficaz, os processos de inflamação persistente e/ou reparo não adaptativo podem levar à fibrose destrutiva do tecido (91).

Os macrófagos de reparo tecidual e regulatórios (ou, de acordo com as suas primeiras classificações, macrófagos alternativamente ativados ou M2), também, podem estar associados a doenças. Os macrófagos associados ao tumor (TAMs), por exemplo, são as principais células infiltradas no microambiente tumoral. Esses macrófagos apresentam função imunossupressora, com secreção de IL-10 e TGF- β , promovendo o desenvolvimento tumoral (92). De forma semelhante, os macrófagos

M2 (assim classificado pelos autores) foram correlacionados com a progressão da infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (93,94) .

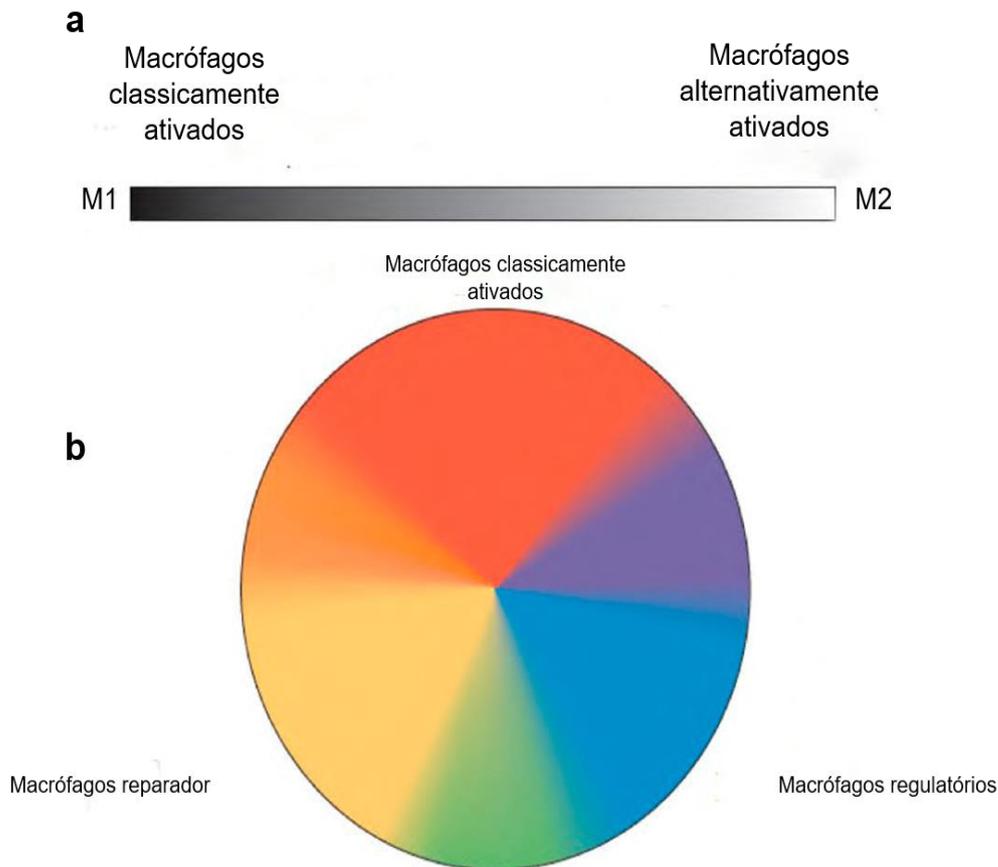


Figura 4. Espectro esquemático dos tipos de macrófagos (a) Uma representação monocromática da nomenclatura mostrando a escala linear das duas designações de macrófago, M1 e M2. (b) As três populações de macrófagos organizadas de acordo com as três cores primárias, onde, vermelho designando macrófagos classicamente ativados, amarelo designando macrófagos reparador tecidual e azul designando macrófagos reguladores. As cores secundárias, como o verde, podem representar macrófagos associados a tumores que possuem muitas características de macrófagos reguladores, mas também compartilham algumas características de macrófagos em cicatrização. Em indivíduos com obesidade, macrófagos reparadores podem transitar para um fenótipo de macrófago não-convenionalmente ativado. Fonte: Adaptado de Mosser, D e Edwards, J, 2008.

1.2.1 Macrófagos pulmonares

Os macrófagos alveolares são células residentes do pulmão, localizadas no lúmen alveolar e, como descrito anteriormente, são células de origem embrionária e de vida longa. Estas células são essenciais para a manutenção da homeostase pulmonar através da remoção de partículas inaladas, poeira, poluentes, patógenos e na regulação/homeostase de surfactante (95). Diferente dos demais macrófagos do pulmão e dos macrófagos residentes de outros tecidos, os macrófagos alveolares podem ser identificados por diferentes marcadores; são células SiglecF⁺, CD11c^{hi}, CD11b^{low} e F4.80^{low}. Os macrófagos alveolares também expressam altos níveis de CD206, que reconhece carboidratos presentes nos patógenos, e os receptores *scavengers* SR-A e MARCO que atuam na remoção de partículas (96). Já os macrófagos intersticiais do pulmão são F4.80⁺ e CD68⁺.

Na homeostase, macrófagos alveolares apresentam o fenótipo imunossupressor de macrófagos regulatórios ou M2. Porém, quando há algum estímulo inflamatório, os monócitos circulantes podem ser recrutados para o lúmen alveolar e interstício, onde se diferenciam em macrófagos classicamente ativados ou M1 (97,98). A polarização de macrófagos derivados de monócitos em um perfil M1 durante a malária por *P. falciparum* está associada a danos teciduais e à gravidade da doença (99). Interessantemente, os macrófagos alveolares têm sido implicados na patogênese da SDRA (100), porém seu papel na MA-SDRA permanece a ser demonstrado.

1.3 Granulócitos: eosinófilos e neutrófilos

Os eosinófilos inflamatórios são células que possuem progenitores mieloides, requerem IL-5 para sua produção na medula óssea e são fenotipicamente caracterizados pela expressão de Siglec-F, F4/80, CD125 e CCR3 (101). Os eosinófilos uma vez recrutados para o tecido são considerados efetores na resposta principalmente à infecção por helmintos ou alergias e essa resposta imune é mediada pelos efeitos nas atividades das células T, resultando em um perfil de resposta imune Th2 (102). No tecido pulmonar, essas células liberam leucotrienos e outros fatores como, metaloproteinases, envolvidos na remodelação das vias aéreas. Os

leucotrienos secretado pelos eosinófilos são potentes broncoconstritores e mantêm o influxo de eosinófilos para o tecido pulmonar (103).

Os neutrófilos são também conhecidos como polimorfonucleares, produzidos pela medula óssea a partir de progenitor mieloide e estão em grande número na corrente sanguínea (104). Essas células atuam como primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos invasores no tecido. Uma vez na circulação sanguínea estão em constante patrulhamento para qualquer sinal de infecção ou estímulo tecidual (105). Uma vez sinalizados, os neutrófilos deixam a circulação sanguínea de forma a iniciarem o processo de transmigração celular para o tecido, desde o rolamento e ativação da selectinas e integrinas no endotélio até a entrada completa da célula no tecido. Embora se saiba da heterogeneidade dos neutrófilos nas mais variadas patogenias, essas células possuem três principais mecanismos pelas quais exercem atividade antimicrobianas: fagocitose, degranulação e liberação das redes extracelulares de neutrófilos (NETs) (106,107).

1.4 Modelos experimentais de malária: breve descrição do modelo murino

A descoberta dos parasitos de aves e pequenos mamíferos permitiu o desenvolvimento de modelos experimentais não primatas para o estudo e compreensão da malária humana. Atualmente estes estudos foram alavancados com o desenvolvimento de modelos experimentais de malária murina. São quatro espécies de *Plasmodium* que infectam roedores: *P. berghei*, *P. chabaudi*, *P. vinckei*, e *P. yoelii* (108,109). Estudos mostraram um alto nível de conservação (de cerca de 85%) entre os genes de *P. falciparum*, *P. berghei*, *P. chabaudi* e *P. yoelii*, em termos de conteúdo e ordem de seus respectivos materiais genéticos (110). Os parasitos de roedores ao infectarem camundongos, geneticamente distintos, formam modelos experimentais atraentes para o estudo da resposta imune, resistência a drogas e estudo dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento das formas graves da doença, como anemia, MC e MA-SDRA. A infecção de camundongos DBA/2 com *P. chabaudi*, por exemplo, tem sido utilizado para a compreensão de resistência a drogas e variação antigênica (111). Os modelos de infecção de camundongos das linhagens CBA, BALB/c e C57BL/6 com *P. yoelii* têm sido utilizados para o estudo da biologia,

imunidade inata e adquirida durante o estágio hepático (112). Estudo prévio mostrou que a infecção de camundongos BALB/c com *P. vinckei* leva a danos pulmonares, com aumento de leucócitos no pulmão em animais com alta parasitemia (113). Já o modelo de infecção de camundongos C57BL/6 com *P. berghei* ANKA (*PbA*) tem sido amplamente utilizado para estudos que visam o entendimento da infecção em reticulócitos, seu sequestro nos órgãos e bloqueio da microvasculatura (114) com, conseqüente desenvolvimento da MCE, acidose metabólica, disfunção hepática e síndrome respiratória (114). Isto mostra que, juntamente com as complicações cerebrais, há o desenvolvimento de patologia pulmonar com aumento de conteúdo intersticial leucocitário e hemorragia limitada. Os animais BALB/c infectados com *PbA*, diferentemente de C57BL/6 parasitados, são considerados resistentes à MCE e parcialmente resistentes ao desenvolvimento da malária pulmonar (77). Apesar do comprometimento pulmonar ser uma complicação da malária de importância reconhecida, pouco conhecemos sobre sua patogênese (115). Compreender a dinâmica das populações celulares no pulmão ao longo da infecção é necessário para o desenvolvimento de estratégias clínicas eficazes. Assim como o melhor entendimento dos mecanismos de programação e plasticidade funcional dos macrófagos alveolares permitindo novas abordagens de manipulação terapêutica dessas células.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Investigar a cinética de recrutamento das células do sistema imune inato para o pulmão e o perfil de polarização dos macrófagos alveolares após a infecção de camundongos C57BL/6 e BALB/c com *Plasmodium berghei* ANKA (*PbA*).

2.2. Objetivos específicos:

1. Caracterizar o curso da parasitemia e sobrevida de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com *PbA*, e assim confirmar dados prévios da literatura

sobre a resistência e suscetibilidade destas linhagens de camundongos à malária grave;

2. Investigar alterações na função pulmonar, formação de edema e no número total de leucócitos no lavado broncoalveolar em camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com *PbA*;
3. Caracterizar fenotipicamente as células inflamatórias mieloides e sua cinética de recrutamento para o pulmão de camundongos C57BL/6 e BALB/c durante a fase eritrocítica da infecção;
4. Identificar os padrões de citocinas e enzima (iNOS e arginase) presentes no lavado broncoalveolar de camundongos C57BL/6 e BALB/c parasitados;
5. Avaliar a plasticidade fenotípica e funcional de macrófagos alveolares de camundongos C57BL/6 e BALB/c parasitados, através da expressão de diferentes marcadores (MHC classe II, arginase, iNOS e CD206).

3. Metodologia

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 e BALB/c fêmeas, com idade entre 6-8 semanas, fornecidos pelo centro de criação do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os animais foram mantidos no biotério do Pavilhão Leonidas Deane com temperatura controlada de 25 °C, livre acesso à água e ração, e submetidos a ciclos de claro/escuro de 12 horas até o momento de uso. Anterior ao início dos experimentos, os animais foram tratados via oral (gavagem) com antimicrobiano à base de enrofloxacino (Baytril®), na concentração de 2 mg/mL (200 µL por animal), por cinco dias. Ao final do tratamento, os animais ficaram em repouso por duas semanas para restabelecimento da microbiota. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IOC/Fiocruz (L-041/2016 e L-029/2020).

3.2 Parasito e infecção

Foi utilizada a cepa de *Plasmodium berghei* ANKA (*PbA*) transfectada com proteína verde fluorescente (GFP) (116). Anterior à infecção, camundongos C57BL/6 e BALB/c (1-2 animais/linhagem) foram inoculados, via intraperitoneal (i.p), com 100-150 µL de sangue contendo eritrócitos parasitados criopreservados. No 4° dia após a infecção, os animais foram anestesiados com 100 µL de uma solução composta por quetamina (150 mg/kg), xilazina (10 mg/kg) e tampão fostato salino (PBS) qsp., e o sangue total coletado por punção cardíaca com o uso de uma seringa contendo heparina. Foram avaliados a porcentagem de eritrócitos parasitados da amostra (parasitemia de 5-10%) por citometria de fluxo (FACS Canto II - BD Bioscience) e a hematimetria (contagens de eritrócitos totais) em câmara de Neubauer para o cálculo e diluição do sangue, em PBS, na concentração final de 1×10^7 eritrócitos parasitados/mL. Os animais BALB/c e C57BL/6 dos grupos experimentais foram imobilizados e inoculados via i.p no quadrante inferior direito do abdômen com 1×10^6 eritrócitos parasitado/100 µL, diluídos em PBS. Os grupos controles foram inoculados com o mesmo volume de PBS. A parasitemia foi monitorada nos dias 4 e 6 após a infecção por citometria de fluxo (FACS Canto II – BD Bioscience).

3.3. Sobrevida e curso clínico

Após infecção (como descrito acima), os animais foram mantidos no biotério e o óbito conferido diariamente para análise da taxa de sobrevida. Os resultados foram expressos como porcentagem de animais vivos. Em um segundo grupo de experimentos foram analisados, nos dias 4 e 6 após infecção, a parasitemia, peso e temperatura corporal (Figura 5). Animais não infectados (grupo Controle) foram avaliados em paralelo. A parasitemia foi verificada através da 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⁺) foi determinada utilizando o programa FlowJo v.10.0. A temperatura corporal foi mensurada utilizando o termômetro retal (OAKTON). Em seguida, os animais foram anestesiados com 100 µL de uma solução contendo quetamina (150 mg/kg), xilazina (10 mg/kg) e PBS qsp., e pesados em balança de precisão.

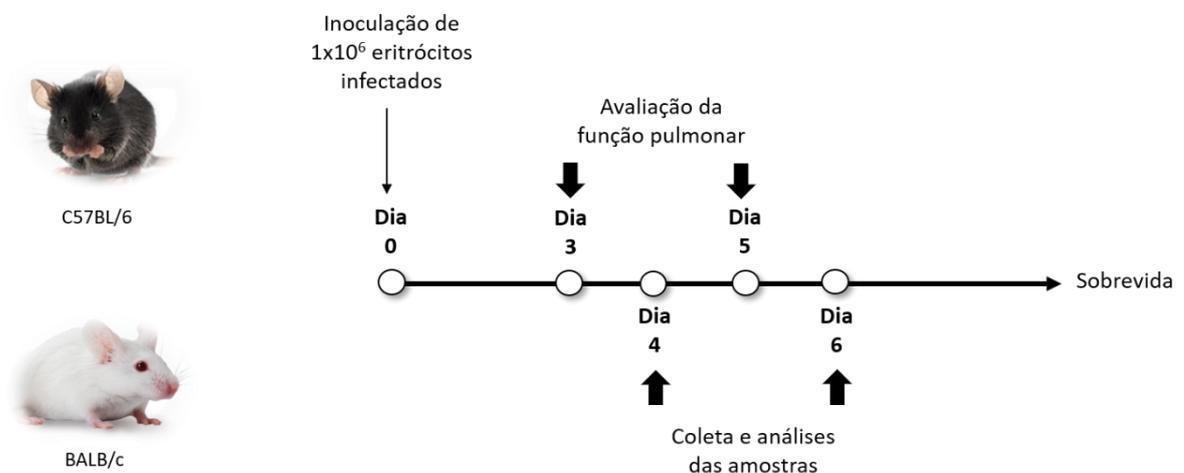


Figura 5. Desenho experimental. Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram infectados com 1×10^6 eritrócitos parasitados com PbA-GFP⁺ via intraperitoneal. Foram avaliados: 1. Sobrevida (acompanhada até 20 dias após a infecção); 2. Função pulmonar (dias 3 e 5 após a infecção); 3. Parasitemia, temperatura, peso corpóreo, quebra da barreira hematoalveolar e coletados o BAL e tecido pulmonar (dias 4 e 6 após a infecção).

3.4 Avaliação da disfunção pulmonar

No 3° e 5° dia após a infecção, animais parasitados ou não (grupos Controle) foram submetidos a um teste para avaliação da mecânica respiratória, sem a necessidade de anestesia ou imobilização. A avaliação pela pletismografia barométrica de corpo inteiro não invasiva foi realizada com uso do aparelho BUXCO® (Harvard Biosciende, Inc). O sistema de pletismografia é baseado em câmaras individuais, nas quais os animais foram colocados e as câmaras foram vedadas. Os camundongos foram analisados por 5 minutos e o padrão de respiração foi registrado. Um transdutor de pressão sensível é conectado para medir mudanças na pressão de dentro da câmara e a média de todos os parâmetros ventilatórios [Tempo de expiração (Te), Tempo de relaxamento (RT), Tempo de inspiração (Ti), Pico de fluxo inspiratório (PIF), Pico de fluxo expiratório (PFE), Volume corrente (TV), Volume de expiração (EV), Volume minuto (VM), Frequência respiratória (Freq), Pausa Inspiratória Final (EIP), Pausa Expiratória Final (EEP), Pausa Avançada (PenH)] foram determinados pelo software *Buxco Fine Pointe*. Os tempos de 3 e 5 dias após a infecção, para avaliação da função pulmonar, foram determinados a partir da logística experimental.

3.5 Avaliação da quebra da barreira hematoalveolar

No 4° e 6° dia após infecção, após aferição da temperatura e coleta de sangue pela cauda para avaliação da parasitemia, os animais parasitados ou controles foram anestesiados, pesados e inoculados com 100 µL de uma solução de Azul de Evans 2% no plexo orbital (via intravenosa). Após 1 hora, os animais foram mortos e seus pulmões extraídos. Os órgãos foram pesados e armazenados individualmente em 3 mL de formamida PA (Sigma-Aldrich®), na estufa a 37 °C por 48 horas. Após este período, o sobrenadante foi recolhido e a absorbância mensurada por espectrofotometria (comprimento de onda de 620 nm) no aparelho Spectramax 190, Molecular Devices, CA, USA. Os resultados obtidos foram expressos em micrograma (µg) por mL de Azul de Evans por grama (g) do tecido pulmonar.

3.6 Obtenção do lavado broncoalveolar (BAL)

A coleta do lavado broncoalveolar (BAL) dos animais, parasitados ou não, foi realizada em tempos diferentes (4 e 6 dias) após infecção com *PbA*. Imediatamente após a morte, os animais foram colocados em decúbito dorsal, a assepsia foi feita, e então, realizada uma traqueostomia. A pele, camada muscular, glândulas maxilares e parótidas adjacente à traqueia foram removidas para melhor visualização da mesma. Com o auxílio de uma pinça curva, uma linha de costura foi passada por debaixo da traqueia e um nó foi feito para garantir a não saída de ar. Utilizando um cateter periférico intravenoso de 20G (\varnothing 1,1/32mm -65ml/min) (*DESCARPACK*) foi realizada uma incisão entre os anéis traqueais. A agulha foi retirada ficando somente a cânula na traqueia, pela qual foi instilado e aspirado 1 ml de PBS gelado. Após a aspiração, a solução foi recolhida e colocada em um tubo identificado com “lavado 1”. A seringa foi preenchida novamente com PBS e, acoplada à cânula, foram realizados mais dois lavados. Os tubos “lavado 1” e “lavado 2 + 3” foram centrifugados (3000 g por 5 minutos). O sobrenadante do tubo “lavado 1” foi recolhido e alíquotas congeladas para análises futuras. As células dos três lavados foram reunidas após centrifugação. Quando necessário, foi realizada a lise das hemácias com 200 μ l de Tampão de lise (Sigma-Aldrich[®]) por até 1 minuto. As células foram lavadas com PBS contendo soro fetal bovino (SFB) 5% e contadas em hemicitômetro

3.7 Obtenção de células do tecido pulmonar

Para avaliação das células no tecido pulmonar, os camundongos foram mortos e perfundidos com 20 mL de PBS. Os pulmões foram retirados, cortados em pequenos pedaços e incubados individualmente em 1 mL em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com Penicilina (100 U/MmL) e Estreptomicina (100 μ g/mL) e Liberase[®] ROCHE, na concentração de 128 μ g/mL, a 37 °C e 5% de CO₂ por uma hora. Após o tempo de ação da Liberase[®], foram adicionados 500 μ L de RPMI contendo 5% de SFB e 0,01% de DNase gelado. O tecido e o meio foram colocados sobre uma rede de nylon (Cell strainer 70 μ m - BD Biosciences[®]) em placa de 6 poços, foram adicionados mais 5 ml de meio RPMI com SFB 5 % e DNase 0,01% e, com o auxílio de um embolo de seringa, todo o tecido foi macerado. A suspensão celular foi aspirada, transferida para tubos de 15 mL e centrifugada por 10 minutos na rotação

de 1700 rpm a 23 °C. O sobrenadante foi recolhido e as células preparadas para citometria.

3.8 Imunofenotipagem das células obtidas do lavado broncoalveolar e tecido pulmonar

A fenotipagem das células foi realizada por citometria de fluxo. As células do lavado broncoalveolar e do macerado pulmonar, obtidas e processadas como descrito no item 3.6, foram transferidas para placa de 96 poços em fundo “V” e centrifugadas a 500 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas com 50 µl do marcador de viabilidade celular (LIVE/DEAD™ Fixable Violet Dead Cell Stain Kit, Invitrogen), diluído de acordo com as instruções do 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 1) diluídos no tampão de FACs (PBS 5% SFB) por 20-30 minutos a 4 °C protegido da luz. Ao final da incubação, as células foram lavadas 2 vezes com 150 - 200 µl do tampão FACs e adquiridas no citômetro de fluxo. Para a marcação intracelular, as células do BAL e tecido pulmonar foram pré-incubadas por 4 horas com GolgiPlug Brefeldin A e GolgiStop Monensin (BD Biosciences) de acordo com as orientações do fabricante antes da marcação com LIVE/DEAD. Após a marcação de superfície, as células foram fixadas e permeabilizadas utilizando o *Fixation/Permeabilization Solution Kit* (BD Biosciences) e incubadas com o *pool* de anticorpos intracelulares (Tabela 1) diluídos no tampão de permeabilização (Perm/Wash) por 30-40 minutos a 4 °C protegido da luz. Ao final da incubação, as células foram lavadas 2 vezes com 150-200 µl do tampão Perm/Wash. As amostras foram adquiridas em um citômetro de fluxo (CytoFlex ou FACS Canto II) e os dados analisados no programa FlowJo (TreeStar, Estados Unidos).

Tabela 1. Lista de anticorpos utilizados para marcação das células do BAL e tecido pulmonar

		Marcador	Fluorocromo	Clone	Marca
Superfície		Siglec F	PE	1RM44N	Invitrogen
	0.3:100	CD11b	PeCy7 ou PerCP-Cy5.5	MI/70	BD
		Ly6C	APC	1A8	BD
		Ly6G	APC-Cy7	AL-21	BD
		CD45	FITC ou BV480	104	BD
		CD11c	PerCP-Cy 5.5	HL-3	BD
		CD206	Pe-Cy7	MR6F3	Invitrogen
		I-A/I-E	BB515	2G9	BD
		F4/80	Texas Red	BM8	Invitrogen
Intracelular	1:100	INOS	APC-eFluor 780	CXNFT	Invitrogen
		Arginase	APC	AlexF5	Invitrogen

3.9. Quantificação de proteínas totais e de citocinas no lavado broncoalveolar

Os níveis das citocinas presentes no BAL dos diferentes grupos experimentais foram avaliados usando o 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). A dosagem de proteínas foi realizada utilizando o Qubit® Protein Assay Kit (ThermoFisher) e o equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer, seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen).

3.10 Dosagem de óxido nítrico

A dosagem de óxido nítrico, presente no sobrenadante do BAL de animais infectados ou não com *PbA*, foi realizado de forma indireta, através da quantificação da concentração total de nitrato/nitrito (Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit). O ensaio foi realizado conforme recomendação do fabricante (CAYMAN CHEMICAL). Resumidamente, a curva de nitrato foi realizada em duplicata com concentrações de 0 a 35 μM . As amostras foram então adicionadas (40 μL) e em seguida foram adicionadas a enzima cofator e a nitrato redutase nas amostras e na curva padrão. A placa foi coberta e incubada por 1 hora a temperatura ambiente. Após tempo de incubação, foi adicionado o reagente de Griess 1 nos poços das amostras e da curva, seguido da adição do reagente de Griess 2 também em todos os poços. Após incubação à temperatura ambiente, por 10 minutos, para desenvolvimento da cor, foi realizada a leitura, por absorvância, utilizando o aparelho Varioskan LUX multimode da ThermoFisher no comprimento de onda de 550nm.

3.11 Dosagem de arginase

A atividade da enzima arginase presente no sobrenadante do BAL foi quantificada utilizando o kit "Arginase Activity Assay" da Sigma-Aldrich®. O ensaio se baseia na produção e detecção colorimétrica de ureia, após a adição de arginina e manganês às amostras. Assim, o produto colorimétrico gerado é proporcional à atividade arginase presente nas amostras. A dosagem foi realizada de acordo com as orientações do fabricante. Resumidamente, os *vials* foram reconstituídos e o tampão

de ensaio deixado a 37°C. O padrão de ureia (1mM) foi adicionado a um dos poços. As amostras foram adicionadas (40µL) em duplicata (um poço para ensaio e outro para controle da reação). O tampão de ensaio contendo manganês e arginina foram adicionados apenas em uma das duplicatas das amostras (poço ensaio) e feita incubação a 37°C, por 3 horas, sob proteção da luz. Após o tempo de incubação, a reação foi parada adicionando o reagente de ureia (constituído pelo reagente A e B) em todos os poços. Em seguida, foi adicionado o tampão de ensaio (manganês e arginina) nos poços para controle da reação e, feita incubação à temperatura ambiente, por 60 minutos. Após esse tempo, foi feita a leitura da absorbância utilizando o aparelho Varioskan LUX multimode da ThermoFisher no comprimento de onda de 430nm.

3.12 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad Software, Estados Unidos). Os dados foram analisados pelo teste t de Student não paramétrico seguido de pós-teste Mann-Whitney. Nas análises entre as linhagens de camundongos (BALB/c e C57BL/6) foi utilizado ANOVA two-way com pós-teste de Bonferroni para variância estatística entre os grupos. Os valores foram expressos como médias \pm SEM. e $P \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. Resultados

4.1 Camundongos BALB/c e C57BL/6 parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA apresentam curso clínico da doença diferente, embora parasitemia semelhante

Camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (*PbA*) são utilizados como modelos experimentais para investigar diferentes formas clínicas da malária (117). Com a finalidade de confirmar a resistência e susceptibilidade dos camundongos BALB/c e C57BL/6 ao desenvolvimento de malária cerebral experimental (MCE), respectivamente, os animais foram inoculados com 1×10^6 eritrócitos parasitados com *PbA*-GFP. A parasitemia (Fig. 6A e B) e curso clínico da doença, através do acompanhamento da sobrevivência (Fig. 6C), peso corpóreo (Fig. 6D) e temperatura (Fig. 6E), foram analisados. A parasitemia dos animais infectados com *PbA*-GFP foi baseada na porcentagem de eritrócitos GFP⁺ nos dias 4 e 6 após a infecção (Fig. 6A e B). O percentual de eritrócitos parasitados aumentou ao longo da infecção, de forma semelhante em ambas linhagens, BALB/c e C57BL/6 (Fig. 6A e B). Embora os animais BALB/c e C57BL/6 infectados tenham apresentado nível de parasitemia similar, eles desenvolveram sinais clínicos distintos. A infecção com *PbA*-GFP levou a uma diminuição da sobrevivência dos camundongos C57BL/6, onde todos os animais parasitados morreram no 7^o dia após a infecção (Fig. 6C). Em contrapartida, 75% dos camundongos BALB/c sobreviveram os primeiros 9 dias de infecção, enquanto os demais foram a óbito tardiamente (Fig. 6C). Na análise de peso corporal não foi observada diferença significativa nos animais BALB/c, 6 dias após a infecção, quando comparados ao grupo Controle. Já nos camundongos C57BL/6 no 6^o dia houve uma diminuição no delta do peso corporal quando comparado aos animais não infectados (grupo Controle) (Fig. 6D). Além da perda da massa corpórea, os animais C57BL/6 infectados, apresentaram hipotermia no 6^o dia após a infecção, quando comparados com os animais não infectados (Fig. 6E). Essa hipotermia também foi observada no 6^o dia após a infecção nos camundongos BALB/c, quando comparados ao grupo Controle. Contudo, os animais C57BL/6 apresentaram uma redução significativa na temperatura quando comparados os animais BALB/c, 6 dias após a infecção.

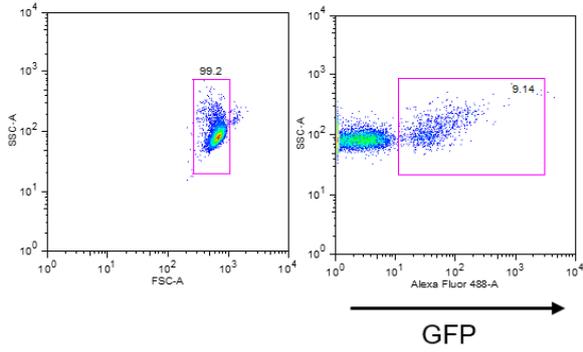
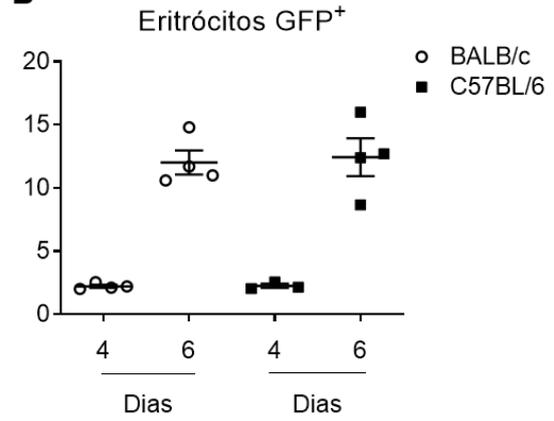
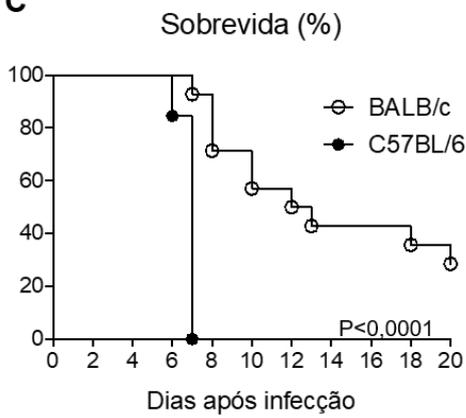
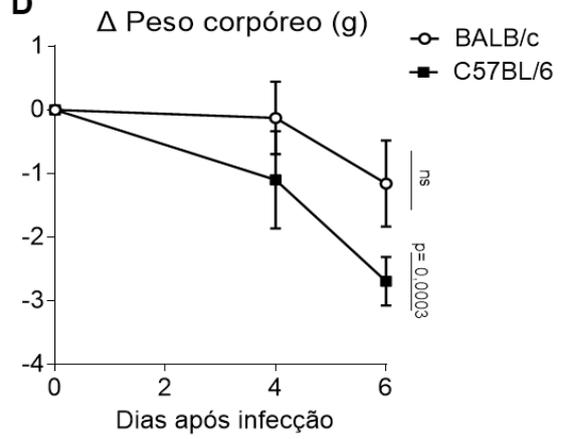
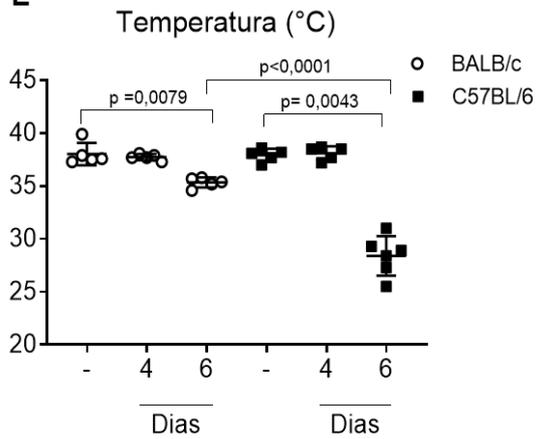
A**B****C****D****E**

Figura 6. Curso da infecção com *PbA*-GFP e progressão da doença. Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram inoculados com 1×10^6 eritrócitos parasitados com *PbA*-GFP via intraperitoneal. (A) *Dot plot* representativo dos eritrócitos GFP⁺. (B) Percentual de eritrócitos parasitados (GFP⁺) nos dias 4 e 6 após a infecção. (C) Curva de sobrevivência, em percentual, dos animais BALB/c e C57BL/6 infectados. (D) Delta do peso corpóreo entre os animais controle (não infectados) e infectados, expresso em gramas (g). (E) Temperatura corporal expressa em graus centígrados (°C). Grupos: Controle (-), 4 dias e 6 dias após a infecção. Dados representativos de 2 ou mais experimentos (B e C) ou compilados de dois ou mais experimentos independentes com N= 8-12 animais por grupo (D e E). As amostras foram analisadas pelo teste t de *Student* não paramétrico seguido de pós-teste Mann-Whitney. Na da curva de sobrevivência (C) foi utilizado o teste estatístico *Log-Rank* e nos dados de peso corpóreo (E) foi utilizado ANOVA two-way com pós-teste Bonferroni para variância estatística entre os grupos BALB/c e C57BL/6 no dia 6 após infecção. Os valores foram expressos como médias \pm SEM. $P \leq 0,05$

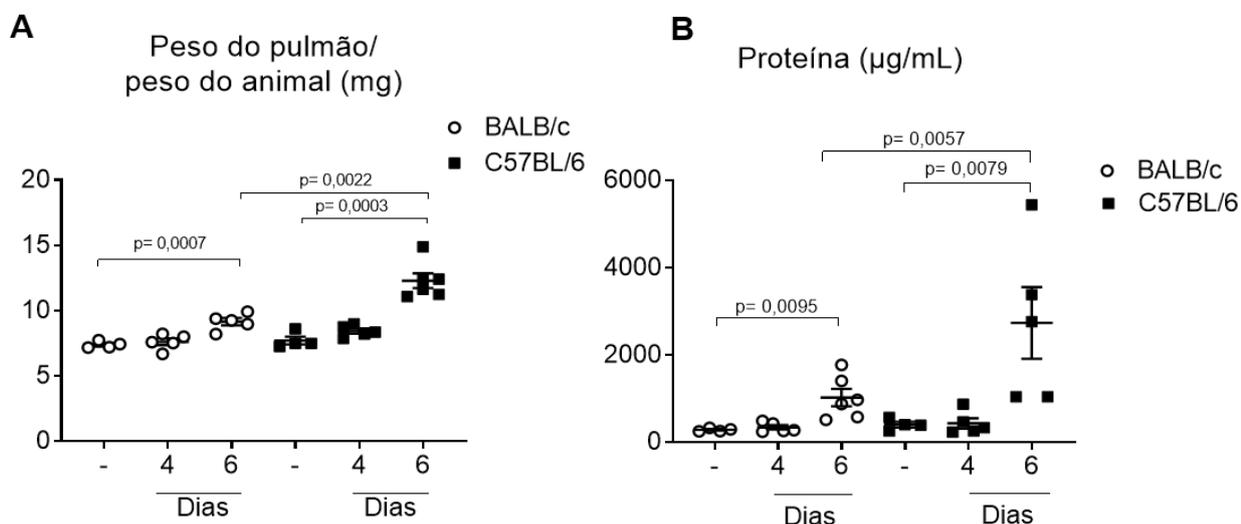
4.2 A infecção com *Plasmodium berghei* ANKA promove edema e disfunção pulmonar em camundongos C57BL/6

Pacientes com malária cerebral (MC), forma severa da doença observada principalmente após infecção pelo *P. falciparum*, também apresentam disfunção de diferentes tecidos e órgãos, como o pulmão (118). A fim de avaliar se o nosso modelo de MCE (animais C57BL/6 infectados com *PbA*) apresenta quebra da barreira hematoalveolar e consequente edema pulmonar, animais de ambas linhagens (C57BL/6 e BALB/c) foram infectados com 1×10^6 eritrócitos parasitados e, nos dias 4 e 6 após a infecção, foram verificados o peso dos pulmões dos animais controle e parasitados (Fig. 7A), a concentração de proteínas totais no lavado broncoalveolar (BAL) (Fig. 7B) e o extravasamento de proteínas plasmáticas, através do ensaio de Azul de Evans (Fig. 7C).

Os animais BALB/c parasitados apresentaram aumento no peso do órgão no dia 6 quando comparados ao grupo Controle) e na concentração de proteína no BAL) no 6º dia após a infecção. Entretanto, não foi possível verificar alterações significativas de extravasamento de proteínas plasmáticas no pulmão desses animais no 6º dia após infecção, quando comparados com o grupo Controle (Fig.7 C). Já nos animais C57BL/6 parasitados houve um aumento no peso do órgão e no conteúdo de proteínas do BAL no 6º dia após a infecção quando comparado ao grupo Controle. A análise do extravasamento de proteínas plasmáticas para o tecido pulmonar revelou diferenças

no 4º e 6º dia após a infecção (Figura 7C). Embora os animais BALB/c parasitados tenham apresentado aumento no peso do órgão e na quantidade de proteínas no BAL, no 6º dia após infecção, o peso do órgão e a dosagem de proteínas foi significativamente maior no grupo C57BL/6 quando comparado com o BALB/c no mesmo tempo de infecção (Fig. 7A e B).

Os animais, parasitados ou não, de ambas as linhagens também foram avaliados quanto a função pulmonar através do sistema de pletismografia de corpo inteiro (BUXCO) um dia antes de serem mortos (dias 3 e 5 após a infecção). Foram verificadas a pausa respiratória (Penh) (Fig. 7D) e a frequência respiratória (Fig. 7E). A infecção aumentou significativamente o Penh e diminuiu a frequência respiratória em camundongos C57BL/6, no 5º dia após a infecção quando comparado com o grupo Controle. E em camundongos BALB/c, não houve alteração no Penh e na frequência respiratória nos tempos avaliados após a infecção com *PbA* (Fig. 7D e E).



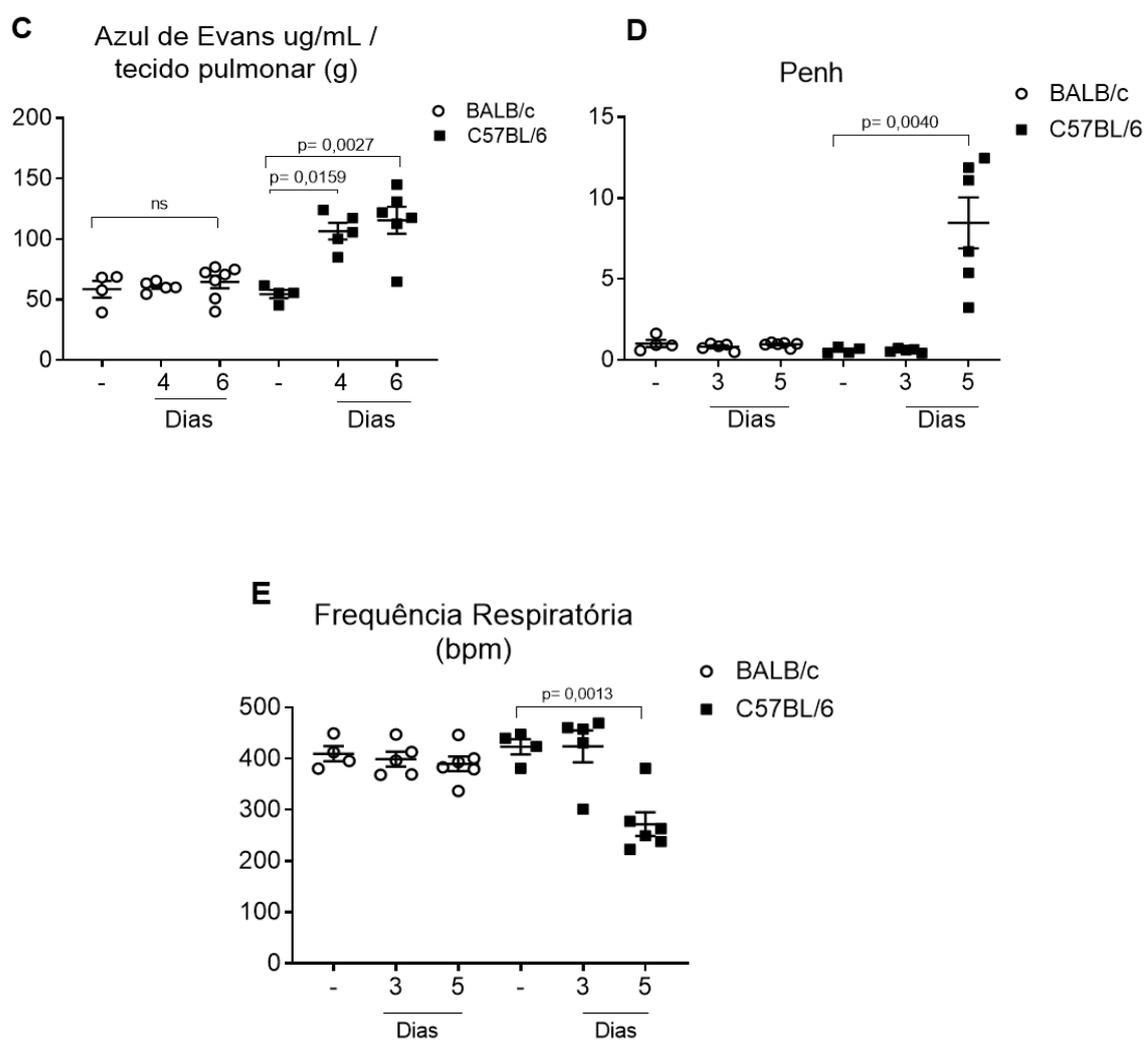


Figura 7. Desenvolvimento de edema e disfunção pulmonar em camundongos C57BL/6 infectados com *PbA*. Camundongos BALB/c e C57BL/6 receberam ou não 1×10^6 eritrócitos parasitados com *PbA*-GFP via intraperitoneal. (A) Razão entre o peso dos pulmões e o peso do animal em mg. (B) Concentração de proteínas ($\mu\text{g/ml}$) no BAL. (C) Concentração de Azul de Evans ($\mu\text{g/mL}$) por tecido pulmonar (g). (D) Pausa respiratória (Penh). (E) Frequência respiratória (bpm). Grupos: Controle (-), 4 dias e 6 dias após a infecção. Dados representativos dois ou mais experimentos (N= 4-6 animais por grupo). As amostras foram analisadas pelo teste t de *Student* não paramétrico seguido de pós-teste Mann-Whitney. Nos dados de peso (A) e concentração de proteína (B) foi utilizado ANOVA Two-way com pós-teste Bonferroni para variância estatística entre os grupos BALB/c e C57BL/6 no mesmo dia após infecção (6º dia). Os valores foram expressos como médias \pm SEM. $P \leq 0,05$.

4.3 Variações no número de células presentes no BAL de camundongos C57BL/6 e BALB/c ao longo da infecção com *Plasmodium berghei* ANKA

Durante inflamação pulmonar, células residentes e recrutadas são responsáveis pela resposta inflamatória no tecido, podendo atravessar a barreira pulmonar e adentrar o alvéolo (77). Assim, com objetivo de analisar o perfil fenotípico das células residentes do lúmen da região broncoalveolar e a cinética das células inflamatórias durante o estabelecimento da malária pulmonar experimental, o BAL dos camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados ou não foi recolhido nos dias 4 e 6 após a infecção com *PbA*. As populações de células mieloides foram identificadas através de seu tamanho e granulosidade, pela expressão da molécula CD45 e CD11b, e posteriormente classificadas com base na expressão de uma combinação de marcadores em: macrófagos alveolares (SiglecF⁺CD11c⁺), eosinófilos (CD11b⁺SiglecF⁺), neutrófilos (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C⁺) e monócitos inflamatórios (CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{hi}) como mostra a estratégia de *gates* (Fig. 8).

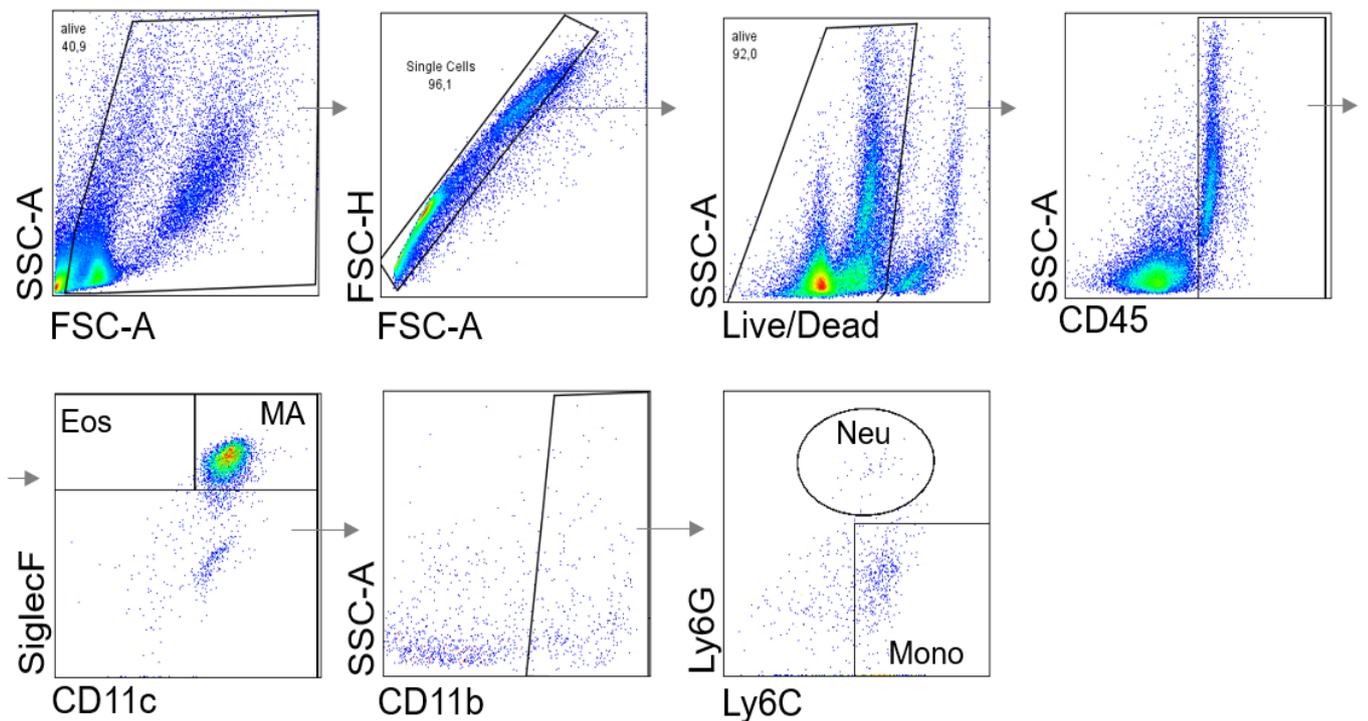


Figura 8. *Dot plots* representativos da estratégia de *gates* utilizada para identificação das células mieloides presentes no lavado broncoalveolar durante a infecção com *PbA*

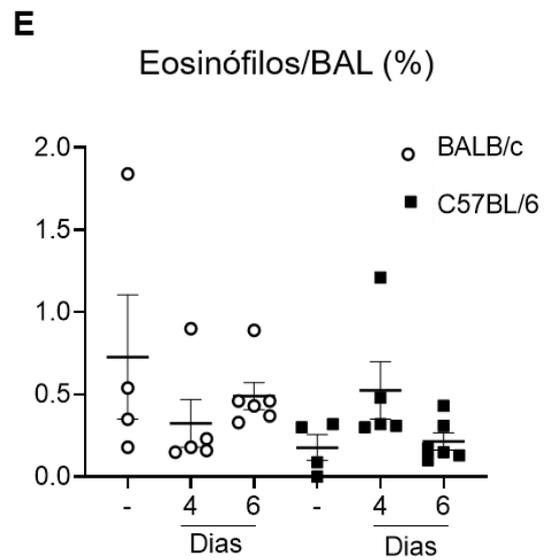
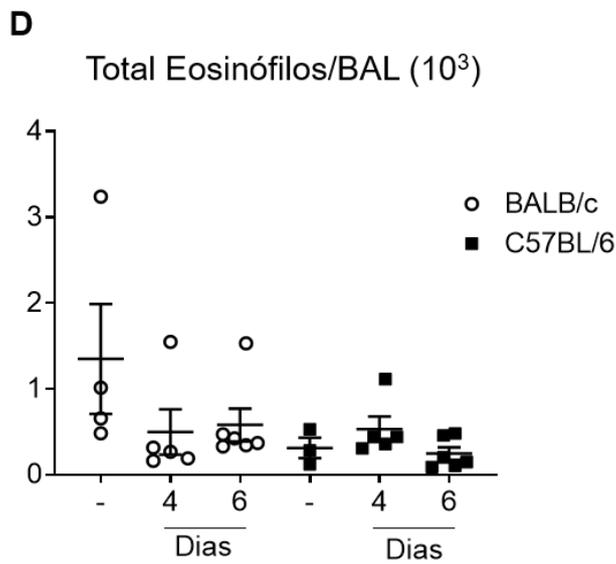
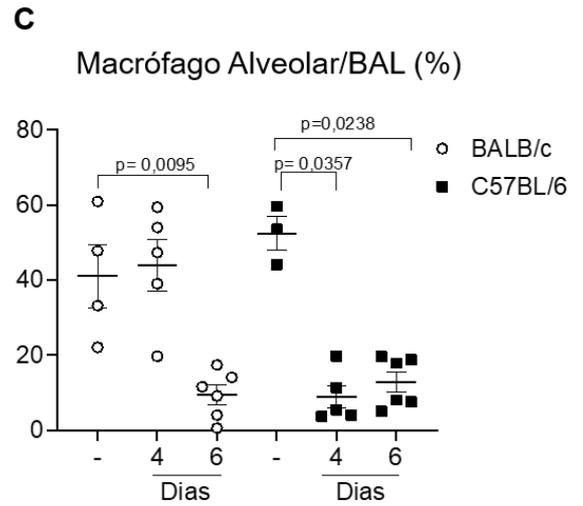
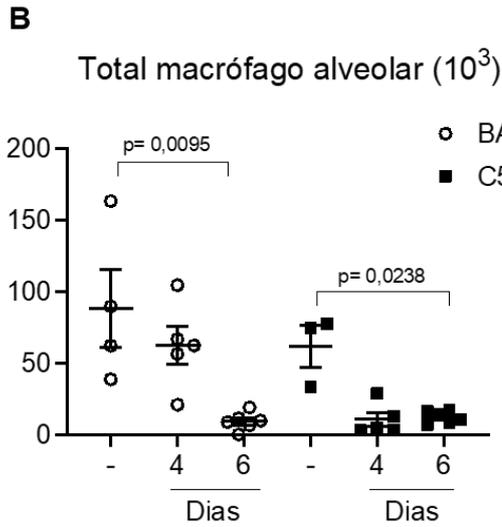
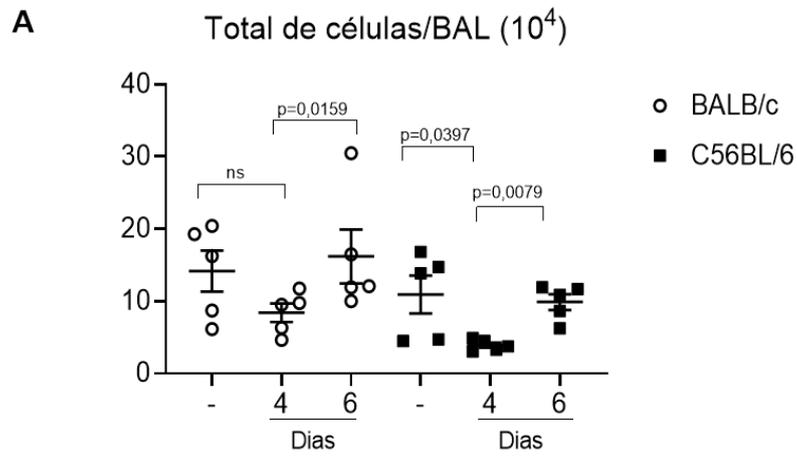
A infecção com *PbA* não alterou significativamente o número total de células no BAL nos camundongos BALB/c no 4º dia quando comparado ao Controle, mas foi

possível observar um reestabelecimento expressivo no 6° dia quando comparado ao 4° dia após infecção (Fig. 9A). Já os camundongos C57BL/6 apresentaram uma redução significativa do total de células no BAL 4 dias após a infecção quando comparado ao Controle e um aumento expressivo no total de células obtidas no 6° dia quando comparado ao dos animais do 4° dia após a infecção. (Fig. 9A).

Através da imunofenotipagem das células presentes no espaço alveolar, foi possível observar que camundongos BALB/c apresentaram redução do número total e percentual de macrófagos alveolares no 6° dia após a infecção quando comparado ao Controle (Fig. 9B e C). A infecção com *PbA* também levou a redução no número total e percentual de macrófagos alveolares nos camundongos C57BL/6 infectados quando comparado aos seus controles, porém diferente dos camundongos BALB/c, foi possível observar uma diminuição significativa já no 4° dia após a infecção nos animais C57BL/6 (Fig. 9B e C).

Entre as células mieloides investigadas, poucos eosinófilos foram observados no BAL dos camundongos BALB/c e C57BL/6 *naive* e parasitados (Fig. 9D e E). Todavia, a infecção promoveu influxo de monócitos inflamatórios para o alvéolo pulmonar, levando a um aumento no número total de monócitos inflamatórios nos camundongos C57BL/6, observado 6 dias após a infecção (Fig. 9F). Esta alteração no número total de monócitos não foi observada nos camundongos BALB/c (Fig. 9F). A análise do percentual destas células, entretanto, mostrou um aumento percentual significativo no 6° dia após a infecção tanto em camundongos BALB/c quanto C57BL/6. Contudo, é possível observar que o percentual de monócitos inflamatórios nos camundongos C57BL/6 é expressivamente maior que o do grupo BALB/c (Fig. 9G).

A análise da população de neutrófilos do BAL mostrou uma redução significativa no número total de neutrófilos logo após a infecção em ambas as linhagens de camundongos, quando comparados com seus grupos controles (Fig. 9H). Da mesma forma, houve redução significativa no percentual dessas células após a infecção em camundongos BALB/c e C57BL/6 em relação aos seus controles (Fig. 9I).



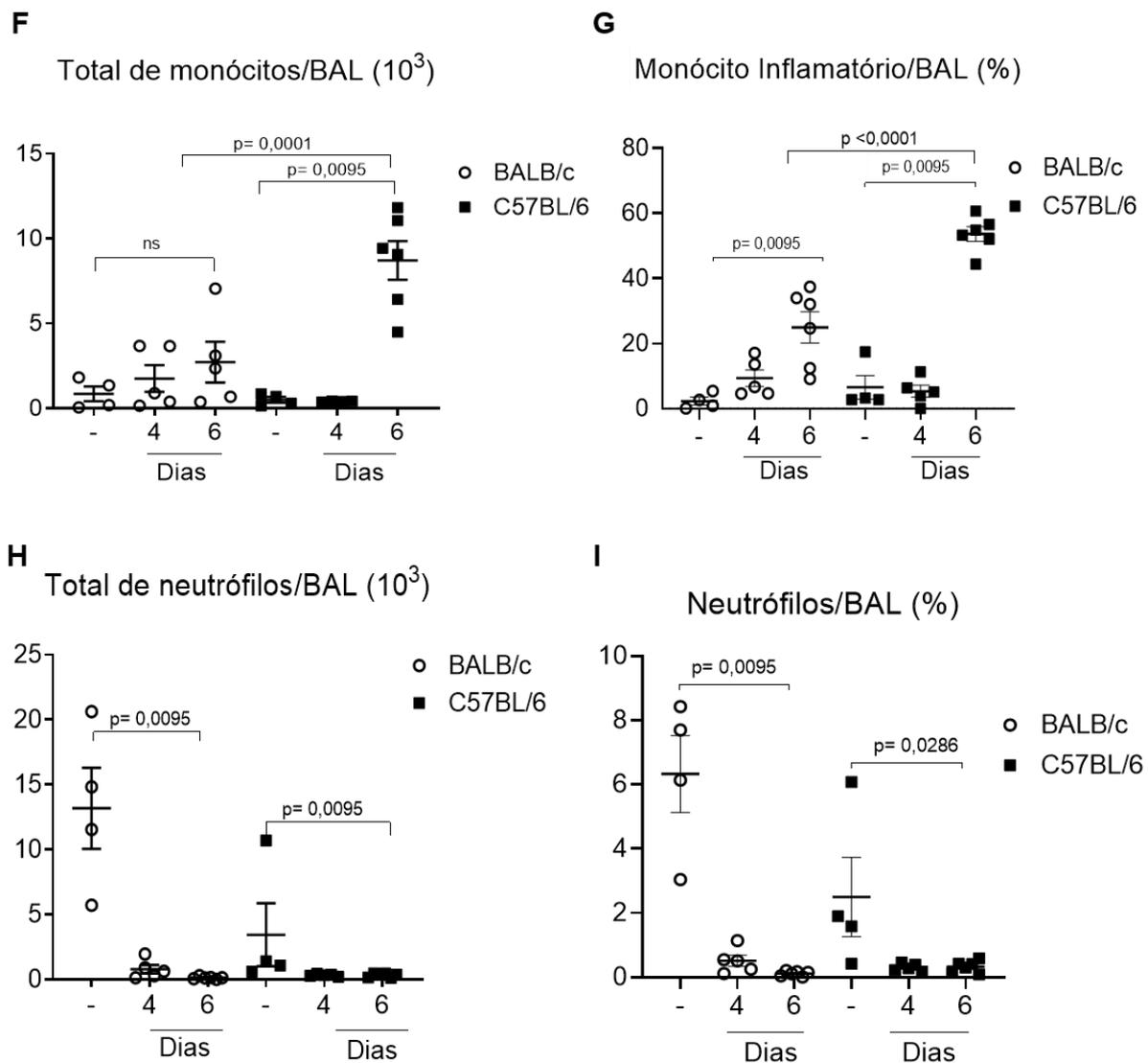


Figura 9. Cinética de recrutamento das subpopulações de células mieloide durante o estabelecimento da malária pulmonar experimental. Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram infectados ou não com *PbA*, e as células do BAL dos grupos Controle (-), 4 dias e 6 dias após infecção analisadas por citometria de fluxo. (A) Número total das células do BAL. Número total e percentual (em relação ao total de células) de (B e C) macrófagos alveolares, (D e E) eosinófilos, (F e G) monócitos inflamatórios e (H e I) neutrófilos. Dados representativos de dois ou mais experimentos independentes (N= 4-6 animais por grupo). As amostras foram analisadas pelo teste t de *Student* e os valores foram expressos como médias \pm SEM. $P \leq 0,05$. Para análise de monócitos entre as linhagens foi utilizado ANOVA Two-way com pós-teste Bonferroni para variância estatística no mesmo dia após infecção (6° dia). Os valores foram expressos como médias \pm SEM. $P \leq 0,05$.

4.4. Cinética de recrutamento de monócitos inflamatórios e neutrófilos para o tecido pulmonar de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA

Análise do perfil de células mieloides CD11b⁺CD45⁺, recrutadas para o interstício pulmonar foi possível observar que nos camundongos C57BL/6, ocorreu aumento significativo de monócitos inflamatórios observado já no 4^o dia após a infecção (Fig. 10A) comparado aos controles (Fig. 10A). Nos animais BALB/c parasitados houve um sutil aumento (não significativo) no percentual desta célula (Fig. 10A). Por outro lado, resultados mostraram redução na porcentagem de neutrófilos, no 6^o dia após a infecção, em ambas as linhagens de camundongos (Fig. 10B).

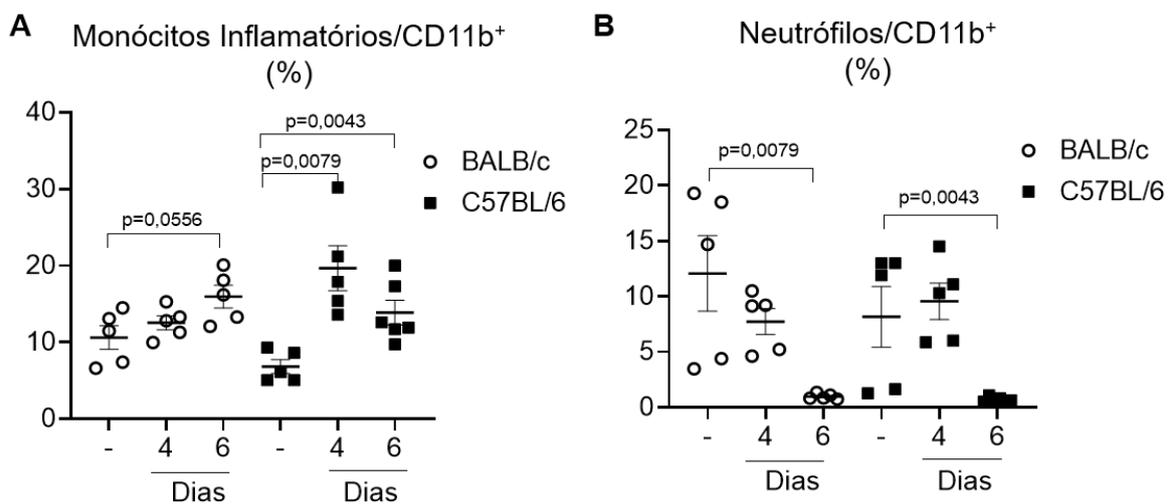


Figura 10. Análise de recrutamento de monócitos e neutrófilos para o tecido pulmonar durante a infecção com *PbA*. Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram infectados ou não com *PbA*. Células do tecido pulmonar obtidas dos grupos Controle (-), 4 dias e 6 dias após infecção foram analisadas por citometria de fluxo. (A) Percentual de monócitos inflamatórios dentro das células CD11b⁺CD45⁺. (B) Percentual de neutrófilos dentro das células CD11b⁺CD45⁺. Dados de um experimento (4-6 animais por grupo). As amostras foram analisadas pelo teste t de Student não paramétrico e os valores foram expressos como médias ± SEM. $P \leq 0,05$.

4.5 A infecção com *Plasmodium berghei* ANKA acarreta alterações na expressão de CD206, MHC II e iNOS nos macrófagos alveolares de camundongos BALB/c e C57BL/6

O perfil e a plasticidade dos macrófagos alveolares ao longo da infecção foram investigados através da expressão dos receptores CD206 e MHC classe II, e das enzimas iNOS e arginase. Todos os macrófagos alveolares expõem CD206 e MHC classe II em sua membrana e a infecção promoveu a regulação positiva na expressão desses receptores nos macrófagos alveolares de ambas linhagens de camundongos (Fig. 11A-C). Interessantemente, a média da intensidade de fluorescência (MFI) do receptor de manose, CD206, nos macrófagos alveolares no 6º dia após a infecção foi significativamente maior nos camundongos C57BL/6 quando comparada com a expressão observada nos macrófagos alveolares oriundos dos camundongos BALB/c (Fig. 11B). De forma semelhante ao observado na expressão de CD206, a molécula de MHC II foi mais expressa nos macrófagos de camundongos C57BL/6 quando comparada aos macrófagos de camundongos BALB/c no 6º dia após a infecção (Fig. 11C).

Não foi possível detectar a expressão da enzima arginase nos macrófagos alveolares de camundongos *naive* e parasitados (dados não mostrados). No entanto, foi possível observar a expressão de iNOS em aproximadamente 10% e 30% dos macrófagos alveolares dos animais BALB/c e C57BL/6 controles, respectivamente. O percentual de macrófagos alveolares iNOS⁺ reduziu de forma significativa no 6º dia após a infecção em ambas as linhagens (Fig.11D e E).

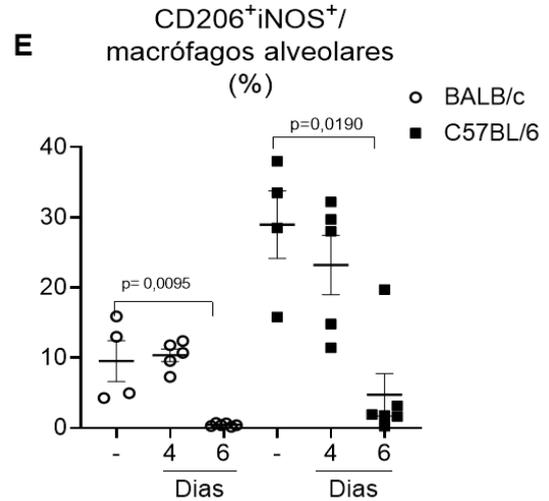
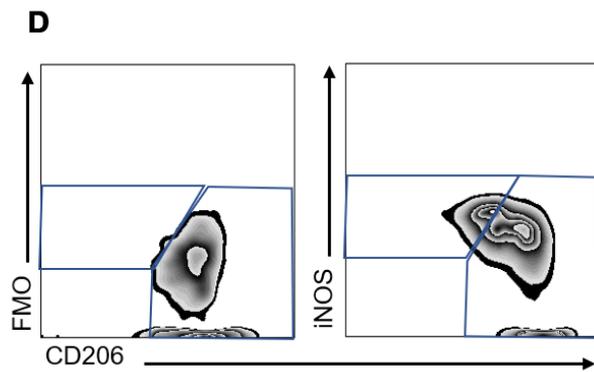
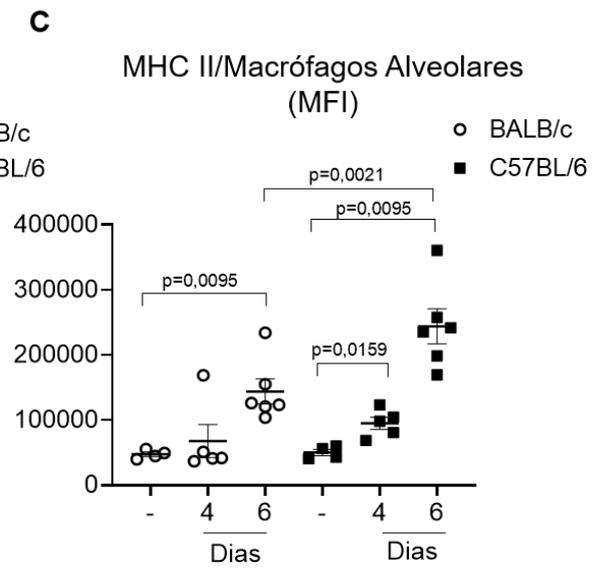
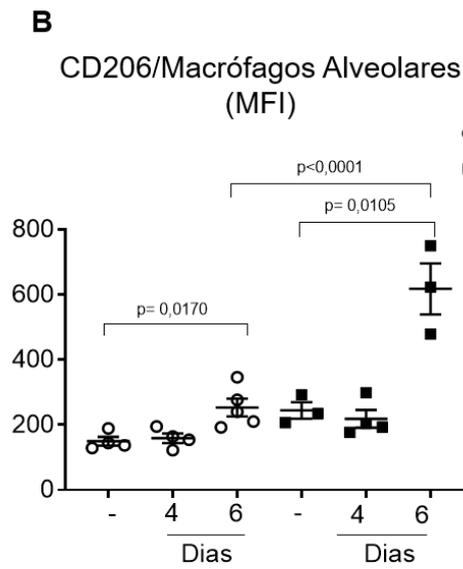
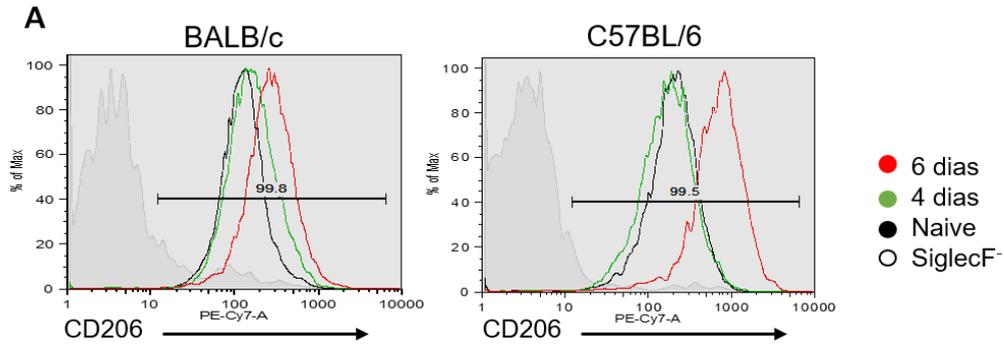


Figura 11. Alteração na expressão do receptor de manose CD206, MCH classe II e óxido nítrico sintase (iNOS). Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram infectados ou não com *PbA*, e os macrófagos alveolares dos grupos Controle (-), 4 dias e 6 dias após infecção foram analisados por citometria de fluxo. (A) Histograma representativo da expressão do receptor CD206 nos macrófagos alveolares de camundongos BALB/c e C57BL/6 (linha cinza: células SiglecF⁺; linha preta: controle, não infectado; linha verde: 4 dias após a infecção; e linha vermelha: 6 dias após a infecção). (B) Média de intensidade de fluorescência (MFI) da expressão de CD206. (C) Média de intensidade de fluorescência (MFI) da expressão de MHC II. (D) Estratégia de gates para análise dos macrófagos CD206⁺iNOS⁺. (E) Percentual de células CD206⁺iNOS⁺ dentro da população de macrófagos alveolares. Dado representativo de dois ou mais experimentos independentes (N= 4-6 animais por grupo). As amostras foram analisadas pelo teste t de Student não paramétrico. Nos dados do MFI CD206 e MFI MHC II (B e C) foi utilizado ANOVA two-way com pós-teste Bonferroni para variância estatística entre os grupos BALB/c e C57BL/6 no dia 6 após infecção e os valores foram expressos como médias \pm SEM. $P \leq 0,05$.

4.6 Camundongos C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA apresentam níveis elevados de óxido nítrico e arginase no lavado broncoalveolar

A presença do óxido nítrico e da atividade da enzima arginase no BAL nos animais infectados também foi investigada. A infecção com *PbA* não alterou os níveis de óxido nítrico no sobrenadante do BAL dos camundongos BALB/c (Controle; (Fig. 12A). Contudo, foi possível observar cerca de duas vezes mais quantidade de óxido nítrico no BAL dos camundongos C57BL/6 no 6° dia após infecção quando comparados com o grupo Controle. Mais ainda, os níveis de óxido nítrico no sobrenadante do BAL dos camundongos C57BL/6 foram maiores que os valores encontrados no BAL dos camundongos BALB/c no mesmo tempo de infecção (Fig.12 A).

De forma análoga à produção de óxido nítrico, foi observado que a infecção com *PbA* não levou a alterações na atividade da enzima arginase em camundongos BALB/c. Entretanto, foi possível observar um aumento expressivo de aproximadamente 7 vezes na atividade da arginase nos camundongos C57BL/6 no 6° dia após infecção quando comparados com o grupo (Fig.12B). A razão entre a atividade da arginase e a produção de óxido nítrico foi realizada e foi possível observar que não ocorreu alteração no balanço dessas moléculas em camundongos BALB/c. No entanto, foi observada diferença significativa na razão dessas moléculas no

sobrenadante do BAL dos camundongos C57BL/6, 6 dias após a infecção, quando comparados ao grupo Controle (Fig. 12C).

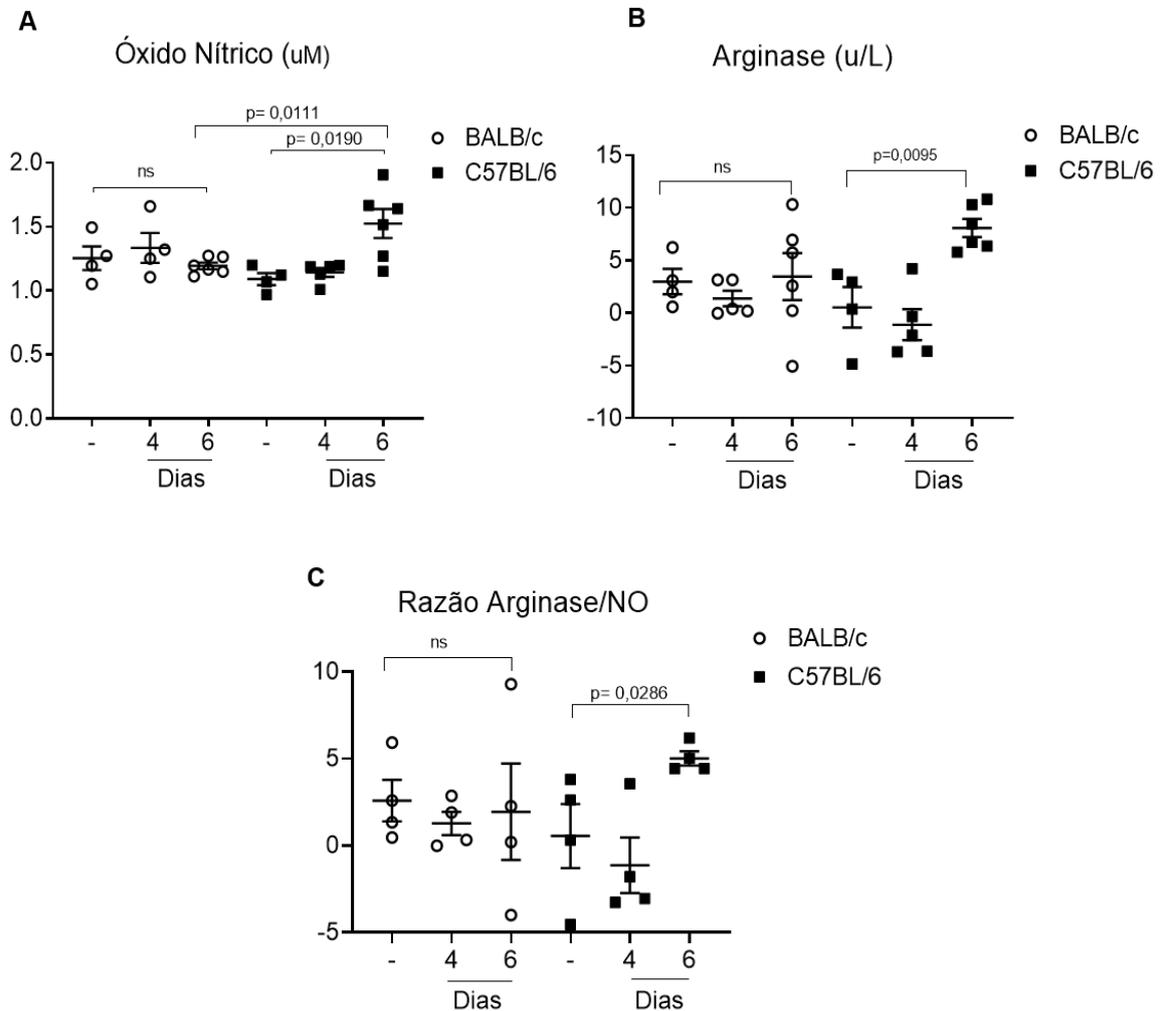


Figura 12. Níveis de óxido nítrico e atividade arginase no BAL camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *Pba*. (A) Dosagem de óxido nítrico (nitrito/nitrato) e (B) atividade arginase do sobrenadante do lavado broncoalveolar. Grupos: Controle (-), 4 dias e 6 dias após infecção. (C) Razão entre a arginase e o óxido nítrico. Dados de um único experimento (4-6 animais por grupo). As amostras foram analisadas pelo teste t de Student não paramétrico. Nos dados do óxido nítrico (A) foi utilizado ANOVA two-way com pós-teste Bonferroni para variância estatística entre os grupos BALB/c e C57BL/6 no dia 6 após infecção e os valores foram expressos como médias \pm SEM. $P \leq 0,05$.

4.7 Perfil das citocinas presentes no lavado broncoalveolar de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA

Citocinas são importantes moléculas capazes de modular a resposta local e sistêmica. Foram dosadas as citocinas TNF α , IFN γ , IL-10, IL-2, IL-4, IL-6, IL-17 do sobrenadante do lavado broncoalveolar, mas apenas TNF α , IFN γ , IL-10 e IL-2 apresentaram níveis detectáveis.

Camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *PbA* apresentam um aumento nos níveis das citocinas próinflamatórias TNF α e IFN γ no 6º dia após a infecção em relação ao grupo Controle e IFN γ (Fig. 13A e B).

A citocina IL-10 apresenta importante função no controle de respostas inflamatórias (119). A análise na produção dessa citocina no BAL não revelou diferenças significativas nos camundongos C57BL/6 ao longo da infecção. Por outro lado, os animais BALB/c apresentaram um aumento dessa citocina no sobrenadante do BAL durante a infecção, sugerindo o desenvolvimento de maior capacidade regulatória pelos animais dessa linhagem (Fig. 13C). Com relação a citocina IL-2, não foram observadas diferenças em seus níveis no BAL dos camundongos BALB/c ao longo do curso da infecção. Entretanto, mesmo em níveis baixos, foi possível observar aumento na produção da IL-2 nos camundongos C57BL/6 no 6º dia após a infecção, quando comparado ao grupo (Fig. 13D).

A razão entre os níveis de TNF/IL-10 (Fig. 13E) e IFN γ /IL-10 (Fig. 13F) revelou um balanço mais pró-inflamatório de citocinas presentes no BAL de camundongos C57BL/6 no 6º dia após a infecção quando comparados ao seu controle. Nenhuma diferença significativa nas razões destas citocinas foi observada nos animais BALB/c (Fig. 13E e F).

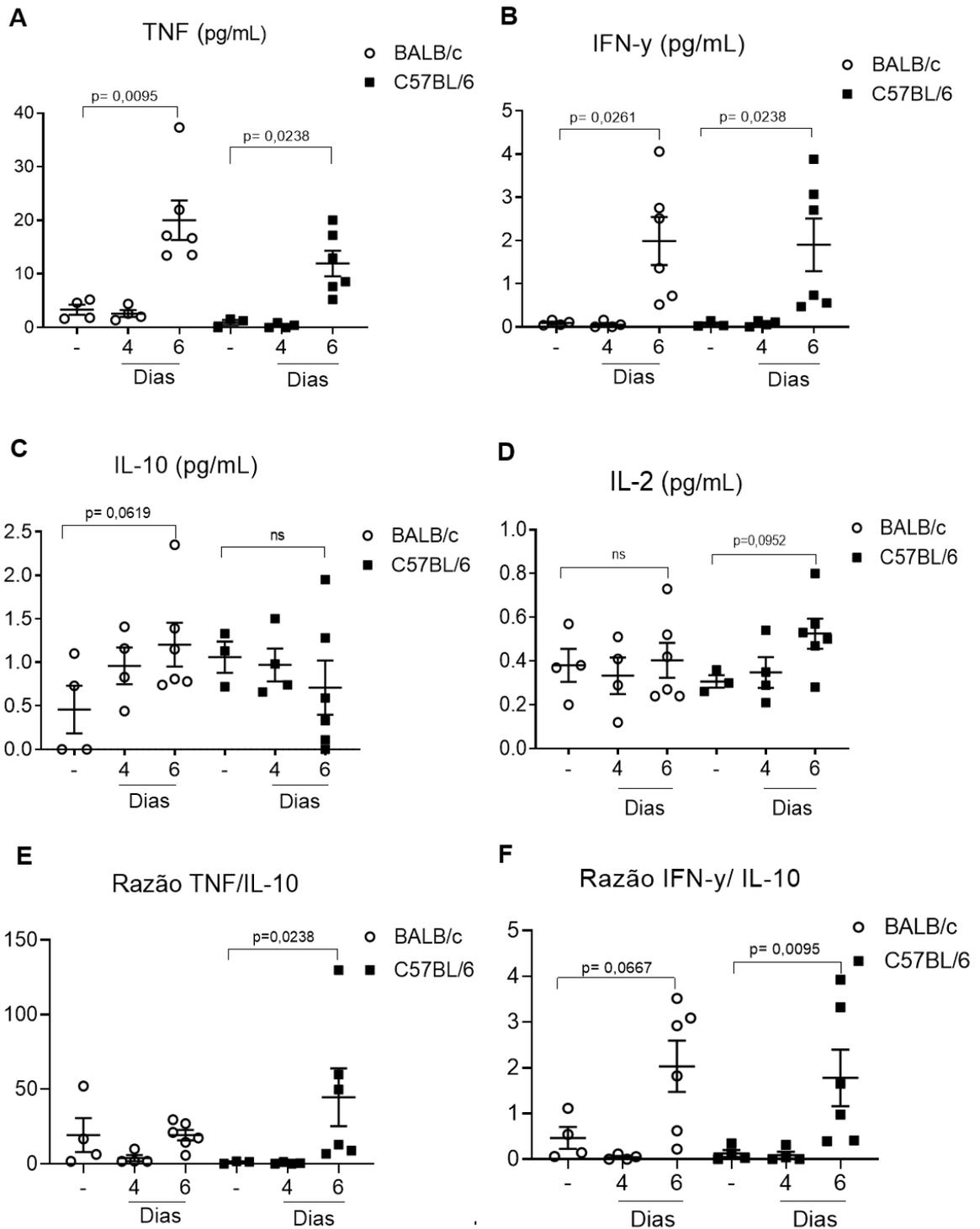


Figura 13. Análise do perfil de citocinas presentes no BAL de animais infectados com *PbA*. Dosagem das citocinas (A) TNF- α , (B) IFN- γ , (C) IL-10 e (D) IL-2 presentes no sobrenadante do lavado broncoalveolar dos camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados ou não com *P. berghei* ANKA. (E) Razão entre as citocinas TNF e IL-10, e (F) IFN e IL-10. Grupos: Controle (-), 4 dias e 6 dias após infecção. Dados de um experimento (4-6 animais por grupo). As amostras foram analisadas pelo teste t de Student não paramétrico. Os valores foram expressos como médias \pm SEM. $P \leq 0,05$.

5. Discussão

A malária se mantém como um grande problema de saúde pública nos países em desenvolvimento. Embora seja uma doença que possa ser prevenida e tratada, mais de 400 mil pessoas morrem de malária a cada ano. No ano de 2019, foram estimados 229 milhões de casos e 409 mil mortes em 87 países endêmicos para a doença (20). A maioria dos casos são de infecção pelo *P. falciparum* e estão relacionados com o desenvolvimento de complicações cerebrais, acidose metabólica, injúria renal e comprometimento pulmonar (120,121). Cerca de 20% dos pacientes adultos com malária grave, causada pelo *P. falciparum* ou *P. vivax*, desenvolvem problemas respiratórios (122). Análises histológicas *post-mortem* do tecido pulmonar de pacientes com malária grave evidenciaram que aproximadamente 25% dos casos desenvolveram edema pulmonar (123,124).

O uso de modelos experimentais propiciou maior avanço na compreensão das complicações encontradas durante a infecção em humanos. Animais C57BL/6 infectados com *PbA* são utilizados como modelo experimental para o estudo da malária cerebral experimental (MCE). Nossos achados iniciais validam os dados reportados na literatura sobre a resistência e a suscetibilidade ao desenvolvimento de MCE de camundongos BALB/c e C57BL/6, respectivamente (125,126). Nosso estudo confirmou que todos os animais C57BL/6 parasitados morrem entre os dias 6 e 9 após infecção, com sinais clínicos que se assemelham ao desenvolvimento de MCE; e que a taxa de sobrevivência é maior nos animais BALB/c parasitados quando comparada àquela dos C57BL/6. Os animais BALB/c infectados com *PbA* morrem tardiamente decorrente de anemia, como evidenciado por Shibui e colaboradores, 2009 (125). Além disso, parâmetros clínicos como perda de peso e hipotermia, também, foram observados de forma mais acentuada nos animais C57BL/6 parasitados. Notadamente, não há diferença na porcentagem de eritrócitos infectados entre as

linhagens de camundongos, o que infere que o desenvolvimento de complicações devido à malária está associado a fatores genéticos que, entre outras coisas, controlam o perfil da resposta imunológica ante a infecção pelo *PbA*. Um clássico exemplo de predisposição genética para suscetibilidade ou resistência a uma determinada doença é observado na infecção de camundongos BALB/c e C57BL/6 por *Leishmania major*, e se correlaciona com o perfil de resposta imune desencadeada pela infecção nas diferentes linhagens (127).

Os modelos de malária experimental murina utilizados neste estudo também revelaram diferenças no comprometimento pulmonar após infecção com *PbA*. Análise do órgão revelou que os animais C57BL/6, ao contrário dos camundongos BALB/c, apresentaram, em resposta a infecção, maior edema pulmonar, redução no número de macrófagos alveolares observado já no 4º dia após infecção e influxo de monócitos inflamatórios para os alvéolos (6 dias após a infecção) e interstício pulmonar (4 dias após infecção). Os animais BALB/c parasitados apresentaram redução no número de macrófagos alveolares mais tardiamente (6 dias após a infecção). Já os macrófagos alveolares que permaneceram no tecido, ao longo da infecção, apresentaram diferenças no seu perfil de marcadores, como aumento na expressão do receptor de manose (CD206), MHC classe II (MHC II), e redução na expressão de iNOS pelos macrófagos ou no número de macrófagos iNOS⁺.

Durante o processo inflamatório sistêmico observado na malária grave, as paredes dos vasos que irrigam o tecido pulmonar são afetadas, podendo ocorrer o aumento da permeabilidade e, conseqüentemente, extravasamento de conteúdo plasmático para o interstício. Esse infiltrado pode comprometer a função do órgão e, se não tratado de forma oportuna, o dano pode ser letal (128). Muitas vezes o diagnóstico de MA-SDRA é mal interpretado e até mesmo confundido com pneumonia viral, como ocorreu em casos reportados de pacientes com quadros pulmonares provenientes da infecção com *P. falciparum*, na região da Arábia Saudita, diagnosticados inicialmente como uma infecção por MERS-CoV (129). Nossos resultados mostraram aumento do peso do pulmão, na quantidade de proteínas no BAL bem como quebra da barreira hematoalveolar nos camundongos C57BL/6 infectados com *PbA*. Estes dados corroboram as observações de Lovegrove e colaboradores (2008), que mostraram que camundongos C57BL/6 infectados com

PbA desenvolveram lesão pulmonar aguda, com aumento no conteúdo de proteína total e imunoglobulina M (IgM) no BAL nos dias 6 e 7 após a infecção (130). Aumento na concentração de Azul de Evans no tecido pulmonar no 6º dia após infecção também foi observado em outros estudos (131,132). Entretanto, notamos que a infecção levou a um discreto aumento no peso do órgão e no conteúdo de proteínas totais no BAL dos animais BALB/c, porém sem extravasamento do corante Azul de Evans para o órgão e interferência na função pulmonar.

Nossos achados revelaram que apenas os animais C57BL/6 parasitados apresentaram diminuição na frequência respiratória e um aumento do Penh no 5º dia após a infecção. Nossos dados sugerem que camundongos BALB/c infectados com *PbA* são parcialmente resistentes à MA-SDRA, assim como reportado por Van den Steen e colaboradores, 2013 (77). Variações na função pulmonar foram observadas em camundongos DBA/2 infectados com *PbA*. Estes animais desenvolveram complicações pulmonares (MA-SDRA) com aumento da pausa respiratória (Penh) e diminuição da frequência respiratória 7 dias após a infecção (133).

De forma macroscópica a inflamação é caracterizada com a presença de calor, rubor, edema, dor e perda de função (134), e de forma microscópica, no tecido, a resposta inflamatória se caracteriza pela desorganização da estrutura tecidual, permitindo o influxo de células oriundas dos vasos sanguíneos (135). Durante a fisiopatologia da MA-SDRA a resposta inflamatória está associada a dois importantes eventos. O primeiro está relacionado com a resposta inflamatória sistêmica, provocando disfunção das células da microvasculatura do hospedeiro (136,137). E o segundo está associado à adesão de eritrócitos infectados ao endotélio pulmonar, amplificando a resposta inflamatória local e contribuindo para a patogênese (138,139). Dados de pacientes “post-mortem” infectados com *Plasmodium* reforçam a presença de conteúdo leucocitário no parênquima pulmonar. Estudos prévios, utilizando o modelo experimental de camundongos C57BL/6 infectados com *PbA*, observaram que a infecção com *PbA* levou a um aumento no número de células totais no BAL de camundongos C57BL/6, 6 dias após a infecção (131). Nossos resultados mostram que 6 dias após a infecção com *PbA*, camundongos C57BL/6 exibiram aumento no número total de células em relação ao 4º dia de infecção, mas não em relação aos controles. Nenhuma alteração no número total de células foi encontrada no BAL de

camundongos BALB/c ao longo da infecção. No modelo de SDRA induzida por lipopolissacarídeo (LPS), Verjans e colaboradores também observaram aumento no número total de células no BAL em camundongos C57BL/6 doentes (140).

Durante a inflamação pulmonar em complicações alérgicas é possível observar a presença elevada de eosinófilos no alvéolo pulmonar (141). Entretanto, durante a fisiopatologia da malária apenas um trabalho observou aumento plasmático da proteína catiônica eosinofílica durante quadro de malária cerebral em adultos (142). Ademais, estudos mais antigos a este mostraram que a malária causada pelo *P. falciparum*, com ou sem exposições anteriores, está associada a baixos números de eosinófilos circulantes (143,144). Em nossos modelos de infecção com *PbA* não foi possível encontrar alterações na contagem de eosinófilos presentes no BAL ao longo da infecção, tanto em camundongos C57BL/6 quanto em camundongos BALB/c.

No decorrer da resposta inflamatória, os monócitos são importantes células recrutadas para o tecido onde irão responder aos estímulos no sítio inflamatório, se diferenciar e produzir mais mediadores importantes para a patogênese e/ou controle da infecção. Em diversas infecções, os monócitos desempenham funções cruciais para o controle da doença, como na infecção experimental por *Toxoplasma gondii*. A depleção dessas células, com uso de anticorpos monoclonais, levou a extensivos danos e mostrou a importância dos monócitos para a sobrevivência dos camundongos C57BL/6 parasitados (145). Em um contexto bacteriano, Lee e colaboradores, 2020, mostraram que durante a infecção causada por *Mycobacterium tuberculosis* há um aumento na população de macrófagos derivados de monócitos recrutados e que essas células controlam melhor o micro-organismo do que os macrófagos intersticiais e os macrófagos alveolares (146). Além disso, resultados de estudos ontogênicos dos macrófagos fornecem dados independentes que sustentam a ideia de que as populações de macrófagos alveolares e macrófagos intersticiais representam populações de células hospedeiras que apresentam permissividade diferente quanto ao crescimento bacteriano (94). Ainda, estudo “in vitro” mostrou a capacidade desses monócitos recrutados em responderem ao *M. tuberculosis*, alterando a produção de citocinas e promovendo a ativação de linfócitos T (147).

Infecções virais no pulmão também estão associadas ao recrutamento de monócitos para o tecido pulmonar. Durante a infecção com o vírus da Influenza A foi

reportado que monócitos e macrófagos derivados de monócitos possuem certa resistência à apoptose mediado por caspase (148). Outro estudo mostrou que a infecção pelo vírus da influenza leva ao recrutamento de monócitos da corrente sanguínea que irão adentrar o tecido e se diferenciar em células dendríticas mieloides produtoras de IFN do tipo 1, importante para o controle viral (148). O recrutamento de monócitos e a sua diferenciação em TipDCs é substancialmente maior em animais infectados com vírus da influenza A de maior virulência, e o seu recrutamento depende do receptor de citocina quimiotática 2 (CCR2) e da proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1). Estas células promovem a eliminação do vírus ao induzirem respostas de células T CD8 específicas (149).

A patogênese da MA-SDRA ainda vem sendo elucidada, porém já se sabe que a maior parte dos leucócitos infiltrantes são células mononucleadas que causam disfunção das trocas gasosas devido a seu acúmulo no tecido (150). Entretanto, os monócitos são importantes durante a malária para o processo de fagocitose, apresentação de antígeno e produção de citocinas (151). Estudo de Lagassé e colaboradores mostrou aumento no número de macrófagos derivados de monócitos no BAL de camundongos C57BL/6 infectados com *PbA* (152). Nossos resultados mostraram aumento no número total e na porcentagem de monócitos no BAL de camundongos em camundongos C57BL/6 6 dias após a infecção com *PbA*. Entretanto, nos camundongos BALB/c observamos apenas aumento na porcentagem dessas células. Além do mais, Valecha e colaboradores mostraram que pacientes com injúria pulmonar na malária está relacionada com aumento da frequência de monócitos, macrófagos e linfócitos, porém, neutrófilos são as células menos frequentes (80).

No tecido, encontramos aumento no percentual de monócitos inflamatórios em ambas as linhagens de camundongos no 6º dia após a infecção. Como mencionado anteriormente, o sequestro de eritrócitos infectados nas superfícies endoteliais resulta em lesão pulmonar aguda e no rápido recrutamento de monócitos CCR2⁺CD11b⁺Ly6C^{hi} da corrente sanguínea. Essas células recrutadas permanecem nos pulmões como macrófagos derivados de monócitos e são importantes na depuração, por meio da fagocitose, de eritrócitos aderentes infectados com *Plasmodium* (152). Durante a infecção com *Plasmodium berghei* NK65, Galvão-Filho

e colaboradores mostraram que o IFN- γ produzido localmente induz a diferenciação final de monócitos em TipDC, que por sua vez medeia a patologia do tecido pulmonar, produzindo altos níveis de espécies reativas de nitrogênio (153). Interessantemente, trabalhos na literatura já mostraram o papel da molécula CD36, no contexto dos monócitos, que atua regulando a resposta imune devido a sua participação no processo de fagocitose, uma vez que consistentemente CD36 é um determinante da adesão eritrócitos infectados nos pulmões (130,154). Além do receptor CD36, estudos apresentaram resultados que suportam o papel de um mecanismo, via receptor CCR2, que responsável pela intensidade e duração do tráfego de monócitos para o tecido durante a inflamação pulmonar. Destacando a importância dessa expressão do receptor CCR2 para a chegada de monócitos inflamatórios para o pulmão (155,156).

O recrutamento de neutrófilos para o tecido é importante para a eliminação de diversos patógenos. Essas células são as primeiras a chegar no sítio de infecção e participam no processo de fagocitose e eliminação de patógenos invasores através de mecanismo dependentes de espécies reativas de oxigênio (ROS) e mecanismos independentes de oxigênio (157,158). Durante a infecção com *M. tuberculosis*, entretanto, há um aumento na porcentagem e no número total de neutrófilos recrutados para o pulmão, atingindo o pico entre os dias 2 e 3 após a infecção em camundongos suscetíveis (157). Esses resultados elucidam a capacidade dos neutrófilos de entrar no tecido e fagocitar o patógeno juntamente com a baixa capacidade dos neutrófilos em restringir o crescimento bacteriano.

Na infecção pelo *Plasmodium spp.*, o recrutamento de neutrófilo é importante para a eliminação do parasito no baço (159). Além disso, alguns trabalhos tem relacionado essas células com a injúria pulmonar (160), lesão hepática (161) e também complicações cerebrais (162). Vandermosten e colaboradores realizaram um estudo com diferentes *Plasmodium spp.* em paralelo com uso de diferentes linhagens de camundongos. Os resultados obtidos pelo grupo mostram que camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* NK65-E tiveram um aumento no número total de neutrófilos no BAL 9 dias após a infecção. Entretanto, a infecção com *PbA* em camundongos DBA/2 não promoveu aumento de neutrófilos no BAL até o 19° dia após a infecção. Em paralelo a infecção com *PbA* em camundongos BALB/c também não levou alterações no infiltrado de neutrófilo até 15° após a infecção (163). Nossos

dados revelaram uma diminuição significativa tanto da porcentagem quanto do número total de neutrófilos no BAL no 6° dia após a infecção com *PbA* em ambas as linhagens de camundongos (BALB/c e C57BL/6), quando comparados com seus grupos Controles. Essa redução também foi observada no tecido pulmonar 6 dias após a infecção. O baixo número de neutrófilos presentes no pulmão corrobora com dados “post mortem” de malária em humanos. Maknitikul e colaboradores mostraram que não há diferença nos níveis de neutrófilos entre os pacientes infectados com *P. falciparum*, com ou sem edema pulmonar (138). Podemos hipotetizar que a diminuição no número de neutrófilos teciduais, observado em nosso estudo, e os baixos números encontrados após análise de pacientes infectados com *P. falciparum* podem estar relacionados **(1)** à rápida morte e remoção dos neutrófilos que chegam no tecido a fim de resolver o problema. Com isso, talvez fosse ideal observar os estágios mais iniciais do desenvolvimento da doença para que se possa identificar essas células. Uma segunda hipótese ainda não muito bem elucidada é que **(2)** a infecção pelo *Plasmodium spp.* pode provocar a inibição da quimotaxia dos neutrófilos, pois já foi reportado que neutrófilos de pacientes infectados com *P. falciparum* tiveram sua quimiotaxia reduzida quando comparados com os pacientes não infectados (164) [revisto em (158)]. Além disso, Leoratti e colaboradores já reportaram a redução da quimiotaxia pode estar relacionada em parte com a expressão de IL-8 e com o receptor CXCR2 (165). E por fim **(3)**, essa diminuição dos neutrófilos pode estar associada diretamente com a produção ou a saída dessas células a partir da medula óssea.

Por outro lado, em casos de infecção fatal pelo *P. vivax* foi observado aumento na população de células CD15⁺ (neutrófilos) no interstício pulmonar (166). Nossos dados são diferentes do estudo realizado por Sercundes e colaboradores, 2016, onde os autores mostraram que a infecção de camundongos DBA/2 com *PbA* promoveu aumento no número de células CD11b⁺Ly6G⁺ (neutrófilos) nos pulmões de animais que desenvolveram MA-SDRA.

Os macrófagos alveolares constituem células participantes na resposta de imunidade inata e desempenham importante papel no controle das respostas inflamatórias, após exposição do hospedeiro a diversos agentes do meio. São importantes na manutenção da homeostase do pulmão, fagocitando partículas

inorgânicas, bactéria, fungos e vírus (167,168), além de contribuírem na remoção de células mortas e restos celulares, promovendo a renovação tecidual. Sob condições de homeostase, os macrófagos residentes possuem principalmente o fenótipo M2 e secretam citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β (167).

Durante complicações pulmonares os macrófagos alveolares são responsáveis pela produção de citocinas e quimiocinas que irão recrutar diferentes tipos celulares para o sítio inflamatório (169). Nossos dados exibiram uma diminuição no percentual dos macrófagos alveolares nos camundongos BALB/c no 6º dia após a infecção. Já nos camundongos C57BL/6 observamos também uma redução no percentual dos macrófagos no dia 6 após a infecção, porém, diferentemente dos camundongos BALB/c, notamos uma redução significativa já no 4º dia após a infecção quando comparada ao grupo Controle. Já com relação ao número total de macrófagos alveolares, observamos redução 6 dias após a infecção em ambas as linhagens de camundongos (BALB/c e C57BL/6). Califano e colaboradores, 2018, mostraram que durante a infecção pelo vírus da influenza há uma severa redução de macrófagos alveolares em camundongos BALB/c 7 dias após a infecção. Essa redução é independente da dose de unidades formadoras de colônia administrada por via intranasal. Em contrapartida, macrófagos alveolares de camundongos C57BL/6 são mais resistentes a depleção após a infecção pelo vírus da influenza (170). Lasbury e colaboradores, 2007, mostraram em seu estudo com *Pneumocystis pneumonia* que a depleção de macrófagos alveolares observada em camundongos BALB/c pode ser, em parte, devido a apoptose dessas células mediada por poliaminas. Análises do BAL de animais infectados com *Pneumocystis pneumonia* exibiu altos níveis de poliaminas (Espermidina, N¹-acetilespermina, N¹-acetilespermidida). O estudo associou esses altos níveis de poliaminas com aumento das espécies reativas de oxigênio intracelular, ativação das caspases 3 e 9 (171). Já Fan e colaboradores mostraram, em um modelo de hipóxia e isquemia pulmonar, que a apoptose de macrófagos alveolares é atenuada pela indução de autofagia, via diminuição do estresse oxidativo (172). Ademais, estudo de injúria pulmonar, induzida por LPS, em camundongos C57BL/6 observou que a regulação positiva de IL-1 β pode resultar na ativação do piroptossoma da qual culmina na piroptose dos macrófagos alveolares aumentando a inflamação (173).

A dinâmica de recrutamento e os perfis de macrófagos encontrados no pulmão pode variar de acordo com fatores epigenéticos específicos. Já foi reportado, em camundongos, que a exposição à diferentes agentes ambientais ao longo da vida, incluindo vírus, fumaça de cigarro, entre outros, pode induzir o recrutamento de monócitos que se diferenciam em macrófagos alveolares em resposta ao microambiente do tecido pulmonar. Esses macrófagos alveolares derivados de monócitos, com o tempo, persistem no pulmão assumindo um papel de macrófagos alveolares residentes nos tecidos (86). Desta forma, o papel dos macrófagos residentes se torna bem específico de acordo com o microambiente no qual esta célula se encontra.

O fenótipo M1 nos macrófagos alveolares pode ser caracterizado como CD206^{lo}CD86^{hi} e fenótipo M2 como CD206^{hi}CD86^{lo} (174). Estudo em humanos com *Streptococcus pneumoniae* mostrou que após a exposição microbiana houve o predomínio de células CD206^{hi}CD86^{hi}. Além disso, independentemente da exposição à *S. pneumoniae*, os macrófagos alveolares detectados expressaram níveis elevados de CD80, CD64 e HLA-DR, perfil característico de um fenótipo M1. No entanto, a expressão elevada de CD206 ilustra que os macrófagos alveolares expressam um fenótipo duplo e plástico nas mais diferentes situações (174).

Nossos resultados mostraram que os macrófagos alveolares de camundongos BALB/c e C57BL/6, em condições de homeostase, expressam CD206, porém ao longo da infecção ocorre um aumento na expressão dessa molécula em ambas as linhagens. No entanto, a média da intensidade de fluorescência (MFI) da expressão da molécula CD206 nos macrófagos alveolares dos animais C57BL/6 foi significativamente maior quando comparado a dos animais BALB/c, no mesmo período pós-infecção. Nossos dados indicam que mesmo em condições não homeostáticas os macrófagos alveolares mantêm o perfil M2 e sugerem a hipótese de que talvez, para assegurar a homeostase do tecido inflamado, esses macrófagos realizem a regulação positiva do CD206. Estudo com pacientes portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), mostrou que durante estágio de maior severidade da doença há um super expressão da molécula CD206 nos macrófagos alveolares (175).

A fim de buscarmos e identificarmos ainda mais o perfil fenotípico dos macrófagos alveolares em nosso modelo de infecção com *PbA*, também observamos o aumento na expressão da molécula MHC II. Esse aumento ocorreu no 6° dia após a infecção em ambas as linhagens de camundongo quando comparadas aos seus controles. Todavia, observamos que o MFI do MHC II dos macrófagos de camundongos C57BL/6 foi mais alto do que de camundongos BALB/c 6 dias após a infecção. Além de ter tido um aumento do MFI já no 4° dia após a infecção nos macrófagos de camundongos C57BL/6. No estudo de Fulton e colaboradores, 2004, foi observado que macrófagos alveolares de camundongos C57BL/6 expressam constitutivamente MHC II e que a suscetibilidade à infecção com *Mycobacterium bovis* pode ser resultado da capacidade das micobactérias de interferir na expressão do MHC II e na apresentação do antígeno por macrófagos alveolares (176). De acordo com Yao e colaboradores, 2018, a infecção por adenovírus em camundongos BALB/c levou a uma modulação positiva no MFI da molécula de MHC II, 28 dias após a infecção. Além disso, este trabalho estabeleceu um novo paradigma, até então pouco explorado na imunologia, de formação de memória inata de macrófagos associados à mucosa pulmonar (177).

Seguindo ainda a identificação do perfil fenotípico dos macrófagos alveolares, nossos resultados mostraram uma diminuição significativa na percentagem de células CD206⁺iNOS⁺ dentro da população dos macrófagos alveolares em ambas as linhagens de camundongos no 6° dia quando comparados aos grupos Controle. Contudo, em condições de homeostase, há um percentual maior macrófagos alveolares expressando iNOS nos camundongos C57BL/6, do que macrófagos de camundongos BALB/c. Talvez essas diferenças na expressão da iNOS já em condições de equilíbrio seja uma das razões pelas quais os camundongos C57BL/6 desenvolvam rapidamente sérias complicações pulmonares. Além disso, verificamos, também, níveis mais elevados de óxido nítrico em camundongos C57BL/6, 6 dias após a infecção com *PbA*, quando comparados aos do grupo Controle e também quando comparados aos dos camundongos BALB/c, no 6° dia após a infecção. Speyer e colaboradores, 2003, utilizando animais *knockout*, mostrou que a ausência de iNOS causa respostas inflamatórias aumentadas no pulmão de C57BL/6, e que podem estar relacionadas à produção aumentada de MCP-1 por células endoteliais e macrófagos (178).

Em paralelo, embora a expressão da arginase não tenha sido detectada nos macrófagos alveolares, observamos aumento da atividade dessa enzima no sobrenadante do BAL dos camundongos C57BL/6 parasitados. Enquanto a infecção com *PbA* não promoveu alteração na atividade da arginase em camundongos BALB/c ao longo da infecção. Estudo na literatura mostrou que durante a infecção com *M. tuberculosis*, os macrófagos alveolares tendem a se polarizar primeiramente para o perfil clássico M1, caracterizado pelos altos níveis de IFN- γ e iNOS. Entretanto, durante o desenvolvimento da inflamação os macrófagos diminuem a expressão de IFN- γ e iNOS e aumentam a expressão da enzima arginase 1 e citocina IL-4, polarizando para o fenótipo M2 (179). Como supracitado, em nossos resultados, camundongos C57BL/6 expressam mais CD206 do que os BALB/6 no 6º dia após a infecção. Assim, podemos fazer a relação de que à medida que essas células vão aumentando a expressão de um marcador de fenótipo M2 (CD206) e atividade da arginase 1, vão diminuindo a expressão de um marcador de fenótipo M1 (iNOS), evidenciando o balanço de polarização desses macrófagos alveolares. Contudo, por ser uma população celular bem plástica essas células podem assumir perfis de acordo com diferentes estímulos do meio. Bazzan e colaboradores, 2017, apresentaram dados de macrófagos alveolares de pulmões de pacientes fumantes ou com DPOC, e essas células mantinham um perfil não polarizado (M0). Com a inflamação causada pelo tabagismo e a gravidade da DPOC, houve aumento na expressão tanto de marcadores M1 quanto M2, ou seja, os autores mostraram coexpressão de marcadores M1 e M2 no mesmo macrófago alveolar (180).

A infecção pelo *P. falciparum* e *P. vivax* e a severidade no desenvolvimento da doença estão associadas à produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IFN γ e IL-1 β (181,182). Em modelos experimentais murinos de infecção por *P. berghei*, *P. yoelii* ou *P. chabaudi* é possível observar as mesmas funções dessas citocinas no desenvolvimento da malária (51,109). Essas citocinas estão relacionadas ao aumento da expressão de moléculas de adesão, como E-selectina, e ICAM-1 nas células endoteliais e o sequestro do eritrócito parasitado. Durante eventos da malária cerebral, Rudin e colaboradores já reportaram a importância do TNF no desenvolvimento da doença, onde camundongos *knockout* para o receptor TNF- α e TNF- β se mostraram completamente resistentes ao desenvolvimento de complicações cerebrais, após a infecção com *PbA* (183). Além disso, embora o TNF

esteja relacionada com eliminação do parasito na malária em humanos por *P. falciparum*, a mesma pode causar disfunção endotelial significativa e agravar o sequestro de hemácias parasitadas na microvasculatura (184). No contexto pulmonar, essa citocina está associada à quimiotaxia de leucócitos para o sítio inflamatório, indução de fagocitose no macrófago, e maturação de DCs durante a infecção com *M. tuberculosis* [revisado (185)].

Nossos resultados mostraram que a infecção com *PbA* promoveu aumento de TNF no BAL, em ambas as linhagens de camundongos, 6 dias após a infecção. Analisando, também, os níveis de IFN- γ no BAL, mostramos aumento significativo de citocina em camundongos C57BL/6 e BALB/c 6 dias após a infecção. Estudo com infecção pelo vírus da influenza em camundongos BALB/c mostrou que o IFN- γ promove a depleção de macrófagos alveolares ao longo da infecção. Talvez o IFN- γ também possa ser um dos mediadores responsáveis pela diminuição dos macrófagos alveolares durante a infecção pelo *PbA*. Outra citocina próinflamatória que analisamos foi a IL-2. Detectamos um aumento significativo na produção dessa citocina no BAL de camundongos C57BL/6 no 6º dia após a infecção. A IL-2 é bem conhecida como uma citocina importante para a proliferação de linfócitos T [revisado (186)]. O ambiente pulmonar é particularmente sensível à inflamação induzida por IL-2 durante a infecção pelo vírus da influenza (187). Mais ainda, outro estudo identificou, que durante o edema pulmonar, a IL-2 causou dano à microvasculatura no tecido (188). Os mecanismos pelos quais IL-2 atua ainda não são bem compreendidos. Todavia, acredita-se que este efeito possa ser consequência da produção indireta de outras citocinas, como TNF- α , e de proteases que são liberadas por células recrutadas para o tecido [revisado por (188)]. Okamoto e colaboradores, 2002, mostraram que a IL-2 de forma sinérgica com a IL-18 é responsável pelo processo de injúria pulmonar letal durante a patogênese da pneumonia (189).

Ao analisarmos a IL-10, citocina imunorreguladora (190), observamos aumento de seus níveis no 6º dia após a infecção, em camundongos BALB/c parasitados, o que não foi observado nos animais C57BL/6. Desta forma, os resultados sugerem que essa citocina possa estar envolvida no controle da imunopatogênese da malária pulmonar. O papel da IL-10 como citocina reguladora do desenvolvimento da MCE durante a infecção com *PbA* de camundongos C57BL/6 já foi evidenciado por Schmidt

e colaboradores, 2018 (191). Neste modelo há diminuição na expressão de mRNA de IL-10 no baço e no cérebro (191), em associação ao aumento na suscetibilidade ao sequestro de parasito na microvasculatura desses tecidos (192). A geração de resposta inflamatória no tecido pulmonar envolve o balanço entre as citocinas próinflamatórias e anti-inflamatórias (193). Avaliamos a razão entre as citocinas próinflamatória TNF e IFN- γ com a citocina anti-inflamatória IL-10. Observamos que camundongos C57BL/6 possuem nível de razão mais elevado entre as citocinas TNF/IL-10 e IFN- γ /IL-10, sugestivo de um maior desequilíbrio da resposta inflamatória nesses animais. Contrariamente, o estudo de Lovegrove e colaboradores, em modelo de infecção com *PbA* em camundongos C57BL/6 e BALB/c, não detectou citocinas, como TNF e IFN- γ , e quimiocinas no BAL dos animais até 7 dias após a infecção. Observaram apenas aumento na quantidade plasmáticas dessas citocinas (130). Além do mais, de acordo com a metodologia empregada nesse estudo, a dosagem de citocinas foi realizada no volume total do BAL livre de células. Em nossas dosagens utilizamos apenas o sobrenadante do primeiro lavado recolhido para mantermos a concentração das citocinas.

6. Conclusão

Nossos dados mostram que camundongos BALB/c e C57BL/6 respondem de forma diferente à infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA, desenvolvendo resposta inflamatória pulmonar leve e grave, respectivamente. A parcial resistência (BALB/c) ou suscetibilidade (C57BL/6) das linhagens ao comprometimento pulmonar pode estar relacionada à cinética distinta de influxo de monócitos inflamatórios e do balaço entre os mediadores inflamatórios (TNF e IFN) e regulatórios (IL-10) detectados no pulmão dos animais parasitados. Mais ainda, evidenciamos que os macrófagos alveolares, de ambas linhagens, percebem e respondem à infecção sistêmica, apresentando mudanças quantitativas e também do perfil funcional.

7. Considerações finais

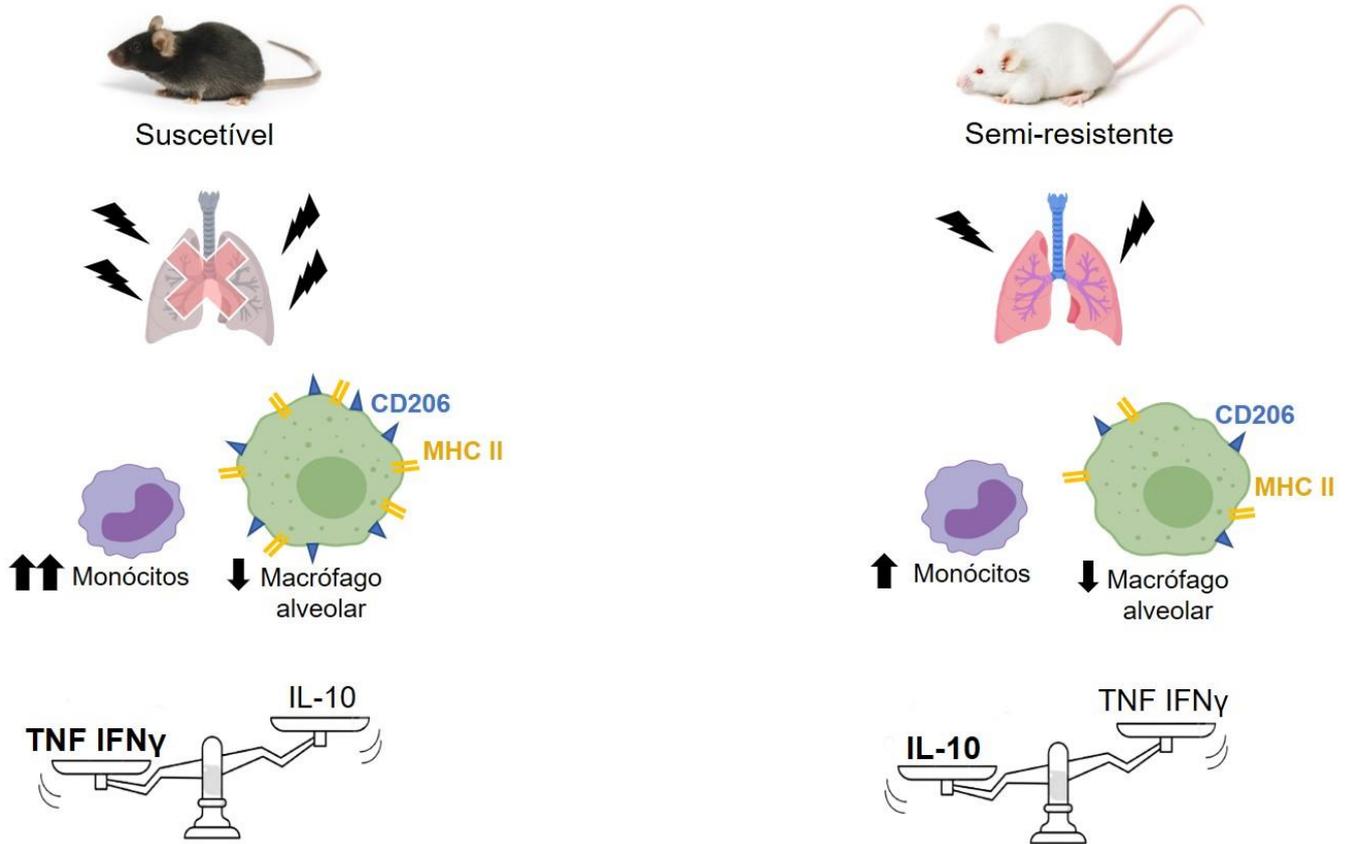


Figura 14: Cinética de recrutamento de monócitos e polarização de macrófagos alveolares em camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA. Animais C57BL/6 infectados com *PbA* possuem um maior recrutamento de monócitos inflamatórios para o tecido pulmonar quando comparados com os animais BALB/c. Ambas as linhagens exibem uma diminuição dos macrófagos alveolares. Entretanto, os animais C57BL/6 apresentam um aumento mais expressivo da molécula de MHC II e CD206 nos macrófagos alveolares quando comparados com os camundongos BALB/c. Camundongos C57BL/6 exibem um maior desbalanço entre citocinas pró-inflamatórias (TNF e IFN γ) e regulatória (IL-10). Os eventos inflamatórios no tecido pulmonar desencadeiam perda de função do pulmão nos camundongos C57BL/6 (suscetível), diferentemente dos camundongos BALB/c.

8. Referências

1. Reiter P. From Shakespeare to Defoe : Malaria in England in the Little Ice Age. 2000;6(1):1–11.
2. Hempelmann E, Krafts K. Bad air, amulets and mosquitoes: 2,000 years of changing perspectives on malaria. *Malar J* [Internet]. 2013 Dec 9;12(1):232. Available from: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-12-232>
3. Cox FE. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit Vectors* [Internet]. 2010;3(1):5. Available from: <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-3-5>
4. Lane N. The unseen world: reflections on Leeuwenhoek (1677) 'Concerning little animals.' *Philos Trans R Soc B Biol Sci* [Internet]. 2015 Apr 19;370(1666):20140344. Available from: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2014.0344>
5. Blevins SM, Bronze MS. Robert Koch and the “golden age” of bacteriology. *International Journal of Infectious Diseases*. 2010.
6. Y TS, JD, A A. Charles Laveran (1845-1922): Nobel laureate pioneer of malaria. *Singapore Med J*. 2009;50(7):657–8.
7. Schlagenhauf P. Malaria: from prehistory to present. *Infect Dis Clin North Am* [Internet]. 2004 Jun;18(2):189–205. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891552004000170>
8. Capanna E, Manson P, Ross R, Louis C. Grassi versus Ross : who solved the riddle of malaria ? *Int Microbiol* [Internet]. 2006;9:69–74. Available from: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1139-67092006000100010&lng=es&nrm=iso
9. Millar SB. Human infections with *Plasmodium knowlesi* — zoonotic malaria. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(7):640–8.
10. Rutledge GG, Böhme U, Sanders M, Reid AJ, Cotton JA, Maiga-ascofare O, et

- al. *Plasmodium malariae* and *P. ovale* genomes provide insights into malaria parasite evolution. *Nat Publ Gr*. 2017;
11. Ahmed MA, Cox-Singh J. *Plasmodium knowlesi* - an emerging pathogen. *ISBT Sci Ser* [Internet]. 2015 Apr;10(S1):134–40. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/voxs.12115>
 12. Singh B, Sung LK, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet* [Internet]. 2004 Mar;363(9414):1017–24. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673604158364>
 13. Pei W, Jeslyn S, Huat TC, Vernon L, Mei L, Irene Z, et al. Molecular Epidemiological Investigation of *Plasmodium knowlesi* in Humans and Macaques in Singapore. 2011;11(2).
 14. Brasil P, Zalis MG, de Pina-Costa A, Siqueira AM, Júnior CB, Silva S, et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *Lancet Glob Heal* [Internet]. 2017 Oct;5(10):e1038–46. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214109X17303339>
 15. Benchimol JL, Silva AFC da. Ferrovias, doenças e medicina tropical no Brasil da Primeira República. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos* [Internet]. 2008 Sep;15(3):719–62. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-59702008000300009&lng=pt&tlng=pt
 16. Griffing SM, Tauil PL, Udhayakumar V, Silva-Flannery L. A historical perspective on malaria control in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2015 Sep;110(6):701–18. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762015000600701&lng=en&tlng=en
 17. Rodrigues J, Martha C, Ladeia-andrade S. A new challenge for malaria control in Brazil : asymptomatic *Plasmodium* infection - A Review. 2006;101(April):229–

- 37.
18. Saúde M da. Ações de Controle da Malária. Manual para Profissionais de Saúde na Atenção Básica Série. Brasília- DF: MINISTÉRIO DA SAÚDE Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica; 2006.
 19. Hochman G. From Autonomy to Partial Alignment: National Malaria Programs in the Time of Global Eradication, Brazil, 1941–1961. *Can Bull Med Hist* [Internet]. 2008 Apr;25(1):161–92. Available from: <https://utpjournals.press/doi/10.3138/cbmh.25.1.161>
 20. World Health Organization. World Malaria Report. Vol. WHO/HTM/GM, World Health. 2020. 238 p.
 21. WHO. World malaria report 2019. 2019.
 22. WHO. World malaria report 2018. Geneva:World Health Organization; 2018. World Malaria Report. 2018.
 23. PAHO. Report on the Situation of Malaria in. 2017;
 24. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Situación de la malaria en la región de las Américas, 2000-2016. PAHO [Internet]. 2018;1–10. Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=25778&Itemid=270&lang=es
 25. Pina-Costa A de, Brasil P, Santi SM Di, Araujo MP De, Suárez-Mutis MC, Santelli ACF e S, et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2014 Aug;109(5):618–33. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762014000500618&lng=en&tlng=en
 26. Ferreira MU, Da Silva-Nunes M. Evidence-based public health and prospects for malaria control in Brazil. *J Infect Dev Ctries* [Internet]. 2010 Jun 3;4(09):533–45. Available from: <https://jids.org/index.php/journal/article/view/21045365>
 27. Guia prático de tratamento da malária no Brasil Guia prático de tratamento da

malária no Brasil. 2010.

28. Bousema T, Drakeley C. Epidemiology and Infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* Gametocytes in Relation to Malaria Control and Elimination. 2011;24(2):377–410.
29. Seeber F, Steinfelder S. Recent advances in understanding apicomplexan parasites. *F1000 Res* [Internet]. 2016 Jun 14;5(0):1369. Available from: <https://f1000research.com/articles/5-1369/v1>
30. Cohuet A, Harris C, Robert V, Fontenille D. Evolutionary forces on Anopheles: what makes a malaria vector? *Trends Parasitol* [Internet]. 2010 Mar;26(3):130–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492209002621>
31. White NJ, Ashley EA, Recht J, Delves MJ, Ruecker A, Smithuis FM, et al. Assessment of therapeutic responses to gametocytocidal drugs in *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar J* [Internet]. 2014 Dec 9;13(1):483. Available from: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-13-483>
32. Mohandas N, An X. Malaria and human red blood cells. *Med Microbiol Immunol*. 2012;201(4):593–8.
33. Ménard R, Tavares J, Cockburn I, Markus M, Zavala F. Looking under the skin : the first steps in malarial infection and immunity. *Nat Publ Gr*. 2013;11(10):701–12.
34. Markus MB. The hypnozoite concept, with particular reference to malaria. *Parasitol Res* [Internet]. 2011 Jan 6;108(1):247–52. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00436-010-2072-y>
35. Haldar K, Murphy SC, Milner DA, Taylor TE. Malaria: Mechanisms of Erythrocytic Infection and Pathological Correlates of Severe Disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis* [Internet]. 2007;2(1):217–49. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pathol.2.010506.091913>
36. Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. Malaria: Biology and Disease.

- Cell [Internet]. 2016;167(3):610–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.055>
37. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. *Lancet* [Internet]. 2014 Feb;383(9918):723–35. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673613600240>
 38. Patzewitz E, Guttery DS, Poulin B, Ramakrishnan C, Ferguson DJP, Wall RJ, et al. An Ancient Protein Phosphatase, SHLP1, Is Critical to Microneme Development in Plasmodium Ookinetes and Parasite Transmission. *Cell Rep* [Internet]. 2013 Mar;3(3):622–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124713000569>
 39. Smith RC, Jacobs-Lorena M. Plasmodium–Mosquito Interactions. In: *ADVANCES IN INSECT PHYSIOLOGY* [Internet]. 2010. p. 119–49. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012381387900004X>
 40. Miller LH, Ackerman HC, Su X, Wellems TE. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nat Med* [Internet]. 2013 Feb 6;19(2):156–67. Available from: <http://www.nature.com/articles/nm.3073>
 41. Clark IA, Budd AC, Alleva LM, Cowden WB. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. *Malar J* [Internet]. 2006 Dec 10;5(1):85. Available from: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-5-85>
 42. Zhang R, Lee W, Lau Y, Albrecht L, Lopes SCP, Costa FTM, et al. Rheopathologic Consequence of Plasmodium vivax Rosette Formation. Rodriguez A, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2016 Aug 10;10(8):e0004912. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004912>
 43. Health TM and I. Severe Malaria. *Trop Med Int Heal* [Internet]. 2014 Sep;19:7–131. Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/tmi.12313_2
 44. Autino B, Corbett Y, Castelli F, Taramelli D. PATHOGENESIS OF MALARIA IN TISSUES AND BLOOD. *Mediterr J Hematol Infect Dis* [Internet]. 2012 Oct

- 4;4(1):e2012061. Available from:
<http://www.mjhid.org/index.php/mjhid/article/view/2012.061>
45. Dreyfuss ML, Stoltzfus RJ, Shrestha JB, Pradhan EK, Leclercq SC, Khatri SK, et al. Community and International Nutrition Hookworms , Malaria and Vitamin A Deficiency Contribute to Anemia and Iron Deficiency among Pregnant Women in the Plains of Nepal 1. 2018;(February):2527–36.
 46. Chang K, Stevenson MM. Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. *Int J Parasitol* [Internet]. 2004 Dec;34(13–14):1501–16. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751904002139>
 47. Buffet PA, Safeukui I, Deplaine G, Brousse V, Prendki V, Thellier M, et al. The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. *Blood* [Internet]. 2011 Jan 13;117(2):381–92. Available from:
<https://ashpublications.org/blood/article/117/2/381/28106/The-pathogenesis-of-Plasmodium-falciparum-malaria>
 48. Aubrey J. Cunnington, Eleanor M. Riley and MW. Stuck in a rut? Reconsidering the role of parasite sequestration in severe malaria syndromes. *NIH Public Access Author*. 2014;29(12):1–17.
 49. Scherf A, Lopez-rubio JJ. Antigenic Variation in *Plasmodium falciparum*. 2008;
 50. Gazzinelli RT, Kalantari P, Fitzgerald KA, Golenbock DT. Innate sensing of malaria parasites. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2014;14(11):744–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3742>
 51. Stevenson; MM, Riley; EM. Innate Immunity to Malaria. In: *Malaria* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2004. p. 3–25. Available from:
http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-45210-4_1
 52. Guo L, Rondina MT. The Era of Thromboinflammation: Platelets Are Dynamic Sensors and Effector Cells During Infectious Diseases. *Front Immunol* [Internet]. 2019 Sep 13;10(September):1–14. Available from:
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.02204/full>

53. del Portillo HA, Ferrer M, Brugat T, Martin-Jaular L, Langhorne J, Lacerda MVG. The role of the spleen in malaria. *Cell Microbiol* [Internet]. 2012 Mar;14(3):343–55. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-5822.2011.01741.x>
54. Sobolewski P, Gramaglia I, Frangos J, Intaglietta M, van der Heyde HC. Nitric oxide bioavailability in malaria. *Trends Parasitol* [Internet]. 2005 Sep;21(9):415–22. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492205001893>
55. Clark IA, Cowden WB. The pathophysiology of falciparum malaria. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2003 Aug;99(2):221–60. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725803000603>
56. Anstey NM, Weinberg JB, Duffy PE, Mwaikambo ED, Hassanali MY, Granger DL. Nitric oxide, malaria, and anemia: inverse relationship between nitric oxide production and hemoglobin concentration in asymptomatic, malaria-exposed children. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1999 Aug 1;61(2):249–52. Available from: <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.1999.61.249>
57. Hobbs MR, Udhayakumar V, Levesque MC, Booth J, Roberts JM, Tkachuk AN, et al. A new NOS2 promoter polymorphism associated with increased nitric oxide production and protection from severe malaria in Tanzanian and Kenyan children. *Lancet* [Internet]. 2002 Nov;360(9344):1468–75. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673602114747>
58. Boutlis CS, Weinberg JB, Baker J, Bockarie MJ, Mgone CS, Cheng Q, et al. Nitric Oxide Production and Nitric Oxide Synthase Activity in Malaria-Exposed Papua New Guinean Children and Adults Show Longitudinal Stability and No Association with Parasitemia. *Infect Immun* [Internet]. 2004 Dec;72(12):6932–8. Available from: <https://iai.asm.org/content/72/12/6932>
59. FAVRE N, RYFFEL B, RUDIN W. Parasite killing in murine malaria does not require nitric oxide production. *Parasitology* [Internet]. 1999 Feb 1;118(2):139–43. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182098003618/type/journal_article

60. AMANTE FH, GOOD MF. Prolonged Th1-like response generated by a Plasmodium yoeli -specific T cell clone allows complete clearance of infection in reconstituted mice. Parasite Immunol [Internet]. 1997 Mar 31;19(3):111–26. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-3024.1997.d01-187.x>
61. O'Neill LAJ, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity. Nat Rev Immunol [Internet]. 2013 Jun 17;13(6):453–60. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri3446>
62. Gowda DC, Wu X. Parasite Recognition and Signaling Mechanisms in Innate Immune Responses to Malaria. Front Immunol [Internet]. 2018 Dec 19;9(December):1–17. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.03006/full>
63. Adachi K, Tsutsui H, Kashiwamura S, Seki E, Nakano H, Takeuchi O, et al. Plasmodium berghei Infection in Mice Induces Liver Injury by an IL-12- and Toll-Like Receptor/Myeloid Differentiation Factor 88-Dependent Mechanism. J Immunol [Internet]. 2001 Nov 15;167(10):5928–34. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.167.10.5928>
64. Campos FM, Franklin BS, Teixeira-Carvalho A, Filho AL, de Paula SC, Fontes CJ, et al. Augmented plasma microparticles during acute Plasmodium vivax infection. Malar J [Internet]. 2010;9(1):327. Available from: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-9-327>
65. Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. Nat Rev Immunol [Internet]. 2005 Sep;5(9):722–35. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri1686>
66. Kumar R, Ng S, Engwerda C. The Role of IL-10 in Malaria: A Double Edged Sword. Front Immunol [Internet]. 2019 Feb 12;10(February):1–10. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.00229/full>
67. Omer FM, de Souza JB, Corran PH, Sultan AA, Riley EM. Activation of Transforming Growth Factor β by Malaria Parasite-derived Metalloproteinases

- and a Thrombospondin-like Molecule. *J Exp Med* [Internet]. 2003 Dec 15;198(12):1817–27. Available from: <https://rupress.org/jem/article/198/12/1817/39941/Activation-of-Transforming-Growth-Factor-β-by>
68. Hoffman M, Taylor BE, Harris MB. Evolution of lung breathing from a lungless primitive vertebrate. *Respir Physiol Neurobiol*. 2017;11–6.
 69. Wagner PD. The physiological basis of pulmonary gas exchange: implications for clinical interpretation of arterial blood gases. *Eur Respir J* [Internet]. 2015 Jan;45(1):227–43. Available from: <http://erj.ersjournals.com/lookup/doi/10.1183/09031936.00039214>
 70. Luh S, Chiang C. Acute lung injury/acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS): the mechanism, present strategies and future perspectives of therapies. *J Zhejiang Univ Sci B* [Internet]. 2007 Jan;8(1):60–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1631/jzus.2007.B0060>
 71. Johnson ER, Matthay MA. Acute Lung Injury: Epidemiology, Pathogenesis, and Treatment. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* [Internet]. 2010 Aug;23(4):243–52. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jamp.2009.0775>
 72. Raghavendran K, Napolitano LM. Definition of ALI/ARDS. *Crit Care Clin* [Internet]. 2011 Jul;27(3):429–37. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749070411000273>
 73. Barbas CSV, Ísola AM, Caser EB. What is the future of acute respiratory distress syndrome after the Berlin definition? *Curr Opin Crit Care* [Internet]. 2014 Feb;20(1):10–6. Available from: <http://journals.lww.com/00075198-201402000-00004>
 74. Taylor WRJ, Hanson J, Turner GDH, White NJ, Dondorp AM. Respiratory Manifestations of Malaria. *Chest* [Internet]. 2012 Aug;142(2):492–505. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012369212604644>
 75. Baldeviano GC, Lescano AG, Pozo E, Graf PCF, Durand S, Quispe AM, et al. *Plasmodium vivax* Hospitalizations in a Monoendemic Malaria Region: Severe

- Vivax Malaria? *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2014 Jul 2;91(1):11–7. Available from: <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.12-0610>
76. Candido Moura G, Barcelos D, Epiphanyo S, Santos Ortolan L dos. Physiopathology of Malaria-Associated Acute Respiratory Distress Syndrome. *J Anc Dis Prev Remedies* [Internet]. 2017;05(04). Available from: <https://www.omicsonline.org/open-access/physiopathology-of-malariaassociated-acute-respiratory-distress-syndrome-2329-8731-1000171-95983.html>
 77. Van den Steen PE, Deroost K, Deckers J, Van Herck E, Struyf S, Opdenakker G. Pathogenesis of malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *Trends Parasitol* [Internet]. 2013;29(7):346–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2013.04.006>
 78. Souza MC, Silva JD, Pádua TA, Luiza V, Rocco PRM, Grac M. Early and late acute lung injury and their association with distal organ damage in murine malaria. *Respir Physiol Neurobiol*. 2013;186:65–72.
 79. Liu M, Amodu AS, Pitts S, Patrickson J, Hibbert JM, Battle M, et al. Heme Mediated STAT3 Activation in Severe Malaria. Langsley G, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Mar 30;7(3):e34280. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0034280>
 80. Valecha N, Rock G. W. Pinto GDH, Turner AK, Rodrigues S, Dubhashi NG, Rodrigues E, et al. Case Report: Histopathology of Fatal Respiratory Distress Caused by Plasmodium vivax Malaria. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2009 Nov 1;81(5):758–62. Available from: <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.2009.09-0348>
 81. MacPherson GG, Warrell MJ, White NJ, Looareesuwan S. Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am J Pathol*. 1985;119(3):385–401.
 82. BELNOUE E, POTTER SM, ROSA DS, MAUDUIT M, GRÜNER AC, KAYIBANDA M, et al. Control of pathogenic CD8 + T cell migration to the brain

- by IFN- γ during experimental cerebral malaria. *Parasite Immunol* [Internet]. 2008 Oct;30(10):544–53. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3024.2008.01053.x>
83. Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: Development and Tissue Specialization. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2015 Mar 21;33(1):643–75. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-032414-112220>
 84. Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* [Internet]. 2015 Feb 3;518(7540):547–51. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature13989>
 85. Pollard JW. Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2009 Apr;9(4):259–70. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri2528>
 86. Morales-Nebreda L, Misharin A V., Perlman H, Scott Budinger GR. The heterogeneity of lung macrophages in the susceptibility to disease. *Eur Respir Rev* [Internet]. 2015;24(137):505–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1183/16000617.0031-2015>
 87. Mantovani, A, Sica, A, Locati M. Macrophage Polarization Comes of Age. *Immunity* [Internet]. 2005 Oct;23(4):344–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761305003134>
 88. Szekanecz Z, Koch AE. Macrophages and their products in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* [Internet]. 2007 May;19(3):289–95. Available from: <http://journals.lww.com/00002281-200705000-00012>
 89. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* [Internet]. 2014 Mar 3;6(March):1–13. Available from: <https://facultyopinions.com/prime/reports/b/6/13/>
 90. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2008 Dec;8(12):958–69. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1038/nri2448>

91. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* [Internet]. 2016 Mar;44(3):450–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.015>
92. Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T, et al. Tumor-Associated Macrophages and Survival in Classic Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2010 Mar 11;362(10):875–85. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0905680>
93. Sica A, Erreni M, Allavena P, Porta C. Macrophage polarization in pathology. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2015 Nov 26;72(21):4111–26. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-015-1995-y>
94. Huang L, Nazarova E V., Tan S, Liu Y, Russell DG. Growth of Mycobacterium tuberculosis in vivo segregates with host macrophage metabolism and ontogeny. *J Exp Med* [Internet]. 2018 Apr 2;215(4):1135–52. Available from: <https://rupress.org/jem/article/215/4/1135/42429/Growth-of-Mycobacterium-tuberculosis-in-vivo>
95. Ardain A, Marakalala MJ, Leslie A. Tissue-resident innate immunity in the lung. *Immunology* [Internet]. 2020 Mar 21;159(3):245–56. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/imm.13143>
96. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* [Internet]. 2013 Oct 18;14(10):986–95. Available from: <http://www.nature.com/articles/ni.2705>
97. Schyns J, Bureau F, Marichal T. Lung Interstitial Macrophages: Past, Present, and Future. *J Immunol Res* [Internet]. 2018;2018:1–10. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2018/5160794/>
98. Huang X, Xiu H, Zhang S, Zhang G. The Role of Macrophages in the Pathogenesis of ALI/ARDS. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2018 May 13;2018:1–8. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2018/1264913/>

99. Klinkhamhom A, Glaharn S, Srisook C, Ampawong S, Krudsood S, Ward SA, et al. M1 macrophage features in severe Plasmodium falciparum malaria patients with pulmonary oedema. *Malar J.* 2020;1–9.
100. Matthay MA, Zimmerman GA. Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Cell Mol Biol* [Internet]. 2005 Oct;33(4):319–27. Available from: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/rcmb.F305>
101. Marichal T, Mesnil C, Bureau F. Homeostatic Eosinophils: Characteristics and Functions. *Front Med* [Internet]. 2017 Jul 11;4(JUL):1–6. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmed.2017.00101/full>
102. Rothenberg ME, Hogan SP. THE EOSINOPHIL. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2006 Apr;24(1):147–74. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090720>
103. Possa SS, Leick EA, Prado CM, Martins MA, Tibério IFLC. Eosinophilic Inflammation in Allergic Asthma. *Front Pharmacol* [Internet]. 2013;4(April):1–9. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2013.00046/abstract>
104. Németh T, Sperandio M, Mócsai A. Neutrophils as emerging therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2020 Apr 22;19(4):253–75. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41573-019-0054-z>
105. Ley K, Hoffman HM, Kubes P, Cassatella MA, Zychlinsky A, Hedrick CC, et al. Neutrophils: New insights and open questions. *Sci Immunol* [Internet]. 2018 Dec 7;3(30):eaat4579. Available from: <https://immunology.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/sciimmunol.aat4579>
106. Giacalone VD, Margaroli C, Mall MA, Tirouvanziam R. Neutrophil Adaptations upon Recruitment to the Lung: New Concepts and Implications for Homeostasis and Disease. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Jan 28;21(3):851. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/3/851>
107. Rosales C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell

- Types? *Front Physiol* [Internet]. 2018 Feb 20;9(FEB):1–17. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2018.00113/full>
108. Craig AG, Grau GE, Janse C, Kazura JW, Milner D, Barnwell JW, et al. The Role of Animal Models for Research on Severe Malaria. Rall GF, editor. *PLoS Pathog* [Internet]. 2012 Feb 2;8(2):e1002401. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1002401>
 109. Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas A-M, Marsh K. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat Immunol* [Internet]. 2008 Jul;9(7):725–32. Available from: <http://www.nature.com/articles/ni.f.205>
 110. Kooij TWA, Carlton JM, Bidwell SL, Hall N, Ramesar J, Janse CJ, et al. A Plasmodium Whole-Genome Synteny Map: Indels and Synteny Breakpoints as Foci for Species-Specific Genes. Boothroyd J, editor. *PLoS Pathog* [Internet]. 2005 Dec 23;1(4):e44. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.0010044>
 111. Lamb TJ, Brown DE, Potocnik AJ, Langhorne J. Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. *Expert Rev Mol Med* [Internet]. 2006 Mar 24;8(6):1–22. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1462399406010581/type/journal_article
 112. Li C, Seixas E, Langhorne J. Rodent malarias: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite. *Med Microbiol Immunol* [Internet]. 2001 Apr;189(3):115–26. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s430-001-8017-8>
 113. Kremsner PG, Neifer S, Chaves MF, Rudolph R, Bienzle U. Interferon- γ induced lethality in the late phase of *Plasmodium vinckei* malaria despite effective parasite clearance by chloroquine. *Eur J Immunol* [Internet]. 1992 Nov;22(11):2873–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.1830221118>
 114. Otto TD, Böhme U, Jackson AP, Hunt M, Franke-Fayard B, Hoeijmakers WAM,

- et al. A comprehensive evaluation of rodent malaria parasite genomes and gene expression. *BMC Biol* [Internet]. 2014 Dec 30;12(1):86. Available from: <http://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-014-0086-0>
115. Taylor WRJ, Ca??on V, White NJ. Pulmonary Manifestations of Malaria. *Treat Respir Med* [Internet]. 2006;5(6):419–28. Available from: <http://link.springer.com/10.2165/00151829-200605060-00007>
 116. Franke-Fayard B, Trueman H, Ramesar J, Mendoza J, van der Keur M, van der Linden R, et al. A *Plasmodium berghei* reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle. *Mol Biochem Parasitol* [Internet]. 2004 Sep;137(1):23–33. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166685104001173>
 117. De Niz M, Heussler VT. Rodent malaria models: insights into human disease and parasite biology. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2018;46(Table 2):93–101. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.09.003>
 118. Candido Moura G, Barcelos D, Epiphanio S, Santos Ortolan L dos. Physiopathology of Malaria-Associated Acute Respiratory Distress Syndrome. *J Anc Dis Prev Remedies*. 2017;05(04).
 119. Redford PS, Murray PJ, O'Garra A. The role of IL-10 in immune regulation during *M. tuberculosis* infection. *Mucosal Immunol*. 2011;4(3):261–70.
 120. White NJ, Ho M. The Pathophysiology of Malaria. In 1992. p. 83–173. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065308X08600214>
 121. Kirchgatter K, Del Portillo HA. Clinical and molecular aspects of severe malaria. *An Acad Bras Cienc* [Internet]. 2005 Sep;77(3):455–75. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652005000300008&lng=en&tlng=en
 122. Mascia L. Acute Lung Injury in Patients with Severe Brain Injury: A Double Hit Model. *Neurocrit Care* [Internet]. 2009 Dec 23;11(3):417–26. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12028-009-9242-8>

123. Mohan A, Sharma SK, Bollineni S. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in malaria. *J Vector Borne Dis*. 2008;45(3):179–93.
124. Charoenpan P, Indraprasit S, Kiatboonsri S, Suvachittanont O, Tanomsup S. Pulmonary edema in severe falciparum malaria. Hemodynamic study and clinicophysiological correlation. *Chest* [Internet]. 1990;97(5):1190–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1378/chest.97.5.1190>
125. Shibui A, Hozumi N, Shiraishi C, Sato Y, Iida H, Sugano S, et al. CD4+ T cell response in early erythrocytic stage malaria: Plasmodium berghei infection in BALB/c and C57BL/6 mice. *Parasitol Res* [Internet]. 2009 Jun 8;105(1):281. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00436-009-1435-8>
126. Martins YC, Clemmer L, Orjuela-Sánchez P, Zanini GM, Ong PK, Frangos JA, 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. *Malar J* [Internet]. 2013 Dec 24;12(1):138. Available from: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-12-138>
127. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2002 Nov;2(11):845–58. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri933>
128. Sukriti S, Tauseef M, Yazbeck P, Mehta D. Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. *Pulm Circ* [Internet]. 2014 Dec;4(4):535–51. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1086/677356>
129. Elzein F, Mohammed N, Ali N, Bahloul A, Albadani A, Alsherbeen N. Pulmonary manifestation of Plasmodium falciparum malaria: Case reports and review of the literature. *Respir Med Case Reports* [Internet]. 2017;22:83–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rmcr.2017.06.014>
130. Lovegrove FE, Gharib SA, Peña-Castillo L, Patel SN, Ruzinski JT, Hughes TR, et al. Parasite Burden and CD36-Mediated Sequestration Are Determinants of Acute Lung Injury in an Experimental Malaria Model. Kazura J, editor. *PLoS Pathog* [Internet]. 2008 May 16;4(5):e1000068. Available from:

<https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000068>

131. Lagassé HAD, Anidi IU, Craig JM, Limjunyawong N, Poupore AK, Mitzner W, et al. Recruited monocytes modulate malaria-induced lung injury through CD36-mediated clearance of sequestered infected erythrocytes. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2016;99(5):659–71. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.4HI0315-130RRR>
132. Claser C, Nguee SYT, Balachander A, Wu Howland S, Becht E, Gunasegaran B, et al. Lung endothelial cell antigen cross-presentation to CD8+T cells drives malaria-associated lung injury. *Nat Commun* [Internet]. 2019;10(1):1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-12017-8>
133. De Castro Quirino T, Dos Santos Ortolan L, Sercundes MK, Marinho CRF, Turato WM, Epiphonio S. Lung aeration in experimental malaria-associated acute respiratory distress syndrome by SPECT/CT analysis. *PLoS One* [Internet]. 2020;15(5). Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0233864>
134. Punchard NA, Whelan CJ, Adcock I. The Journal of Inflammation. *J Inflamm* [Internet]. 2004;1:1–4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rmcr.2017.06.014>
135. Dunn CJ. Inflammatory mechanisms in the newborn. *Agents Actions* [Internet]. 1976 Feb;6(1–3):263–71. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF01972220>
136. Oberli A, Zurbrügg L, Rusch S, Brand F, Butler ME, Day JL, et al. Plasmodium falciparum Plasmodium helical interspersed subtelomeric proteins contribute to cytoadherence and anchor P. falciparum erythrocyte membrane protein 1 to the host cell cytoskeleton. *Cell Microbiol* [Internet]. 2016 Oct;18(10):1415–28. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/cmi.12583>
137. ROGERSON* SJ, GRAU GE, HUNT NH. The Microcirculation in Severe Malaria. *Microcirculation* [Internet]. 2004 Jan;11(7):559–76. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1080/10739680490503311>
138. Maknitikul S, Luplertlop N, Grau GER, Ampawong S. Dysregulation of pulmonary

- endothelial protein C receptor and thrombomodulin in severe falciparum malaria-associated ARDS relevant to hemozoin. Huy NT, editor. PLoS One [Internet]. 2017 Jul 21;12(7):e0181674. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0181674>
139. Epiphanio S, Campos MG, Pamplona A, Carapau D, Pena AC, Ataíde R, et al. VEGF Promotes Malaria-Associated Acute Lung Injury in Mice. Stevenson MM, editor. PLoS Pathog [Internet]. 2010 May 20;6(5):e1000916. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000916>
140. Verjans E, Kanzler S, Ohl K, Rieg AD, Ruske N, Schippers A, et al. Initiation of LPS-induced pulmonary dysfunction and its recovery occur independent of T cells. BMC Pulm Med [Internet]. 2018 Dec 22;18(1):174. Available from: <https://bmcpulmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12890-018-0741-2>
141. Mehta AK, Croft M. Rhinovirus Infection Promotes Eosinophilic Airway Inflammation after Prior Exposure to House Dust Mite Allergen. ImmunoHorizons [Internet]. 2020 Aug 1;4(8):498–507. Available from: <http://www.immunohorizons.org/lookup/doi/10.4049/immunohorizons.2000052>
142. Davis TME, Ho M, Supanaranond W, Looareesuwan S, Pukrittayakamee S, White NJ. Changes in the peripheral blood eosinophil count in falciparum malaria. Acta Trop [Internet]. 1991 Jan;48(3):243–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0001706X9190052L>
143. Kurtzhals, Reimert, Tette, Dunyo, Koram, Akanmori, et al. Increased eosinophil activity in acute Plasmodium falciparum infection-association with cerebral malaria. Clin Exp Immunol [Internet]. 1998 May;112(2):303–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2249.1998.00586.x>
144. REILEY CG, BARRETT O. Leukocyte response in acute malaria. Am J Med Sci [Internet]. 1971 Sep;262(3):153–8. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=0000441-197109000-00002>
145. Dunay IR, Fuchs A, Sibley LD. Inflammatory Monocytes but Not Neutrophils Are

- Necessary To Control Infection with *Toxoplasma gondii* in Mice. *Infect Immun* [Internet]. 2010 Apr;78(4):1564–70. Available from: <https://iaiasm.org/content/78/4/1564>
146. Lee J, Boyce S, Powers J, Baer C, Sassetti CM, Behar SM. CD11c^{hi} monocyte-derived macrophages are a major cellular compartment infected by *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* [Internet]. 2020;16(6):1–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1008621>
 147. Castaño D, Barrera LF, Rojas M. *Mycobacterium tuberculosis* alters the differentiation of monocytes into macrophages in vitro. *Cell Immunol* [Internet]. 2011 Jan;268(2):60–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008874911000311>
 148. Hoeve MA, Nash AA, Jackson D, Randall RE, Dransfield I. Influenza Virus A Infection of Human Monocyte and Macrophage Subpopulations Reveals Increased Susceptibility Associated with Cell Differentiation. Filion LG, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jan 4;7(1):e29443. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0029443>
 149. Aldridge JR, Moseley CE, Boltz DA, Negovetich NJ, Reynolds C, Franks J, et al. TNF/*i*NOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2009 Mar 31;106(13):5306–11. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0900655106>
 150. Anstey NM, Jacups SP, Cain T, Pearson T, Ziesing PJ, Fisher DA, et al. Pulmonary manifestations of uncomplicated falciparum and vivax malaria: Cough, small airways obstruction, impaired gas transfer, and increased pulmonary phagocytic activity. *J Infect Dis*. 2002;185(9):1326–34.
 151. Dobbs KR, Crabtree JN, Dent AE. Innate immunity to malaria—The role of monocytes. *Immunol Rev* [Internet]. 2020 Jan 16;293(1):8–24. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/imr.12830>
 152. Lagassé HAD, Anidi IU, Craig JM, Limjunyawong N, Poupore AK, Mitzner W, et al. Recruited monocytes modulate malaria-induced lung injury through CD36-

- mediated clearance of sequestered infected erythrocytes. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2016 May;99(5):659–71. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.4HI0315-130RRR>
153. Galvão-Filho B, de Castro JT, Figueiredo MM, Rosmaninho CG, Antonelli LR do V, Gazzinelli RT. The emergence of pathogenic TNF/iNOS producing dendritic cells (Tip-DCs) in a malaria model of acute respiratory distress syndrome (ARDS) is dependent on CCR4. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2019;12(2):312–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41385-018-0093-5>
 154. Patel SN, Serghides L, Smith TG, Febbraio M, Silverstein RL, Kurtz TW, et al. CD36 Mediates the Phagocytosis of Plasmodium falciparum –Infected Erythrocytes by Rodent Macrophages. *J Infect Dis* [Internet]. 2004 Jan 15;189(2):204–13. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/380764>
 155. Maus UA, Wellmann S, Hampl C, Kuziel WA, Srivastava M, Mack M, et al. CCR2-positive monocytes recruited to inflamed lungs downregulate local CCL2 chemokine levels. *Am J Physiol Cell Mol Physiol* [Internet]. 2005 Feb;288(2):L350–8. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajplung.00061.2004>
 156. Lin S-J, Lo M, Kuo R-L, Shih S-R, Ojcius DM, Lu J, et al. The pathological effects of CCR2+ inflammatory monocytes are amplified by an IFNAR1-triggered chemokine feedback loop in highly pathogenic influenza infection. *J Biomed Sci* [Internet]. 2014 Dec 18;21(1):99. Available from: <https://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12929-014-0099-6>
 157. Eruslanov EB, Lyadova I V., Kondratieva TK, Majorov KB, Scheglov I V., Orlova MO, et al. Neutrophil Responses to Mycobacterium tuberculosis Infection in Genetically Susceptible and Resistant Mice. *Infect Immun* [Internet]. 2005 Mar;73(3):1744–53. Available from: <https://iai.asm.org/content/73/3/1744>
 158. Aitken EH, Alemu A, Rogerson SJ. Neutrophils and Malaria. *Front Immunol* [Internet]. 2018 Dec 19;9(December):3005. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.03005/full>

159. Sengupta A, Sarkar S, Keswani T, Mukherjee S, Ghosh S, Bhattacharyya A. Impact of autophagic regulation on splenic red pulp macrophages during cerebral malarial infection. *Parasitol Int* [Internet]. 2019;71(March):18–26. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.03.008>
160. Sercundes MK, Ortolan LS, Debone D, Soeiro-Pereira P V., Gomes E, Aitken EH, et al. Targeting Neutrophils to Prevent Malaria-Associated Acute Lung Injury/Acute Respiratory Distress Syndrome in Mice. *PLoS Pathog.* 2016;12(12):1–24.
161. Rocha BC, Marques PE, Leoratti FM de S, Junqueira C, Pereira DB, Antonelli LR do V, et al. Type I Interferon Transcriptional Signature in Neutrophils and Low-Density Granulocytes Are Associated with Tissue Damage in Malaria. *Cell Rep* [Internet]. 2015;13(12):2829–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.055>
162. Porcherie A, Mathieu C, Peronet R, Schneider E, Claver J, Commere P-H, et al. Critical role of the neutrophil-associated high-affinity receptor for IgE in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *J Exp Med* [Internet]. 2011 Oct 24;208(11):2225–36. Available from: <https://rupress.org/jem/article/208/11/2225/40961/Critical-role-of-the-neutrophil-associated>
163. Vandermosten L, Pham TT, Possemiers H, Knoops S, Van Herck E, Deckers J, et al. Experimental malaria-associated acute respiratory distress syndrome is dependent on the parasite-host combination and coincides with normocyte invasion. *Malar J* [Internet]. 2018;17(1):1–17. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2251-3>
164. NIELSEN H, KHARAZMI A, THEANDER TG. Suppression of blood monocyte and neutrophil chemotaxis in acute human malaria. *Parasite Immunol* [Internet]. 1986 Nov;8(6):541–50. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3024.1986.tb00868.x>
165. Leoratti FM de S, Trevelin SC, Cunha FQ, Rocha BC, Costa PAC, Gravina HD, et al. Neutrophil Paralysis in *Plasmodium vivax* Malaria. Rodrigues MM, editor.

- PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2012 Jun 26;6(6):e1710. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0001710>
166. Lacerda MVG, Fragoso SCP, Alecrim MGC, Alexandre MAA, Magalhães BML, Siqueira AM, et al. Postmortem Characterization of Patients With Clinical Diagnosis of Plasmodium vivax Malaria: To What Extent Does This Parasite Kill? Clin Infect Dis [Internet]. 2012 Oct 15;55(8):e67–74. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/cis615>
 167. Yamasaki K, Eeden SF Van. Lung Macrophage Phenotypes and Functional Responses: Role in the Pathogenesis of COPD. Int J Mol Sci [Internet]. 2018 Feb 15;19(2):582. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/2/582>
 168. Galvão-Filho B, de Castro JT, Figueiredo MM, Rosmaninho CG, Antonelli LR do V, Gazzinelli RT. The emergence of pathogenic TNF/iNOS producing dendritic cells (Tip-DCs) in a malaria model of acute respiratory distress syndrome (ARDS) is dependent on CCR4. Mucosal Immunol [Internet]. 2019 Mar 18;12(2):312–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24655651>
 169. Herold S, Mayer K, Lohmeyer J. Acute Lung Injury: How Macrophages Orchestrate Resolution of Inflammation and Tissue Repair. Front Immunol [Internet]. 2011;2(NOV):1–13. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2011.00065/abstract>
 170. Califano D, Furuya Y, Metzger DW. Effects of Influenza on Alveolar Macrophage Viability Are Dependent on Mouse Genetic Strain. J Immunol [Internet]. 2018 Jul 1;201(1):134–44. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1701406>
 171. Lasbury ME, Merali S, Durant PJ, Tschang D, Ray CA, Lee C. Polyamine-mediated Apoptosis of Alveolar Macrophages during Pneumocystis Pneumonia. J Biol Chem [Internet]. 2007 Apr 13;282(15):11009–20. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M611686200>
 172. Fan EKY, Fan J. Regulation of alveolar macrophage death in acute lung

- inflammation. *Respir Res* [Internet]. 2018 Dec 27;19(1):50. Available from: <https://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12931-018-0756-5>
173. He X, Qian Y, Li Z, Fan EK, Li Y, Wu L, et al. TLR4-Upregulated IL-1 β and IL-1RI Promote Alveolar Macrophage Pyroptosis and Lung Inflammation through an Autocrine Mechanism. *Sci Rep*. 2016;6(April):1–11.
174. Mitsi E, Kamng'ona R, Rylance J, Solórzano C. Human alveolar macrophages predominately express combined classical M1 and M2 surface markers in steady state. *Respir Res*. 2018;19(1):1–4.
175. Kaku Y, Imaoka H, Morimatsu Y, Komohara Y, Ohnishi K, Oda H, et al. Overexpression of CD163, CD204 and CD206 on Alveolar Macrophages in the Lungs of Patients with Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Eickelberg O, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 Jan 30;9(1):e87400. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0087400>
176. Fulton SA, Reba SM, Pai RK, Pennini M, Torres M, Harding C V., et al. Inhibition of Major Histocompatibility Complex II Expression and Antigen Processing in Murine Alveolar Macrophages by *Mycobacterium bovis* BCG and the 19-Kilodalton Mycobacterial Lipoprotein. *Infect Immun* [Internet]. 2004 Apr;72(4):2101–10. Available from: <https://iai.asm.org/content/72/4/2101>
177. Yao Y, Jeyanathan M, Haddadi S, Barra NG, Vaseghi-Shanjani M, Damjanovic D, et al. Induction of Autonomous Memory Alveolar Macrophages Requires T Cell Help and Is Critical to Trained Immunity. *Cell* [Internet]. 2018;175(6):1634-1650.e17. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.042>
178. Speyer CL, Rancilio NJ, McClintock SD, Crawford JD, Gao H, Sarma JV, et al. Regulatory effects of estrogen on acute lung inflammation in mice. *Am J Physiol Physiol* [Internet]. 2005 Apr;288(4):C881–90. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00467.2004>
179. Redente EF, Higgins DM, Dwyer-Nield LD, Orme IM, Gonzalez-Juarrero M, Malkinson AM. Differential polarization of alveolar macrophages and bone

- marrow-derived monocytes following chemically and pathogen-induced chronic lung inflammation. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2010 Jul;88(1):159–68. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.0609378>
180. Bazzan E, Turato G, Tinè M, Radu CM, Balestro E, Rigobello C, et al. Dual polarization of human alveolar macrophages progressively increases with smoking and COPD severity. *Respir Res* [Internet]. 2017 Dec 23;18(1):40. Available from: <http://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12931-017-0522-0>
 181. Gonçalves RM, Scopel KKG, Bastos MS, Ferreira MU. Cytokine Balance in Human Malaria: Does *Plasmodium vivax* Elicit More Inflammatory Responses than *Plasmodium falciparum*? Snounou G, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Sep 4;7(9):e44394. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0044394>
 182. Clark IA, Alleva LM, Budd AC, Cowden WB. Understanding the role of inflammatory cytokines in malaria and related diseases. *Travel Med Infect Dis* [Internet]. 2008 Jan;6(1–2):67–81. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1477893907000609>
 183. Rudin W, Eugster H Pietro, Bordmann G, Bonato J, Müller M, Yamage M, et al. Resistance to cerebral malaria in tumor necrosis factor- α/β -deficient mice is associated with a reduction of intercellular adhesion molecule-1 up-regulation and T helper type 1 response. *Am J Pathol*. 1997;150(1):257–66.
 184. Cunnington AJ, Riley EM, Walther M. Stuck in a rut? Reconsidering the role of parasite sequestration in severe malaria syndromes. *Trends Parasitol* [Internet]. 2013 Dec;29(12):585–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2013.10.004>
 185. Mootoo A, Stylianou E, Arias M, Reljic R. TNF- α ; in Tuberculosis: A Cytokine with a Split Personality. *Inflamm Allergy-Drug Targets* [Internet]. 2009 Mar 1;8(1):53–62. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5281&volume=8&issue=1&spage=53>

186. Asao H. Interleukin-2☆. In: Reference Module in Biomedical Sciences [Internet]. Elsevier; 2014. p. 1–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128012383040587>
187. McKinstry KK, Alam F, Flores-Malavet V, Nagy MZ, Sell S, Cooper AM, et al. Memory CD4 T cell-derived IL-2 synergizes with viral infection to exacerbate lung inflammation. Sant AJ, editor. PLOS Pathog [Internet]. 2019 Aug 14;15(8):e1007989. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1007989>
188. R. Rabinovici M., ; Sofronski P, Borboroglu A., . Spirig LM, Hillegas J, Levine J, et al. Interleukin-2-Induced Lung Injury. *Circ Res*. 1994;329–35.
189. Okamoto M. Interleukin 18 (IL-18) in synergy with IL-2 induces lethal lung injury in mice: a potential role for cytokines, chemokines, and natural killer cells in the pathogenesis of interstitial pneumonia. *Blood* [Internet]. 2002 Feb 15;99(4):1289–98. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood.V99.4.1289>
190. Shanley TP, Vasi N, Denenberg A. REGULATION OF CHEMOKINE EXPRESSION BY IL-10 IN LUNG INFLAMMATION. *Cytokine* [Internet]. 2000 Jul;12(7):1054–64. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466699906555>
191. Schmidt KE, Kuepper JM, Schumak B, Alferink J, Hofmann A, Howland SW, et al. Doxycycline inhibits experimental cerebral malaria by reducing inflammatory immune reactions and tissue-degrading mediators. Carvalho LJ de M, editor. PLoS One [Internet]. 2018 Feb 13;13(2):e0192717. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0192717>
192. Kumar R, Ng S, Engwerda C. The role of IL-10 in malaria: A double edged sword. *Front Immunol*. 2019;10(FEB):1–10.
193. Toews GB. Cytokines and the lung. *Eur Respir J* [Internet]. 2001 Jul 2;18(1):3–17. Available from: <http://erj.ersjournals.com/cgi/doi/10.1183/09031936.01.00266001>

9. Anexos

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



Instituto Oswaldo Cruz

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/ IOC

L041/2016

LICENÇA

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
CEP: 21040-360 Tel: (21) 2562-1056

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/IOC

LICENÇA

L-029/2020

Certificamos que o protocolo (CEUA/IOC-020/2020), intitulado, “Importância do recrutamento e plasticidade das células do sistema imune inato em camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com Plasmodium berghei ANKA, modelos experimentais de resistência e suscetibilidade ao desenvolvimento da malária cerebral”, sob a responsabilidade de **FLÁVIA LIMA RIBEIRO GOMES** atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na legislação nacional.

Esta licença tem validade até 21/10/2024 e inclui o uso total de:

Camundongo (*Mus musculus*), linhagem C57BL/6 - 1622 - animais machos ou fêmeas de 6-8 semanas - origem - ICTB

Camundongo (*Mus musculus*), linhagem BALB/c - 1622 - animais machos ou fêmeas de 6-8 semanas - origem - ICTB

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.

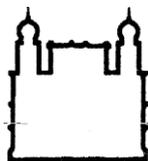


Tânia Zaverucha do Valle

Rio de Janeiro, 22 de outubro de 2020.

Matrícula SIAPE 1362665

**Coordenadora da CEUA/Instituto
Oswaldo Cruz Fundação Oswaldo Cruz**



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/IOC

L-041/2016-

LICENÇA ADITIVA

A Comissão CEUA/IOC, em atenção à solicitação da pesquisadora, **FLÁVIA LIMA RIBEIRO GOMES** responsável pela licença (L-041/2016), do protocolo (CEUA/IOC-035/2016), intitulado "Importância do recrutamento, diferenciação e ativação de células do sistema imune inato e adquirido na malária", que atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), autoriza o presente aditivo. A referida licença aditiva não exime a observância das Leis e demais exigências legais na legislação nacional.

Esta licença aditiva tem validade até 30/09/2020, inclui a adição de **Camundongo (*Mus musculus*), da linhagem C57BL/6 - 94 fêmeas de 6-8 semanas** - origem ICTB - totalizando o número de 497 animais, salvo o número de animais já utilizados até a presente data, e inclui novos membros e exclui o membro Césare Bianco Junior.

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.

Tânia Zaverucha do Valle

Rio de Janeiro, 07 de janeiro de 2020.
**Coordenador Adjunto 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 CEP: 21040-360
Tel: (21) 2562-1056