

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**O papel da integrina CD11d/CD18 na diferenciação e ativação de macrófagos:
Efeitos de heme e hemozoina sintética na resposta imune.**

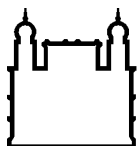
André Costa Ferreira

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

Prof^ª. Dra. Adriana Vieira de Abreu

RIO DE JANEIRO

2012



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ANDRÉ COSTA FERREIRA

**O papel da integrina CD11d/CD18 na diferenciação e ativação de macrófagos:
Efeitos de heme e hemozoína sintética na resposta imune.**

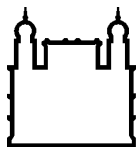
**Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo
Cruz como parte dos requisitos para a obtenção
do título de Mestre em Biologia Celular e
Molecular**

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

Prof^ª. Dra. Adriana Vieira de Abreu

RIO DE JANEIRO

2012



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: André Costa Ferreira

**O papel da integrina CD11d/CD18 na diferenciação e ativação de macrófagos:
Efeitos de heme e hemozoína sintética na resposta imune.**

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

Prof^ª. Dra. Adriana Vieira de Abreu

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

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

Prof^ª. Dra. Clarissa Menezes Maya Monteiro – IOC

Prof^ª. Dra. Maria de Fátima Ferreira da Cruz – IOC

Prof^ª. Dra. Cecília Jacques Gonçalves de Almeida – Revisora – IOC

Prof^ª. Dra. Liliane Rosa Alves - INCA

Rio de Janeiro, 19 de Abril de 2012.

Agradecimentos

Aos meus queridos orientadores Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto e Dra. Adriana Vieira de Abreu, pelos ensinamentos, pelo apoio, ajuda e principalmente por terem acreditado em mim. Sem vocês nada disso seria possível. Inclusive, agradeço até pelos puxões de orelha, sem mexer na minha orelha, é claro.

À minha esposa maravilhosa e á minha linda filhinha Rachel, meus amores e fôlego de vida. Sem vocês eu não sei o que seria de mim hoje. Só posso agradecer muito pelas suas vidas.

Aos meus queridos pais Fátima e Josias pela força e pelas lutas que venceram para me criar no caminho certo, acreditem, isso não tem preço, e aos meus amados e queridos irmãos João e Raquel pelo companheirismo, pela amizade e por todo o amor que tem para comigo.

À minha queridinha irmãzinha Isaclaudia Gomes pelo carinho, companheirismo, saiba que você mora dentro do meu coração. Álias eu te agradeço também por ter me feito trabalhar em milhares de cinéticas, inclusive em dias de sábado, domingo, feriados, ter contado milhares de lâminas. Enfim só tenho motivos para agradecer-te.

À Dra. Patrícia Bozza pelo exemplo de dedicação e coragem, e ao Dr. Válber Frutuoso pela ajuda e serenidade, sempre me tratou como um dos seus alunos, ou seja, um paizão.

A Dra. Daniella ou Danielle Nascimento, às vezes eu me confundo. Pela ajuda em vários experimentos, pela preocupação comigo, pelos conselhos. Você é uma parte fundamental deste trabalho.

Ao Diego Mendes pela força e ajuda, apesar de não ter me ensinado a fazer fotossíntese. À Isabel Matos pelas conversas animadoras e desesperadas, a gente sempre esta em apuros. Ao Edson Assis pela ajuda e apoio, você sempre será uma ótima aquisição na minha formação. A Alessandra Mendonça que mesmo com o seu problema de ftofobia sempre me ajudou em diversos experimentos.

Às doutoras Rachel Novaes, Patrícia Reis pela ajuda e carinho constantes no lab. À Joana D'Ávila pelo incentivo e força. À Adriana Ribeiro pelo incentivo desde que eu comecei no lab. Mônica Farah pela ajuda, principalmente por pedir os animais para mim.

Aos meus queridos amigos Diogo Dibo, Andrea Surrage, Cristiane Zanon, Roberta, Lígia, Flora, Lívia, Mariana, Silvio, Pedrão (que tem péssimo gosto musical), Tatiana, Clarissinha, enfim, a toda a equipe do laboratório de IMUNOFARMACOLOGIA, que por motivo de espaço aqui não posso colocar os seus nomes, mas todos vocês foram fundamentais para o meu crescimento.

À Rose Branco pela ajuda, preocupação, apoio e por sua dedicação incansável em sempre nos apoiar.

Ao Nelson do biotério pela dedicação de sempre fazer o melhor.

À Andréia e Tatiane da secretária do pavilhão Ozório de Almeida pelo apoio e ajuda.

Aos componentes da banca por terem tão generosamente aceitado ao convite de avaliar a minha dissertação.

Aos meus colegas de faculdade, dos quais eu tenho grandes saudades.

Ao meus queridos amigos da igreja, pelas suas orações incessantes por mim.

E gostaria de para encerrar, agradecer principalmente ao Deus, Todo-Poderoso, pelo dom da vida e por ter me dado uma família tão linda, amigos e companheiros inesquecíveis ao longo de minha trajetória neste mundo. Para ELE seja dada toda a glória.

ÍNDICE

Lista de Tabelas e figuras.....	ix
Resumo.....	xi
Abstract.....	xii
Lista de abreviaturas.....	xiii
1. Introdução.....	1
1.1. Parasitoses.....	1
1.2. Malária.....	1
1.3. Ciclo do Parasito.....	5
1.4. Immunopatologia da malária.....	8
1.5. Hemozoína e heme na malária.....	10
1.6. Macrófagos.....	11
1.6.1. Macrófagos na malária.....	14
1.7. Integrinas.....	15
1.8. Integrina CD11d/CD18.....	17
2. Justificativa.....	19
3. Objetivos.....	20
3.1. Objetivo Geral.....	20
3.2. Objetivos específicos.....	20
4. Materiais e métodos.....	21
4.1. Animais.....	21
4.2. Manutenção do estoque de <i>Plasmodium Berghei</i> Anka (PbA).....	21
4.3. Parasitemias e infecções.....	21

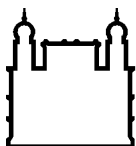
4.4. Soluções, estímulos, linhagens celulares e meios de cultura.....	22
4.4.1. Soluções.....	22
4.4.2. Estímulos.....	24
4.4.3. Meios de cultura.....	26
4.5. Cultura de células de linhagem.....	27
4.5.1. Linhagem L929 (linhagem de Fibroblasto murino).....	27
4.5.2. Linhagem RAW 264.7 (linhagem de Macrófagos Peritoneais murino).....	28
4.6. Culturas primárias.....	28
4.6.1. Macrófagos peritoneais.....	28
4.6.2. Macrófagos diferenciados da medula óssea.....	29
4.7. Ensaio de diferenciação celular.....	29
4.8. Ensaio de proliferação celular.....	30
4.9. Extração de RNA.....	30
4.10. Preparo de cDNA para a integrina CD11d.....	31
4.11. Reação em cadeia de polimerase quantitativo (PCR em tempo real)....	32
4.12. Dosagem de proteínas pelo método do BCA (Pierce).....	32
4.13. TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico	32
4.14. Dosagem de citocinas através do ensaio imunoabsorção ligado à Enzima (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> , ELISA).....	33
4.15. Dosagem de prostaglandina E ₂ (PGE ₂) através do <i>Kit</i> de ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme Immunoassay</i> , EIA) monoclonal (Cayman Chemical....	34
4.16. Purificação de PRBCs.....	35
4.17. Ensaio de fagocitose de hemácias parasitadas.....	35
4.18. Ensaio de fagocitose de β -hematina (sHz).....	36
4.19. Análise Estatística.....	36

5. Resultados.....	37
5.1. A integrina CD11d/CD18 não interfere na diferenciação proliferação de macrófagos diferenciados da medula óssea.....	37
5.2. A integrina CD11d/CD18 é dinamicamente expressa em macrófagos diferenciados da medula óssea.....	39
5.3. Aumento da expressão integrina CD11d em macrófagos estimulados com estímulos <i>in vitro</i>	41
5.4. A integrina CD11d/CD18 influencia o padrão de produção de ROS <i>in vitro</i>	43
5.5. A integrina CD11d influencia o padrão de produção de citocinas <i>in vitro</i>	45
5.6. A integrina CD11d/CD18 influencia o padrão de produção de Prostaglandina E ₂ <i>in vitro</i>	50
5.7. A ausência da integrina CD11d/CD18 altera a capacidade fagocítica de macrófagos <i>in vitro</i>	51
6. Discussão.....	54
7. Conclusões.....	62
8. Perspectivas.....	63
9. Referências bibliográficas.....	64

Lista de tabelas e figuras

Figura 1.1: Áreas de ocorrência de malária no mundo.....	2
Figura 1.2: A malária no Brasil.....	3
Figura 1.3: Ciclo do <i>Plasmodium sp.</i>	5
Figura 1.4: Esquema de uma integrina leucocitária. Domínios conservados entre as subunidade beta e alfa.....	16
Figura 5.1: Macrófagos de animais <i>CD11d^{+/+}</i> e <i>CD11d^{-/-}</i> não diferem na sua capacidade proliferativa.....	38
Figura 5.2: A expressão da integrina C11d/CD18 em macrófagos provenientes da medula óssea durante a diferenciação.....	40
Figura 5.3: Dinâmica da expressão da integrina CD11d em cultura células das linhagens RAW 264.7 estimuladas com sHz.....	42
Figura 5.4.1: O papel da integrina CD11d na formação de estresse oxidativo em células RAW 264.7.....	44
Figura 5.4.2: O papel da integrina CD11d na formação de estresse oxidativo em macrófagos peritoneais.....	44
Figura 5.4.3: O papel da integrina CD11d na formação de estresse oxidativo em macrófagos diferenciados da medula óssea.....	45
Figura 5.5.1: Diferenças no perfil de produção de TNF- α em células RAW 264.7..	47
Figura 5.5.2: Diferenças no perfil de produção de TNF- α em macrófagos peritoneais de animais <i>CD11d^{+/+}</i> e <i>CD11d^{-/-}</i>	48
Figura 5.5.3: Diferenças no perfil de produção de IL-10 em macrófagos diferenciados da medula óssea de animais <i>CD11d^{+/+}</i> e <i>CD11d^{-/-}</i>	49

Figura 5.6: Diferenças no perfil de produção de PGE ₂ em macrófagos de animais <i>CD11d</i> ^{+/+} e <i>CD11d</i> ^{-/-}	50
Figura 5.7: A influência da integrina CD11d/CD18 no processo de fagocitose <i>in vitro</i>	53



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

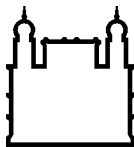
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

O papel da integrina CD11d/CD18 na diferenciação e ativação de macrófagos:
Efeitos de heme e hemozoína sintética na resposta imune.

RESUMO **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

André Costa Ferreira

A malária é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e representa um grande problema de saúde pública. Sabe-se que metade da população mundial vive em áreas endêmicas, onde esta doença gera cerca de 500 milhões de casos clínicos e em torno de 1 milhão de mortes anualmente. O processo infeccioso da malária é desencadeado por uma resposta imunoinflamatória exacerbada do hospedeiro caracterizada por migração e acúmulo de leucócitos, produção de citocinas pró-inflamatórias e mediadores químicos. Neste processo, as leucointegrinas exercem um papel extremamente importante mediando a adesão, migração e sinalização celular. Neste grupo de integrinas, a CD11d/CD18, que foi descrita mais recentemente está envolvida em diversos eventos patológicos como aterosclerose, dano neuronal e outros. Resultados preliminares de nosso grupo mostraram que animais deficientes (CD11d^{-/-}) para esta integrina apresentam uma maior sobrevivência à infecção com *Plasmodium berghei* Anka (PbA). Entretanto, ainda não se conhece o papel desta integrina na fisiopatologia da malária. O presente trabalho mostrou que a integrina CD11d/CD18 é dinamicamente expressa em macrófagos diferenciados da medula óssea de animais infectados com PbA. Ensaio *in vitro* com essas células, demonstraram que esta integrina não afeta a capacidade proliferativa dessas células. Além disso, avaliamos parâmetros importantes para a ativação celular, como produção de espécies reativas de oxigênio e citocinas pró- e anti-inflamatórias. Observamos que macrófagos de animais CD11d^{-/-} produzem quantidades significativamente mais baixas de malondialdeído e de TNF- α , e níveis altos de IL-10 em relação aos macrófagos de animais CD11d^{+/+}. Além disso, a produção de prostaglandina E₂ foi significativamente diminuída em macrófagos provenientes de animais CD11d^{-/-}. Esses dados indicam que a integrina possui um papel importante na modulação da resposta imune. Verificamos ainda que macrófagos de animais CD11d^{-/-} apresentaram uma diminuição na sua capacidade fagocítica de hemácias parasitadas em relação aos macrófagos de animais CD11d^{+/+}. Entretanto, a ausência desta integrina não afetou a capacidade destes macrófagos de fagocitar hemozoína sintética (sHz). Estes resultados juntos sugerem que a integrina CD11d está envolvida no processo de ativação celular dos macrófagos, modulando a resposta imune do hospedeiro na fisiopatologia da malária, o que torna esta molécula um potencial alvo para ações terapêuticas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

The role of integrin CD11d/CD18 differentiation and activation of macrophages:
Effects of heme and synthetic hemozoína in the immune response.

ABSTRACT **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

André Costa Ferreira

Malaria is a parasitic disease caused by protozoa of the genus *Plasmodium* and is a major public health problem. It is known that half the world population lives in endemic areas where this disease causes about 500 million clinical cases and around 1 million deaths annually. The process of malaria infection is initiated by a host immunoinflammatory response exacerbated characterized by the migration and accumulation of leukocytes, the production of proinflammatory cytokines and chemical mediators. In this process, leukointegrins play a very important role in mediating adhesion, migration and cell signaling. In this group of integrins, CD11d/CD18, which has been described more recently, is involved in several pathological events such as atherosclerosis, neuronal damage and others pathologies. Preliminary results from our group have shown that animals deficient (CD11d^{-/-}) for this integrin have a higher survival to infection with *Plasmodium berghei* Anka (PbA). However, we still do not know the role of CD11d/CD18 integrin in the pathophysiology of malaria. The present study demonstrated that the integrin is dynamically expressed in differentiated bone marrow macrophages from animals infected with PbA. Experiments with these cells *in vitro* have demonstrated that the integrin does not affect the proliferative capacity of these cells. Furthermore, we evaluated parameters important to cellular activation, such as production of reactive oxygen species, proinflammatory and anti-inflammatory cytokines. Observed that macrophages, from deficient mice for the integrin CD11d^{-/-}, produce significantly lower amounts of malondialdehyde and TNF- α , and high levels of IL-10 in relation to the macrophages from animals CD11d^{+/+}. Furthermore, the production of prostaglandin E2 was significantly reduced by macrophages from animals CD11d^{-/-}. These data indicate that integrin plays an important role in modulating the immune response. Also verified that macrophages from animals CD11d^{-/-} showed a decrease in their phagocytic ability of infected erythrocytes to macrophages compared to animals CD11d^{+/+}. However, absence of this integrin did not affect the ability of macrophages to phagocytize synthetic hemozoin – sHz. These results together suggest that CD11d integrin is involved in cellular activation of macrophages by modulating the host immune response in the pathophysiology of malaria, which makes this molecule a potential target for therapeutic actions.

Lista de Abreviaturas

BCA	- Ácido bicinconínico (<i>Bicinchoninic acid</i>)
CD	- Grupo de diferenciação (<i>Cluster of differentiation</i>)
CS	- Proteína circunsporozoíta (<i>Circumsporozoite protein</i>)
CSA	- Sulfato de condroitina A (<i>Chondroitin sulfate A</i>)
CXC	- Receptor de quimiocina (<i>Chemokine receptor</i>)
DMEM	- Meio de eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)
DNA	- Ácido desoxirribonucléico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	- Ácido etilendiamino tetraacético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EMP	- Proteína de membrana eritrocitária (<i>Erythrocyte membrane protein</i>)
ERK	- Quinase regulada por sinal extracelular (<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>)
E-Selectina	- Selectina E
GPI	- Glicofosfatidilinositol
HZ	- Hemozoína (<i>Haemozoin</i>)
ICAM-1	- Molécula de adesão intercelular 1 (<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>)
DEPC	- Dietilpirocarbonato (<i>Diethylpyrocarbonate</i>)
IL	- Interleucina

KC	- Quimiocina derivada de queratinócitos (<i>Keratinocyte-derived chemokine</i>)
KD	- Kilodaltons
LPS	- Lipopolisacarídeo (<i>Lipopolysaccharide</i>)
MC	- Malária cerebral (Cerebral malaria)
MIP	- Proteínas inflamatórias de macrófagos (<i>Macrophage inflammatory proteins</i>)
MyD88	- Proteína adaptadora de diferenciação mielóide 88 (<i>Myeloid differentiation primary-response protein-88</i>)
NFκB	- Fator nuclear kappa B (<i>Nuclear factor kappa B</i>)
NO	- Óxido nítrico (<i>Nitric oxide</i>)
PbA	- <i>Plasmodium berguei</i> Anka
PAMP	- Padrões moleculares associados a patógenos (<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>)
PRBC	- Hemácia parasitada (<i>Parasited red blood cell</i>)
PGE ₂	- Prostaglandina E ₂
RBC	- Hemácia não parasitada (<i>Red blood cell</i>)
RNA	- Ácido ribonucléico (<i>Ribonucleic acid</i>)
ROS	- Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive oxygen species</i>)
RPMI	- Meio de cultura desenvolvido em Roswell Park Memorial Institute
SDS	- Dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium dodecyl sulphate</i>)

sHz	- Hemozoína sintética (<i>Sintetic Haemozoin</i>)
SNC	- Sistema nervoso central
TLR	- Receptores semelhantes ao Toll (<i>Toll-like receptors</i>)
TNF- α	- Fator de Necrose Tumoral α (<i>Tumor necrosis factor α</i>)
TRAP	- Proteína adesiva relacionada à trombospondina (<i>Trombospondin-related adhesive protein</i>)
VCAM-1	- Proteína de adesão de células vasculares 1 (<i>Vascular cell adhesion protein 1</i>)
WHO	- Organização Mundial de Saúde (<i>World Health Organization</i>)

1. INTRODUÇÃO

1.1. PARASIToses

Em todo o mundo, grande parte da população sofre de diversas doenças que são causadas por diversos agentes patogênicos ou por agentes físico-psicológicos. Dentre as doenças causadas por agentes patológicos, destacam-se as parasitoses, que são patologias causadas por cerca de 300 espécies de helmintos e cerca de 70 espécies de protozoários (Ashford e cols, 1998). Segundo levantamentos da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2009), estas patologias afetam cerca de 25% da população mundial, ou seja, a cada quatro habitantes do planeta, um sofre de alguma parasitose, principalmente em países em desenvolvimento e de climas tropical e subtropical (OMS, 2009).

Estes números são altos devido à complexidade do ciclo vital e fisiologia destes agentes, dificultando, assim, o desenvolvimento de novos fármacos, vacinas e tratamentos. Entre as parasitoses, a malária é ainda a doença de maior incidência no mundo atingindo cerca de 5 – 10% da população mundial (Schofield e cols, 2005; Langhorne e cols, 2008).

1.2. MALÁRIA

O parasito causador da malária foi descrito pelo médico francês Charles Louis Alphonse Laveran em 1880, sendo inicialmente incluído no gênero *Oscillaria*, entretanto, uma vez que este gênero representava um grupo de plantas, o parasito causador da malária foi incluído no gênero *Plasmodium* em 1885 (Marchiafava & Bignami, 1894). A malária é uma doença, cujo registro histórico remonta desde a antiguidade (COX, 2002), havendo relatos da presença da doença na China e no Egito desde o segundo milênio a.C. Hipócrates a descreveu como “febre dos pântanos” (Di Santi & Boulos, 2002). Essa patologia é reconhecida como grave problema de saúde pública, sendo responsável pela morte de cerca de 655 mil pessoas a cada ano (OMS, 2011). Essa patologia só é superada em número de mortes pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (OMS, 2009).

A malária é uma doença endêmica que atinge cerca de cento e seis países atingindo principalmente crianças nas regiões subsaarianas, Ásia, América do Sul e Oceania, onde esta doença gera cerca de 216 milhões de casos clínicos (Figura 1.1

- OMS, 2010). Esta doença afeta populações pobres, onde a morbidade e a mortalidade são atribuídas à falta de acesso ao tratamento adequado, bem como a deficiência do diagnóstico precoce preciso (Luhan, 1996). No Brasil o maior número de casos é verificado na Amazônia Legal (Figura 1.2), considerada área endêmica para a malária, que é composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão, com registro de cerca de 263 mil casos por ano (SVS, 2011). Porém, devido à grande dificuldade de acesso a determinadas regiões ribeirinhas às margens do rio Amazonas, estipula-se que o número real seja bem maior ao ano, ou seja, o Brasil é o responsável pela notificação do maior número de casos de malária nas Américas Central e do Sul (Braga et al, 2000; Di Santi & Boulos, 2002; Ferreira e cols, 2003; Rey, 2008).

Fora da região amazônica, dos raros casos de malária registrados, 64% são gerados por pessoas naturais de regiões sem prevalência de malária, logo sem imunidade à doença, que estiveram em regiões endêmicas.

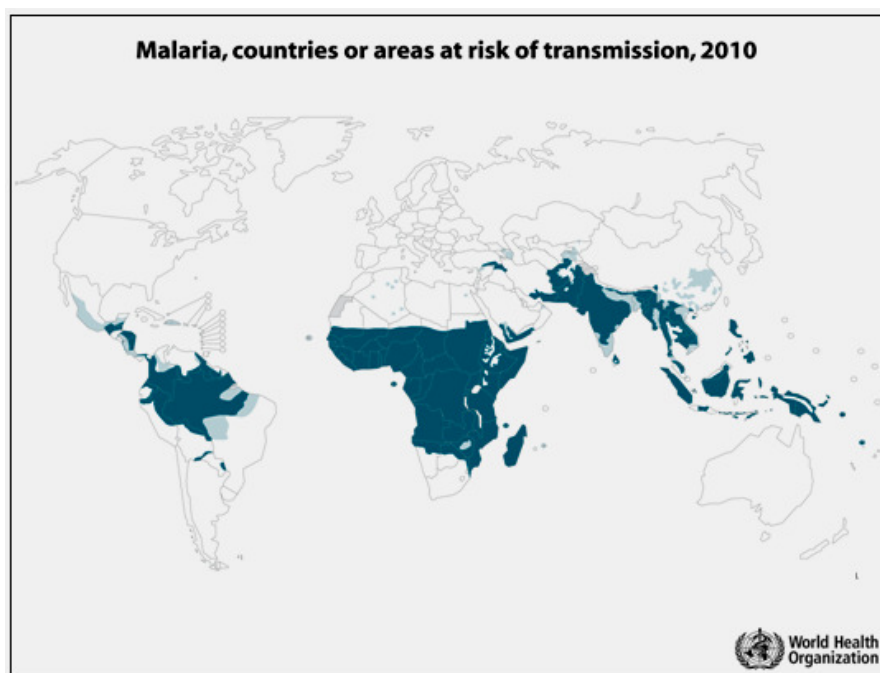


Figura 1.1: Áreas de ocorrência de malária no mundo (OMS, 2011).

A malária é causada por protozoários pertencentes ao Filo Apicomplexa; Classe Aconoidasida; Ordem Haemosporida e gênero Plasmodium, sendo transmitida por mosquitos do gênero Anopheles (Rey, 2008). Os parasitos pertencentes a esse filo são patógenos intracelulares, cuja maior parte de seu

crescimento e replicação acontece dentro de um vacúolo parasitóforo não-fagossomal, que se liga a membrana plasmática da célula hospedeira (Morissete e cols, 2002).

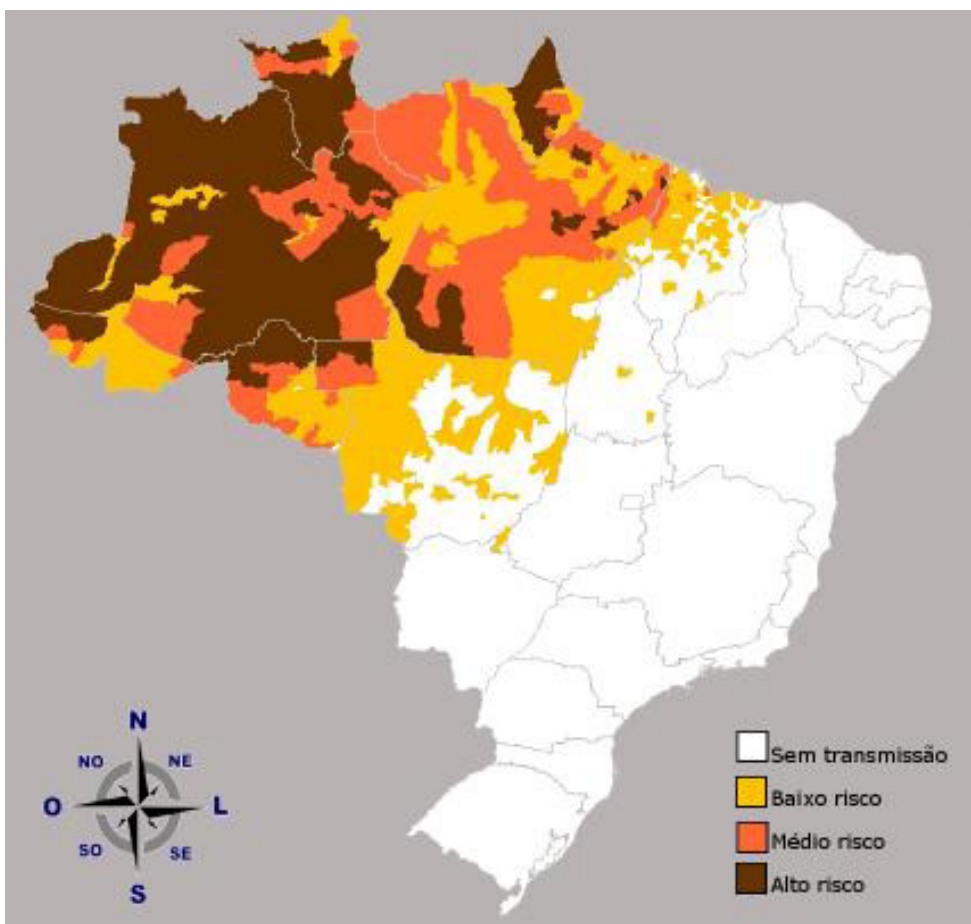


Figura 1.2: A malária no Brasil. Fonte: SISMAL/SIVEP/SVS/MS – atualizado em 28.12.2009

Dentre as cerca de cem espécies de protozoários do gênero *Plasmodium*, dentre as espécies utilizadas em estudos experimentais podemos citar: *Plasmodium berguei*, *Plasmodium yoelii*, *Plasmodium chabaudi*, que são algumas espécies de plasmódios que infectam diversas linhagens de camundongos e, dependendo da linhagem de camundongo utilizado no modelo experimental são utilizados para estudos de diferentes manifestações clínicas da malária murina (Déchamps e cols., 2009). Entretanto, quatro espécies são reconhecidamente infecciosas ao homem e uma quinta espécie tem sido relatada como para humanos (Suh e cols, 2004; Kantele & Jokiranta, 2011). São elas:

Plasmodium falciparum - espécie causadora da forma mais virulenta da doença, gera cerca de 91% dos casos de malária no mundo, sendo que a área de maior incidência é a África subsaariana (86% dos casos), onde acomete

principalmente crianças e pessoas não imunes (Perkins e cols, 2011). Causador de fisiopatologias como malária cerebral e anemia grave, possui como um dos fatores de virulência, a sua capacidade de provocar sequestro celular, caracterizado pelo acúmulo celular na vasculatura de diversos órgãos e na microvasculatura cerebral (Greenwood e cols, 2008). Este sequestro é bem pronunciado, pois esse parasito possui a capacidade de infectar hemácias em diversos estágios de desenvolvimento, gerando assim uma alta parasitemia (Price e cols, 2007).

Plasmodium vivax - esta espécie ocorre principalmente no leste africano, centro-oeste asiático e América do Sul, onde afeta pessoas de todas as idades que apresentam baixa imunidade a esta infecção (Mendis e cols, 2001). É o principal responsável pelos casos de malária no Brasil. Essa espécie possui um tempo de incubação longo que varia de 12 dias a meses, devido à sua forma hipnozoíta que fica dormente no fígado (Greenwood e cols, 2008), e infecta somente hemácias jovens (Price e cols, 2007). A infecção provocada por este parasito é tipicamente considerada benigna provocando a febre terçã. Porém, recentemente alguns casos de malária grave tem sido associada à infecção por esse plasmódio, anemia grave, distúrbios respiratórios, desnutrição e, em alguns casos, coma (Williams e cols, 1997; Berg e cols, 2002; Genton e cols, 2008) .

Plasmodium malarie - ocorre em todos os continentes, principalmente no leste africano, porém de forma rara, afetando pessoas de todas as idades (Collins e cols, 2007). É responsável por gerar infecções frequentemente silenciosas devido a diversos fatores como baixo número de merozoítos produzidos no ciclo eritrocítico, tempo de ciclo de 72 horas, muito extenso quando comparado ao tempo do ciclo dos *P. falciparum* e *P. vivax* (48 horas), e o fato desse parasito possuir um tropismo por hemácias senescentes (Collins e cols, 2007). Apesar de geralmente provocar infecções assintomáticas, o *P. malarie* pode, em alguns casos mais graves, gerar disfunção renal através da formação de imunocomplexos na região glomerular (Dixon, 1966).

Plasmodium ovale - ocorre na África subsaariana e algumas ilhas do Pacífico leste, como Filipinas, afetando pessoas de todas as idades (Collins e cols, 2005). Este plasmódio pode provocar febre terçã, possui a forma hipnozoíta (Greenwood e cols, 2008), e infecta somente hemácias jovens, o que leva alguns pesquisadores a considerarem este parasito, evolucionariamente, como uma forma variante do *P. vivax*. (Collins e cols, 2005). Além disso, assim como ocorre no caso

do *P. vivax*, o *Plasmodium ovale* causa infecções tipicamente benignas. (Schofield e cols, 2005).

Plasmodium knowlesi - é encontrado principalmente no Sudeste Asiático (Perkins & Schall, 2002). É uma espécie de parasita que infecta tipicamente primatas, mas também pode infectar seres humanos, sendo relatado pela primeira vez em humanos em 1965 (Chin e cols, 1965). Sua infecção pode causar malária grave com algumas características semelhantes à infecção com *P. falciparum*. Além disso, possui ciclo assexuado eritrocítico semelhante ao do *P. falciparum* com cerca de 24 horas (Chin e cols, 1965; Cox-Singh e cols, 2011).

1.3. CICLO DO PARASITO

O ciclo dos protozoários do gênero *Plasmodium* é extremamente complexo, composto por numerosas transições de estágios e dividido em dois tipos de hospedeiro: invertebrado e vertebrado (Figura 1.3).

O ciclo de vida do parasito no hospedeiro vertebrado começa no momento em que fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* previamente infectadas, realizam o repasto, e injetam na derme do hospedeiro entre 20 a 200 esporozoítos do plasmódio (Kappe e cols, 2003). O parasito é introduzido no hospedeiro vertebrado

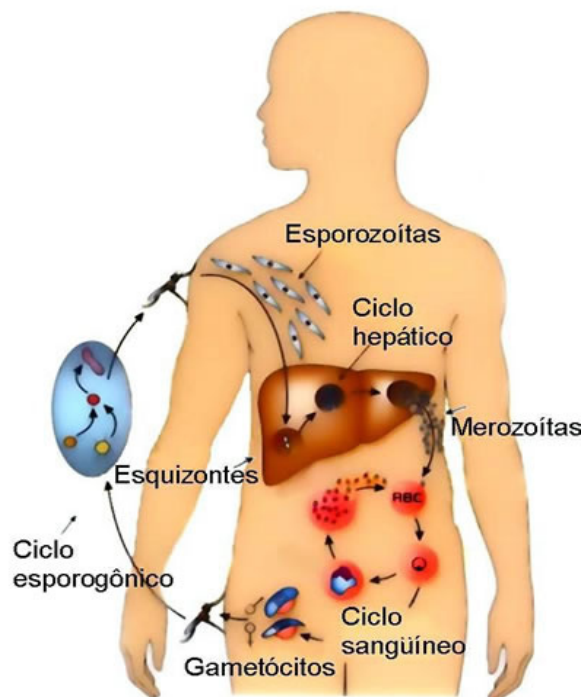


Figura 1.3 : Ciclo do *Plasmodium* sp. Figura adaptada a partir de Richie & Saul, 2002.

no momento em que o mosquito regurgita saliva no local da picada. Sabe-se que a saliva do mosquito possui inúmeras moléculas como anti-histamínicos, vasodilatadores (taquiquinina), anticoagulantes e inibidores de agregação plaquetária (Baldaci e cols, 2004; Garcia e cols, 2006). Estas substâncias facilitam a digestão do sangue e, conseqüentemente, também facilitam a inoculação e sobrevivência do parasito que está presente na saliva, tendo em vista que estes parasitas, na parte final de seu ciclo no hospedeiro invertebrado, acumulam-se nas glândulas salivares do mosquito (Schofield e cols, 2005).

Os esporozoítos injetados atravessam a epiderme e alcançam a corrente sanguínea, chegando ao fígado pela artéria hepática ou pela veia portal, e em até uma hora invadem os hepatócitos (Garcia, 2006; Ejigiri e cols, 2009). Estudos anteriores mostram que a migração e retenção dos esporozoítos nos hepatócitos são mediadas por duas moléculas abundantemente presentes na superfície do parasito, a proteína circunsporozoita (*circumsporozoite protein* – CS) e a proteína adesiva relacionada à trombospondina (*trombospondin-related adhesive protein* – TRAP) (Ancsin e cols, 2004; Garcia e cols, 2006). Estes fenômenos de ligação dos esporozoítos aos hepatócitos culminam com o processo de internalização dos esporozoítas, conhecido como endocitose e depende da participação de várias moléculas de adesão, entre elas a trombospondina (Neves, 2005).

Uma vez no interior dos hepatócitos, o parasito inicia um período de incubação que dura cerca de sete a dez dias (Smith e cols, 2005), exceto pelo *P. vivax* que em particular, tem um período de incubação de doze dias a meses (Greenwood e cols, 2008).

Devido ao baixo número de plasmódios no fígado e à inacessibilidade de se estudar o parasito, o ciclo hepático da infecção pelo plasmódio é o estágio de maior dificuldade de investigação. A maior parte do conhecimento existente do parasito neste estágio se deve a estudos em modelos murinos (Ashley e cols, 2008). O parasito forma uma estrutura chamada de vacúolo parasitóforo, no qual os esporozoítas se transformam em estruturas arredondadas, recobertas por uma plasmalema fina e delgada e sem aparelho apical. Nesta forma, os plasmódios passam a se chamar de criptozoítas (Rey, 2008). Nessa parte do ciclo, os criptozoítas iniciam a reprodução assexuada denominada como ciclo pré-eritrocítico, pois esta antecede a invasão das hemácias. Nesta fase do ciclo do parasito, os criptozoítas passam por diversas divisões celulares, e passam a ser chamados de

esquizontes, processo este que exige um intenso consumo dos nutrientes da célula hospedeira (Ashley e cols, 2008).

Esta fase geralmente é assintomática, e estudos mostram que um único esporozoíto, ao final desta parte do ciclo, pode originar de dez a quarenta milhões de elementos denominados de merozoítos (Smith e cols, 2005). Esses merozoítos, que saem dos hepatócitos através de vesículas formadas com partes da membrana da célula hospedeira chamadas de extrussomos, voltam à circulação para iniciarem o ciclo eritrocítico da malária (Tarun e cols, 2006; Vaughan e cols, 2008).

O ciclo eritrocítico começa com a interação entre merozoíto e hemácia que gera uma ligação chamada de junção parasito-célula hospedeira, por um processo de invaginação na membrana plasmática da hemácia e consequente internalização do parasito. Existem diversos estudos que mostram a importância de proteínas expressas na superfície do parasito nesse processo de invasão celular, mediando a adesão às hemácias (Holder e cols, 1994; Haldar e cols, 2009). Entre estas proteínas podemos destacar, por exemplo, as proteínas EBa175 e EBa140, que se ligam à membrana das hemácias através de sialoglicoproteínas, e também a glicoforinas A e C, presentes na membrana plasmática das hemácias não parasitadas (Sim e cols, 1994; Duraisingh e cols, 2003; Maier e cols, 2003; Maier e cols, 2009).

Além disso, este processo de entrada do *Plasmodium sp.* nas hemácias induz mudanças estruturais na membrana dessas células (Maier e cols, 2009), aumentando a aderência das hemácias infectadas ao endotélio da microvasculatura de órgãos específicos (Schofield & Grau, 2005). Durante o processo de invasão do *Plasmodium sp.*, proteínas passam a ser expressas na membrana da hemácia. A proteína de membranas eritrocítica (EMP) é o nome genérico dado aos membros da família de proteínas transmembranas que são expressas na superfície das hemácias infectadas. Em infecções por *P. falciparum*, estas proteínas se localizam nos *knobs*, que funcionam como plataformas de ancoragem para essas moléculas, e podem aumentar a capacidade de adesão dessas hemácias ao endotélio (Maier e cols, 2009).

Estudos já relataram que essa proteína é de importância vital para o parasito, já que permite a interação a múltiplos receptores presentes nas células do hospedeiro como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), a molécula de adesão de células vasculares 1 (VCAM-1), CD31, CD36, trombospondina, selectina de célula endotelial (E-selectina), sulfato de condroitina A (chondroitin sulfate A -

CSA) e ácido hialurônico. Estes receptores são expressos em células endoteliais da microvasculatura de órgãos específicos retendo nestes mesmos órgãos as hemácias parasitadas e impedindo assim a destruição destas no baço. (Schofield & Grau, 2005).

Após os merozoítos invadirem as hemácias, estes são capazes de desenvolverem-se em formas imaturas chamadas de trofozoítos jovens, semelhantes a anéis. Após 24 horas se desenvolvem em formas maduras chamadas de trofozoítos maduros. Este ciclo é dinâmico e em cerca de 48 horas está completo, e milhares de merozoítos são capazes de romper as hemácias parasitadas e invadirem novas hemácias (Baruch, 1999).

Por fim, alguns merozoítos se desenvolvem em formas que não possuem mais a capacidade de divisão celular, os gametócitos, que representam as formas imaturas do estágio sexuado do parasito. Estes gametócitos podem ocorrer na circulação sanguínea serem retirados do fluxo sanguíneo por um outro mosquito do gênero *Anopheles* que venha alimentar-se do sangue do hospedeiro, iniciando assim o ciclo do parasito em invertebrados (Schofield & Grau, 2005).

1.4. IMUNOPATOLOGIA DA MALÁRIA

A infecção pelo plasmódio desencadeia uma série de eventos imunes que podem ser caracterizados como uma resposta inflamatória exacerbada, que é gerada pela ativação exacerbada do sistema imune do hospedeiro, e que pode resultar em sérios danos a tecidos e órgãos do hospedeiro vertebrado (Suh e cols, 2004; Spoonas e cols, 2009; Basílico e cols, 2010).

Para cada etapa do ciclo vital do patógeno, existe um tipo de resposta imune gerado com o objetivo de erradicar a infecção (Greenwood e cols, 2008). Porém os eventos clínicos gerados em decorrência da infecção, são consequências da fase intra-eritrocítica do parasito (Haldar e cols, 2009; Baum e cols, 2005).

A patogênese da malária é bastante estudada na infecção pelo *P. falciparum*, sendo este tipo de infecção utilizada para descrever a patologia no presente trabalho, cujo agravamento dos sintomas clínicos pode levar a diversas complicações e ao óbito (Medana e cols, 1997).

Diversos fatores contribuem para a severidade da doença e sintomas, tais como elevada carga parasitária, hipoglicemia, convulsões, vômitos repetidos,

hiperpirexia, icterícia e distúrbio da consciência. Esses sintomas juntamente com outros eventos como anemia grave, insuficiência renal, disfunção hepática, edema pulmonar, hemoglobinúria, distúrbios hemorrágicos e de coagulação e malária cerebral (MC) são indicadores das formas clínicas da malária grave (Hunt e cols, 2006).

A MC é a manifestação clínica de maior gravidade na infecção por *P. falciparum* e sua patogênese permanece não esclarecida. No entanto, o sequestro de hemácias parasitadas (PRBC) por células do endotélio desencadeia eventos pró-inflamatórios, dentre eles o aumento de produção de citocinas e quimiocinas, ativação do endotélio, células T *natural killer*, agregação plaquetária e depósito de fibrina, infiltrado de células T CD4+ e T CD8+, desarranjos no metabolismo neuronal e recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o sítio inflamatório (Hunt e cols, 2006).

Como já citado anteriormente, as manifestações clínicas ocorrem em órgãos específicos, sendo mediada por diversas moléculas de adesão já citadas anteriormente, como ICAM-1 e VCAM-1 (Schofield e cols, 2005), que são expressas no endotélio de diversos órgãos e se ligam ao grupo de proteínas de membrana eritrocítica (EMP). Este processo gera uma concentração dessas hemácias parasitadas em órgãos específicos, sendo essa concentração de hemácias aderidas variável de acordo com o grau de expressão desses receptores alvos no endotélio da vasculatura dos diferentes órgãos (Schofield, 2007).

O sequestro de hemácias parasitadas no endotélio é um evento extremamente importante para a doença, uma vez que é responsável pelo início e desenvolvimento da patologia e pode levar a diversas complicações clínicas, inclusive, culminando com o coma e até a morte do hospedeiro (Rowe e cols, 2010; Tilley e cols, 2010). A ativação do endotélio, que passa a expressar mais moléculas de adesão, promove, assim, a adesão de mais hemácias a microvasculatura. Além disso, as hemácias parasitadas aderem também a hemácias não parasitadas formando que se ligam ao endotélio (Rowe e cols, 2010; Dondorp e cols, 2008; Dondorp e cols 2004). Esta obstrução da microvasculatura gera efeitos deletérios sobre a integridade do endotélio, desencadeando processos inflamatórios exacerbados (Wassmer e cols, 2006).

Além disso, os parasitos geram uma série de produtos biologicamente ativos que juntamente com a obstrução da microvasculatura geram diversos distúrbios metabólicos como acidose e hipóxia (Planche e cols, 2006), bem como a produção e

liberação de diversos mediadores inflamatórios (van der Heyde e cols, 2006; Rowe e cols, 2010).

1.5. HEMOZOÍNA E HEME NA MALÁRIA

Dentre estes produtos derivados do parasito podemos destacar o glicosilfosfatidilinositóis (GPI) e a hemozoína (HZ) (Oakley e cols, 2011), que são capazes de ativar células do sistema imune inato através de receptores de reconhecimento de padrões (PRR), estes produtos derivados pelo parasito são portanto chamados de PAMPs (Padrões Moleculares Associados ao Patógeno). O GPI purificado de *Plasmodium sp.* é capaz de induzir a expressão de vários genes de citocinas inflamatórias envolvidos na patogênese da malária, como fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucinas (IL-1, IL-2 e IL-12), induzir a síntese de óxido nítrico (NO) e aumento da expressão moléculas de adesão (ICAM-1) expressas na superfície do endotélio vascular reconhecidas pelo EMPI aumentando a ligação entre as células endoteliais e as hemácias parasitadas (Schofield e cols, 2005, Zhu e cols., 2009).

Além dos GPIs de plasmódios, a hemozoína também desencadeia diversas reações no hospedeiro. A hemozoína conhecida como pigmento malárico é um cristal resultante da agregação das moléculas de heme. Essa polimerização resulta na desintoxicação do vacúolo digestivo, uma vez que a molécula de heme é extremamente oxidante sendo, portanto, tóxico para o parasito (Coban e cols, 2005).

Este cristal é liberado no meio extracelular quando as hemácias parasitadas se rompem e são ativamente fagocitadas por células do sistema imune (Coban e cols, 2005). O papel da hemozoína na resposta imune é controversa. Diversos trabalhos demonstram que este cristal possui um efeito supressor na resposta imune (Schwarzer e cols, 2003; Skorokhod e cols, 2004), enquanto outros grupos mostram que a hemozoína possui um papel pró-inflamatório na resposta imune, pois sua ingestão induz a produção de TNF- α e de óxido nítrico (Coban e cols, 2005; Riley e cols, 2006).

A HZ contribui para uma cascata inflamatória que é característica da fase aguda da doença. Esta molécula é reconhecida por receptores semelhantes ao TOLL (TLR). Estudos realizados por Coban e cols, 2007, demonstram o TLR9 como ligante da hemozoína, através de experimentos utilizando camundongos deficientes

para TLR-9^{-/-} ou MyD88^{-/-} quando estimulados com hemozoina, apresentaram uma produção de IL-12 e TNF- α significativamente menor quando comparados aos animais selvagens (Coban e cols, 2005; Coban e cols, 2007).

Além disso, diversos trabalhos demonstram que a β -hematina (um análogo sintético da hemozoína - sHz) exerce influência na maturação e migração de células dendríticas e induz ao aumento da produção de CXCR4 nessas células (Giusti e cols, 2011), bem como na ativação de macrófagos através das vias NF κ B e ERK (Griffith e cols, 2009).

Além desses produtos citados acima, existe outra molécula extremamente importante na patologia da malária, a molécula de heme. A molécula de heme é composta por um anel porfirínico, protoporfirina IX, coordenado por um átomo de ferro e é essencial a todos os organismos aeróbicos por ser o grupamento prostético de diversas proteínas como os citocromos e a hemoglobina (Toh e cols, 2010).

A molécula de heme é intensamente liberada na circulação em doenças hemolíticas (Lara e cols, 2005; Taylor e cols, 2010), no caso da malária. Esta molécula não é digerida pelo plasmódio no vacúolo digestivo (Figueiredo e cols, 2007), e sabe-se que esta molécula livre é extremamente tóxica para o hospedeiro devido a sua alta capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS), que por sua vez são capazes de degradar proteínas, lipídios e moléculas de DNA (Aft e cols, 1993; Aft e cols, 1994; Toh e cols, 2010).

Todos esses fatores contribuem juntamente para intensificar o processo inflamatório, que além de levar a diversos fenômenos como ativação das células endoteliais, também induzem a ativação de leucócitos, contribuindo, assim, para o estabelecimento da doença (Lou e cols, 2001).

1.6. MACRÓFAGOS

Os leucócitos são células derivadas de precursores mielóides na medula óssea, que circulam pelo sangue em estado quiescente de baixa aderência antes de migrarem para dentro do tecido, onde iniciam a resposta imune ou mesmo constituem uma nova população residente fixa (Abbas e cols, 2005). Dentre os diversos tipos de leucócitos, os monócitos são liberados na circulação como células imunes efetoras (Auffray e cols, 2009; Geissmann e cols, 2010).

Neste estágio os monócitos possuem morfologia heterogênea com variedade de tamanho, granulosidade e morfologia nuclear, podendo ser, em alguns casos,

confundidos com células polimorfonucleares, e constituem menos de 10% dos leucócitos circulantes em humanos (Gordon & Taylor, 2005), o que em um adulto saudável representa cerca de 450 monócitos/ μ L (Robbins & Swirski, 2010).

Devido a esta variedade morfológica, os monócitos são divididos em subtipos de acordo com as moléculas expressas em sua superfície (fenótipo), o que varia entre monócitos de diferentes espécies (Shi & Pamer, 2011). Em humanos os monócitos são divididos em dois subtipos de acordo com sua expressão de CD14 (molécula acessória do receptor de LPS) e CD16 (receptores que se ligam à porção Fc de anticorpos IgG - Fc γ RIII) (Ziegler-Heitbrock, 2007).

O tipo mais abundante em humanos são os monócitos CD14^{high}CD16⁻, também chamados de clássicos ou inflamatórios, e os monócitos CD14⁺CD16⁺ são chamados de residentes (Gordon & Taylor, 2005; Shi & Pamer, 2011).

Os monócitos expressam diversas outras moléculas como CD36, importante no reconhecimento e fagocitose de PRBCs (McGilvray e cols., 2000), receptores semelhantes ao Toll, capazes de reconhecer bioprodutos do *Plasmodium sp.* como HZ e GPI (Gowda, 2007), selectinas e integrinas, que medeiam os processos de migração e adesão dessas células no foco inflamatório, etc. Além disso, quando estimuladas produzem diversas moléculas efetoras envolvidas na defesa do organismo, como o TNF- α (Serbina e cols, 2008; Auffray e cols, 2009).

Monócitos possuem receptores de adesão que medeiam sua migração para os tecidos, onde se diferenciam em células dendríticas ou macrófagos, seja para formarem uma população fixa ou em resposta a alguma infecção (Abbas e cols, 2005; Geissmann e cols, 2010; Liddiard e cols, 2011; Murray & Wynn, 2011).

Macrófagos são células fagocíticas de tecidos linfoides e não linfoides. Estas células exercem diversas funções na resposta imune como regulação da homeostase, fagocitose de patógenos, apresentação de antígenos aos linfócitos e produção de fatores de crescimento (Gordon, 2002; Geissmann e cols, 2010).

De uma forma geral, os macrófagos detectam e reagem a diferentes tipos de moléculas, patógenos e antígenos, além disso, também respondem a diferentes tipos de desequilíbrios fisiológicos que podem ser uma injúria tecidual ou a uma infecção (Liddiard e cols, 2011). Macrófagos são dotados de diversos tipos de receptores de reconhecimento de padrão (CD36, TLRs, etc.), que ao reconhecerem a algum tipo de patógeno são ativados e produzem diversos tipos de quimiocinas e citocinas, que irão iniciar a resposta imune inata (Liddiard e cols, 2011; Murray & Wynn, 2011).

A importância dos macrófagos na resposta imune foi demonstrada através de experimentos, em que a depleção destas células em um modelo de peritonite reduziu dramaticamente a produção dos níveis de KC e MIP-2, o que prejudicou o recrutamento de neutrófilos para o foco inflamatório (Cailhier e cols, 2005).

Estas células são divididas em subtipos de acordo com sua localização anatômica e fenótipo funcional, ou seja, possuem especificações funcionais que estão criticamente relacionados com o microambiente anatômico onde residem: pulmão, baço, ossos, etc. (Gordon & Taylor, 2005; Murray & Wynn, 2011).

Dentre os vários subtipos de macrófagos podemos destacar:

Macrófagos esplênicos - fagócitos residentes do baço, estão subdivididos em dois subtipos: macrófagos metalofílicos (Eloranta & Alm, 1999) e os macrófagos da zona marginal (Kraal, 1992). Apesar da real função dos macrófagos metalofílicos ainda não estar totalmente compreendida, Eloranta & Alm (1999) demonstraram que estes macrófagos, em modelo experimental de infecções intravenosas virais, são os maiores produtores de interferons α/β no tecido esplênico, o que sugere a sua possível importância em outros tipos de infecções.

Entretanto, os macrófagos da zona marginal estão descritos como células com uma alta expressão de receptores de reconhecimento de padrão e receptores *scavengers* (van der Laan e cols, 1999; Gordon & Taylor, 2005; Taylor e cols, 2005). Além disso, esta célula fica localizada em uma área estratégica, onde entra em contato com a circulação esplênica (Gordon & Taylor, 2005), de acordo com sua função no reconhecimento e destruição de hemácias senescentes, patógenos e de antígenos estranhos (Gordon & Taylor, 2005; Murray & Wynn, 2011).

A imunologia também tem classificado os macrófagos de acordo com o seu perfil de ativação, que pode ser clássico, sendo chamados de macrófagos M1 (Pesce e cols, 2009; Sindrilaru e cols, 2011), que são células que respondem a ligantes de TLRs e interferon- γ (Murray & Wynn, 2011), amplificam a resposta T_H1 (Biswas & Mantovani, 2010) e produzem grandes quantidades de mediadores inflamatórios como TNF, IL-12, etc. (Murray & Wynn, 2011) ou macrófagos alternativos.

Estes macrófagos com perfil de ativação alternativa, inicialmente foram denominados como macrófagos M2 (Murray & Wynn, 2011). Entretanto, essa denominação foi expandida para outros subtipos de macrófagos devido a suas funções na manutenção da homeostase, sendo designados como macrófagos

ligados ao processo de cicatrização, que são células estimuladas por interleucinas 4 e 13 (Murray & Wynn, 2011) e macrófagos reguladores ou anti-inflamatórios que produzem grandes quantidades de IL-10 (Moser & Edwards, 2008; Murray & Wynn, 2011).

1.6.1. MACRÓFAGOS NA MALÁRIA

Na malária, os macrófagos possuem um papel crítico devido a sua capacidade de fagocitar hemácias infectadas pelo *Plasmódio* sp. (mesmo na ausência de opsoninas), reconhecer moléculas produzidas pelo parasito como GPI e HZ, além de produzir grandes quantidades de quimiocinas, citocinas e óxido nítrico (NO) em resposta a esses estímulos (Stevenson & Riley, 2004; Riley e cols, 2006).

Os dados citados acima sugerem que os macrófagos desencadeiam uma resposta pró-inflamatória robusta importante para controlar a infecção (Stevenson & Riley, 2004). No entanto essa ativação exacerbada dos macrófagos provoca danos ao hospedeiro, através de diversas reações adversas como, por exemplo, amplificação da anemia malárica grave devido a intensa fagocitose de hemácias infectadas e não infectadas (Perkins e cols, 2011), produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-12, e óxido nítrico que causam ativação e danos endoteliais (Stevenson & Riley, 2004; Schofield & Grau, 2005), intensa acumulação e infiltrado celular nos vasos sanguíneos (Schofield & Grau, 2005).

A ativação dos macrófagos induz um aumento de expressão de diversas moléculas de adesão nestas células, dentre elas as integrinas leucocitárias, que se ligam a diferentes tipos de receptores expressos no endotélio (ICAMs, VCAMs, etc.). Isto contribui para a sua permanência nos focos inflamatórios, amplificando a resposta dessas células (Lou e cols, 2001). Este fenômeno é extremamente importante para o estabelecimento da doença, uma vez que a expressão prolongada destas integrinas nos macrófagos os faz funcionar como propagadores dos efeitos patológicos na malária (Noti, 2002).

1.7. INTEGRINAS

Entre as várias proteínas que fazem parte do repertório do sistema imune, as integrinas leucocitárias possuem um papel fundamental na defesa do hospedeiro, sendo responsáveis pela adesão específica de células a outras células ou a matriz extracelular (Abbas e cols, 2005; Janeway e cols, 2006).

As integrinas leucocitárias são heterodímeros, que possuem domínios citoplasmáticos que se ligam ao citoesqueleto. Pertencem a uma família de glicoproteínas receptoras de membrana composta por duas cadeias de peptídeos, α e β , ligados não covalentemente, tendo a cadeia α cerca de 120 – 200 KD e a cadeia β cerca de 90 – 110 KD (Abbas e cols, 2005).

Existem quatro membros compondo a família CD18 das integrinas leucocitárias sendo que diferentes cadeias α são codificadas como CD11a (α_L), CD11b (α_M), CD11c (α_X) e CD11d (α_D) e uma única a cadeia CD18 (cadeia β_2), formando os heterodímeros $\alpha_L\beta_2$ (CD11a/CD18 - LFA-1); $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18 – MAC-1;CR3); $\alpha_X\beta_2$ (CD11c/CD18) e a mais recentemente descoberta integrina $\alpha_D\beta_2$ (CD11d/CD18) (Danilenko e cols, 1995; van der Vieren e cols, 1995).

O gene para a cadeia CD18 está localizado no cromossomo humano 21 e codifica uma proteína transmembranar com 6 sítios de glicosilação na sua porção extracelular enquanto a porção citoplasmática da cadeia CD11 contém sequências importantes para sinalização e associação ao citoesqueleto. Acredita-se que os 56 resíduos de cisteína na cadeia β_2 conservados também nas cadeias β_1 , e β_3 sejam importantes para manter a estrutura terciária rígida.

As cadeias CD18 apresentam um domínio extracelular semelhante ao I de aproximadamente 241 aminoácidos que é importante para ligação ao ligante (Lee e cols, 1995) (Figura 1.6) e está presente em outras integrinas que possuem a subunidade α mas não fazem parte da subfamília CD18 como α_1 , α_2 e α_E . Os genes humanos que codificam as cadeias α_M , α_X , α_D (apresentam entre si de 60-66% de identidade) e α_L (que apresenta somente 35% de identidade com as outras integrinas) estão localizados no cromossomo 16 (Wong e cols, 1996; Harris e cols, 2000).

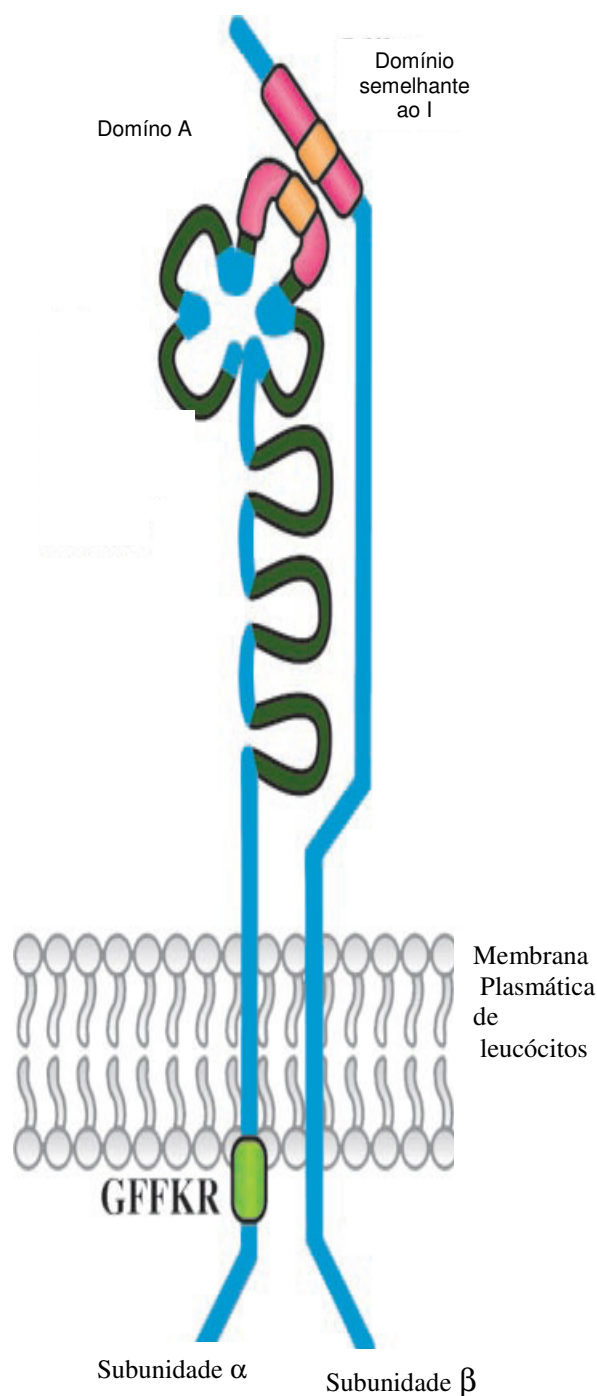


Figura 1.4: Domínios conservados entre as subunidades beta e alfa. Esquema adaptado de Harris e cols, 2000.

A porção extracelular da cadeia α_D (CD11d) contém 200 aminoácidos do domínio **A** próximo ao N-terminal também é altamente conservado em outras subunidades CD11 e é importante para reconhecimento de ligação (Lee e cols, 1995; Goodman & Bajt, 1996) (Figura 1.4).

Elas apresentam ainda na face citoplasmática da cadeia CD11 um motivo de peptídeos GFFKR (Figura 1.4) comum para todas as integrinas com subunidade α que mantem a ligação heterodimérica numa conformação de baixa afinidade na ausência de sinalização (Harris e cols., 2000).

As leucointegrinas CD18 reconhecem um ou mais membros da família de moléculas de adesão intercelular (ICAM-1 e/ou ICAM-2). As integrinas CD11b/CD18, CD11c/CD18 e CD11d/CD18 também reconhecem proteínas de outras classes e no caso de CD11b e CD11c reconhecem também polissacarídeos (Harris e cols, 2000).

A ativação de leucócitos por

agonistas que se ligam a diversas classes de receptores desencadeiam a ligação desses receptores a uma ligação com a parte citoplasmática das integrinas CD18 é conhecido como “sinalização de dentro para fora” ou “ativação por integrina” (Harris e cols, 2000). Uma rápida regulação desta ação é importante para os leucócitos, pois eles circulam pelos tecidos em um estado não adesivo antes de ser atraído para o sítio alvo. O mecanismo pelo qual isso acontece tem sido estudado, porém o mais provável é que ocorra a interação entre várias vias. Este mecanismo foi mais estudado para a integrina CD11a/CD18 e a

manipulação da parte extracelular usando cátions divalentes e anticorpos de inibição induziram uma rápida e dinâmica mudança no reconhecimento de ICAM-1 e de outros ligantes (Petruzzelli e cols, 1998; Harris e cols, 2000).

Sabe-se que as integrinas medeiam funções críticas nos metazoários, entre elas: adesão, localização, sinalização e expressão de genes, sendo requeridas na defesa contra diversos patógenos (Harris e cols, 2000; Miyazaki e cols, 2008).

Existem poucos trabalhos que abordam o envolvimento desta família de integrinas na malária, entretanto, Barrera e colaboradores (2011), descreveram que monócitos são dinamicamente ativados através do reconhecimento de hemozoína ligada a fibrinogênio via TLR4 e CD11b/CD18. Neste trabalho o tratamento de monócitos com anticorpos monoclonais anti-CD11b diminui significativamente a produção de TNF- α , MCP-1 e ROS.

Além disso, outros trabalhos demonstram a importância da integrina CD11/CD18 no processo de seqüestro de neutrófilos e, em menor escala, de monócitos na malária (Senaldi e cols., 1994). Além disso, Piguet e colaboradores (2001) demonstraram que células de linfonodos periférico de animais deficientes para as integrinas CD18, quando infectados com *Plasmodium berguei* Anka, apresentavam uma diminuição no perfil de apoptose.

1.8. INTEGRINA CD11d/CD18

Ao contrário das demais proteínas que compõe esta família de integrinas, o papel da integrina CD11d/CD18 ainda não foi muito investigado em condições patológicas. Estudos prévios demonstraram que esta molécula é expressa na maioria dos leucócitos humanos, principalmente em macrófagos esplênicos da polpa vermelha, regiões medulares dos linfonodos e medula óssea e em menor escala em linfócitos B (Danilenko e cols, 1995; Miyazaki e cols, 2008), desempenhando as funções de diferenciação (Shi e cols, 2004), adesão, migração e ativação celular (Utagawae cols, 2008; Yakubenko e cols, 2008).

Entretanto, devido à semelhança entre as sequências do domínio A (região crítica para interação com o ligante) da CD11d e da CD11b foi sugerido que a integrina CD11d/CD18 tenha diversos ligantes ainda não identificados, uma vez que a CD11b/CD18 é um heterodímero promíscuo (Danilenko e cols., 1995).

Van de vieren e cols. (1995) demonstra que a integrina CD11d/CD18 se liga a ICAM-3 e não a ICAM-1 e que em eosinófilos, também se liga a VCAM-1 (Grayson e cols., 1998). Outros trabalhos utilizando células embrionárias humanas de rim transfectadas e macrófagos IC-21, mostraram que a integrina CD11d/CD18 também medeia a ligação ao fibrinogênio e à vitronectina (Yakubenko e cols., 2006), porém, estas interações não foram identificadas *in vivo*.

Além disso, outros trabalhos têm mostrado que esta integrina tem sua expressão aumentada em síndromes inflamatórias exacerbadas como aterosclerose, artrite reumatóide e inflamação pulmonar aguda mediada por imunocomplexos (Van der Vieren e cols, 1995; El-gabalawy e cols, 1996; Shanley e cols., 1998; Noti, 2002). Diversos dados da literatura têm mostram que a utilização de anticorpo monoclonal anti-CD11d em modelo de dano espinhal em ratos acarretou uma diminuição do estresse oxidativo e da produção de ROS (Bao e cols, 2005), e diminuição da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (Bao e cols, 2011). Outros grupos têm mostrado que a integrina CD11d participa de outros processos imunes como em síndromes linfocíticas, resposta a superantígenos estafilocócica e em infecções sistêmicas como a malária e salmonelose (Shanley e cols., 1998; McDonough & Moore, 2000; Wu e cols., 2004; Miyazaki e cols., 2008).

Miyazaki e cols (2008) demonstraram em caso de infecções com o *Plasmodium berghei* ANKA (uma espécie de plasmódio murino, que mimetiza os sintomas clínicos da malária grave humana), que a expressão da integrina CD11d é dinamicamente aumentada em macrófagos esplênicos durante o curso da infecção, bem como em linhagens monocíticas após estimulação com citocinas como TNF- α . Além disso, trabalhos de nosso grupo têm demonstrado que camundongos com deleção funcional do gene para a integrina CD11d (CD11d^{-/-}), têm um aumento significativo de sobrevivência em relação aos camundongos do tipo selvagem, sem alterações na parasitemia.

Esses dados sugerem que a integrina CD11d/CD18 pode ser dinamicamente regulada no tecido e/ou monócitos/macrófagos na malária e em outras doenças inflamatórias. Os processos que envolvem a adesão, sinalização e a resposta funcional de monócitos/macrófagos possuem função central na resposta do hospedeiro em algumas infecções, incluindo a malária (Schofield & Grau, 2005). A leucointegrina CD11d/CD18 pode ser um modulador crítico destes eventos, entretanto seu papel nos processos de diferenciação e ativação de macrófagos, especificamente na malária experimental ainda não foi investigado.

JUSTIFICATIVA

Sendo a malária uma doença que afeta uma em cada três pessoas em todo o mundo, causando até 1 milhão de mortes anualmente (OMS, 2009), torna-se evidente a necessidade de estudos para a elucidação dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia desta doença e para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes com o propósito de minimizar os efeitos maléficos desta patologia na população mundial. Dentre estes mecanismos, sabe-se que a adesão, sinalização e ativação de monócitos/macrófagos possuem um importante papel na resposta do hospedeiro à malária (Schofield & Grau, 2005).

Diversas moléculas expressas na superfície dessas células são responsáveis por realizar estas funções, dentre elas as integrinas (Harris e cols., 2000). As integrinas leucocitárias são moléculas responsáveis por mediar diversas funções no organismo, como migração, adesão e ativação celular (Harris e cols, 2000; Miyazaki e cols, 2008). Além disso, a integrina CD11d/CD18 foi descrita por participar de eventos patológicos como aterosclerose, doenças imunológicas e injúria pulmonar (Grayson e cols., 1998; Noti e cols., 2000), e sua expressão ocorre em monócitos/macrófagos (Miyazaki e cols., 2008). Esta molécula pode ser um modulador crítico destes eventos, entretanto seu papel na malária experimental ainda não foi investigado.

Estas informações sugerem que a integrina CD11d/CD18 possa ser uma nova molécula alvo para futuras ações terapêuticas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Considerando a importância das leuointegrinas no processo inflamatório, a nossa hipótese é que a integrina CD11d/CD18 expressa em macrófagos participa no desenvolvimento da resposta do hospedeiro à infecção malárica. Nosso objetivo principal é investigar o papel da integrina CD11d/CD18 no processo de diferenciação, proliferação e ativação da macrófagos *in vitro*.

3.2. Objetivos Específicos

- 1) Investigar o papel da integrina CD11d no processo de diferenciação e proliferação de macrófagos provenientes da medula óssea;
- 2) Avaliar a influência da integrina CD11d na liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios em macrófagos estimulados com hemozoína sintética e heme *in vitro* e;
- 3) Investigar a importância da integrina CD11d no processo de fagocitose de hemácias parasitadas e hemozoína sintética (sHz) em macrófagos *in vitro*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos ou fêmeas da linhagem C57BL/6 CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-} (gentilmente cedidos pelos Dr. Guy Zimmerman, Universidade de Utah), pesando entre vinte e vinte e cinco gramas, fornecidos pelo biotério central da Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas em micro isoladores ventilados (Gabinete Biotério mod. EB-273, Insight, Brasil), temperatura constante (25 °C), tendo acesso livre a água e ração, com ciclo de claro e escuro de doze horas no biotério do pavilhão Ozório de Almeida. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização Animal -CEUA/FIOCRUZ sob o número nº P-0528/08.

4.2. Manutenção do estoque de *Plasmodium Berghei* Anka (PbA)

O sangue de animais infectados com *Plasmodium berghei* Anka (PbA) foi recolhido através de punção cardíaca, sendo escolhidos para este procedimento, apenas animais que apresentaram até 10% de parasitemia. O sangue recolhido foi centrifugado em centrífuga Eppendorf mod. 5415C por cinco minutos a 500g. O soro foi descartado e as hemácias foram ressuspensas em uma solução de glicerol tamponada e mantidas em nitrogênio líquido. PbA-GFP foi gentilmente cedido pelo Doutor Marcelo Bozza do Departamento de Imunologia-Instituto de Microbiologia Prof^o Paulo Góes – UFRJ.

4.3. Parasitemias e infecções

Para determinação da parasitemia, foi feito um pequeno corte com tesoura na extremidade da cauda dos animais, permitindo a coleta de aproximadamente dez microlitros de sangue para a realização de extensão sanguínea. As lâminas foram coradas em *kit* Panótico (Laborclin), através de imersão por três minutos em cada uma das soluções que compõe o *kit*. Foi contado o número de hemácias parasitadas entre cem hemácias totais através de microscopia de luz, utilizando o microscópio óptico (OLYMPUS mod. CX31).

Após verificação da parasitemia, 1 μ L do sangue do animal foi diluído em 999 μ L de PBS 1X, sendo as hemácias contadas em câmara de Neubauer (Neubauer Improved). O número de hemácias contadas foi utilizado para determinar o volume total de sangue do animal através do seguinte cálculo:

$$\text{Volume total de hemácias por mL} = \text{n}^\circ \text{ de hemácias contadas} \times 5 \times 10^3 \times 10^4$$

Para a obtenção de um inóculo de 10⁵ hemácias parasitadas, foram feitos os seguintes cálculos:

$$\text{Concentração de } 10^5 \text{ hemácias} = 10^7 / \text{parasitemia}$$

Cálculo volume de sangue para a obtenção do inóculo:

$$(\text{Concentração de } 10^5 \text{ hemácias} \times 1000) / \text{volume total de hemácias por mL}$$

Após a definição do volume de hemácias para o inóculo, os camundongos foram infectados intraperitonealmente com o inóculo de 10⁵ hemácias parasitadas em um volume total de 200 μ L de PBS 1X.

4.4. Soluções, estímulos, linhagens celulares e meios de cultura

4.4.1. Soluções

Preparo de solução salina tamponada por fosfato (PBS) pH = 7,4

PBS 10x:

- Na₂HPO₄ (Sigma Aldrich) 1,6g
- NaCl (Merck) 80g
- KH₂PO₄ (Sigma Aldrich) 2g
- KCl (Merck) 2g
- Água MilliQ (Millipore) q.s.p. 1L

Os sais foram dissolvidos em água MilliQ num volume de aproximadamente 800 mL. Em seguida, o pH foi corrigido no pHmêtro (Jenway IKA[®] mod. C-MAG H57) até alcançar 7,4 e o volume restante foi completado com água MilliQ .

PBS 1x (pH 7.4):

- | | |
|---------------|-------|
| ▪ PBS 10x | 100mL |
| ▪ Água MilliQ | 900mL |

Solução de Turk 2%:

- | | |
|-----------------------------------|--------------|
| ▪ Ácido acético glacial (Química) | 10mL |
| ▪ Cristal violeta (Sigma Aldrich) | 50mg |
| ▪ Água MilliQ | q.s.p. 500mL |

Kit Panótico Rápido (Laborclin):

Constituído por Panótico rápido n^o1 (solução de triarilmetano a 0,1%), Panótico rápido n^o2 (solução de xantenos a 0,1%) e Panótico rápido n^o3 (solução de tiazinas a 0,1%).

Solução de lise de Macrófagos:

- | | |
|-------------------------------|--------------|
| ▪ NaOH 0.1N(Vetec) | 0,4g |
| ▪ Triton X100 (Sigma Aldrich) | 12.5µL |
| ▪ EDTA (Fisher Scientific) | 1.1g |
| ▪ Água MilliQ | q.s.p. 100mL |

Solução de extração de β-hematina:

- | | |
|---|--------------|
| ▪ Bicarbonato de Sódio (Merk) | 1.6802g |
| ▪ Dodecil sulfato de sódio-SDS (FISHER) | 5g |
| ▪ Água MilliQ | q.s.p. 200mL |

OBS: Ajustar o pH em 9.1 com a solução seguinte.

Solução de Carbonato de sódio (utilizada para regular o pH da solução de extração de β -hematina:

- | | |
|--------------------------------------|--------------|
| ▪ Carbonato de sódio (Sigma Aldrich) | 2.12g |
| ▪ Dodecil sulfato de sódio-SDS | 5g |
| ▪ Água MilliQ | q.s.p. 200mL |

Água DEPC (dietilpirocarbonato 0.01%):

- | | |
|--|--------------|
| • Dietil Pirocarbonato (Sigma Aldrich) | 100 μ L |
| • Água MilliQ | q.s.p. 100mL |

Após acrescentar 100 μ L de dietilpirocarbonato em 100mL de água MilliQ, incubase a solução por 16 horas em estufa a 37°C (Revco Technologies). Em seguida a solução foi autoclavada em autoclave modelo HV-50 (Hirayama).

4.4.2. Estímulos:

• **Polimixina B**

Um total de 1mg de Polimixina B (Sigma Aldrich)* foi diluído em PBX 1X (solução de estoque).

***Cerca de 10 μ g/mL de Polimixina B foi adicionado a cada estímulo, exceto LPS, para evitar contaminação por este polissacarídeo nos outros estímulos. Este antibiótico foi usado devido a sua capacidade de interagir com o LPS e mudar a sua estrutura, anulando assim sua atividade (Mohammadi, 2011).**

▪ **LPS**

LPS de *Escherichia.coli* sorotipo 0.127:B8 (Sigma Aldrich) foi diluído em PBS 1X estéril (1 ng/mL – solução estoque).

- **Heme**

Um total de 13.2g de hemina (Frontier Scientific®) foi diluído em 1 mL de DMSO (Sigma Aldrich) para a obtenção da solução de estoque a uma concentração de 20 mM. A solução estoque foi diluída dez vezes em NaOH 0.25N, e a solução resultante foi diluída cinco vezes em meio de cultura RPMI 1640 (LGC Biotecnologia) resultando em uma solução de uso (400 µM).

- **Hemozoína sintética**

Um total de 39.2 mg de hemina foi diluído em 8 mL de NaOH 0.1N. A solução foi homogeneizada por 1h e adicionou-se 2,9 mL (49 mmoles) de ácido acético glacial (Merk) e DMSO para alcançar uma concentração final de 5% (o DMSO acelera a reação e aumenta o tamanho dos cristais). Aliquotas de 1 mL foram aquecidas a 75°C por 16 horas. Em seguida a solução foi centrifugada a 2.400g por 20 minutos e o *pellet* foi ressuspensa em 1 mL de água MilliQ (este procedimento foi repetido quatro vezes).

Após a última centrifugação, o *pellet* foi ressuspensa em 1 mL de solução de extração de β-hematina, homogeneizado por 5 minutos e centrifugada a 2.400g por 20 minutos (este procedimento foi repetido quatro vezes). A solução foi, então, ressuspensa em 1 mL de água MilliQ e centrifugada a 2.400g por 20 minutos (este procedimento foi repetido quatro vezes).

A remoção da solução foi realizada utilizando em *Speed Vac* em baixa velocidade por aproximadamente 30 minutos. A massa resultante foi pesada e ressuspensa em 1mL de PBS 1X estéril. Um volume de 5µL de β-hematina foi diluído em 1mL de NaOH 0.1M, homogeneizado e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente, colocada em placa de 96 poços de fundo chato (NUNC) e a leitura foi realizada no espectro entre 300 e 700 nm em leitora de placa (Spectramax L190).

4.4.3. Meios de Cultura:

Meio de diferenciação de Macrófagos da Medula Óssea - BMM.

- 300mL de Sobrenadante de cultura de células de linhagem L929
- 200mL de Soro Bovino Fetal (CultiLab)
- 10mL de penicilina e estreptomicina (LGC Biotecnologia – 10.000U/mL)
- 10mL de L-glutamina (LGC Biotecnologia – 200mM)
- 10mL de Hepes (Sigma Aldrich)
- Meio de cultura RPMI 1640 (LGC Biotecnologia) q.s.p. 1L

Meio de expansão de cultura de linhagem L929.

- 100mL de soro bovino fetal
- 10mL de penicilina e estreptomicina
- 10mL de L-glutamina
- 10mL de Hepes
- Meio de cultura RPMI 1640 q.s.p. 1L

Meio de cultura para expansão de cultura de linhagem RAW 264.7

- 100mL de soro bovino fetal
- 10mL de penicilina e estreptomicina
- 10mL de L-glutamina
- 10mL de Hepes
- Meio de cultura DMEM High Glicose (LGC Biotecnologia) q.s.p. 1L

Meio de cultura para diluição dos estímulos relacionados à malária

- 2mL de soro bovino fetal*
- 1mL de penicilina e estreptomicina
- 1mL de Hepes
- Meio de cultura RPMI 1640 q.s.p. 100mL

* Meio utilizado para diluir heme não foi suplementado com soro bovino fetal.

4.5. Culturas de células de linhagens

4.5.1. Linhagem L929 (linhagem de fibroblasto murino)

Cultura de células da linhagem L929 (gentilmente doados pelo Dr. Guy Zimmerman do Laboratório de Biologia Molecular e Genética Humana da Universidade de Utah - Salt Lake, EUA), foi cultivada para a obtenção do fator GM-CFS. As células da linhagem L929 foram descongeladas e cultivadas em estufa (Labline) com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, com o meio de expansão da linhagem, em um total de 3mL em garrafa de cultura de 25cm² (CORNING® FLASKS) até atingir confluência completa no fundo da garrafa. As células foram soltas com 3 mL de uma solução de tripsina 0.05% (LGC Biotecnologia), centrifugadas a 1200g por cinco minutos, seu sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 12mL do meio descrito acima e cultivadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C em garrafa de cultura de 75cm², até alcançarem confluência completa no fundo da garrafa. As células foram soltas com 12mL de uma solução de tripsina 0.05%, centrifugadas (1200g) por cinco minutos, seu sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 25mL do meio descrito acima e cultivadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C em garrafas de cultura de 150cm², até alcançarem confluência completa no fundo da garrafa. As células foram soltas com 25mL de uma solução de tripsina 0.05%, centrifugadas (1200g) por cinco minutos, sobrenadante descartado e o total de células foi semeado em quatro garrafas de cultura de 150cm² com 25mL mililitros do meio descrito acima em cada garrafa em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C até atingirem confluência completa no fundo da garrafa. Ao atingirem a confluência completa, foi acrescentado 100mL do meio descrito acima em cada garrafa e células foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ por sete dias. Após o período de incubação, sobrenadantes das garrafas de cultura foram recolhidos, filtrados em sistema de filtração de quinhentos mililitros de 0.22 µm (MILLIPORE), e estocados congelados para posterior utilização em cultura de diferenciação de macrófagos da medula óssea.

4.5.2. Linhagem RAW 264.7 (linhagem de macrófagos peritoneais murino)

Células da linhagem RAW 264.7 (gentilmente doadas pelo banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ), foram cultivadas em 25mL de meio de expansão da linhagem, em garrafas de cultura de 150cm² em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C até alcançarem confluência completa no fundo da garrafa. Após a expansão, células foram soltas por raspagem utilizando o “cell scraper” de 30cm (TPP®), contadas em câmara de Neubauer e semeadas na densidade de 10⁶ células por poço em placas de vinte e quatro poços (TPP®), com e sem lamínulas, por duas horas para a adesão em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. As células não aderidas foram descartadas através de lavagem dos poços. As células foram estimuladas em triplicata de três poços com LPS (100 ng/mL), hemozoína sintética – sHz (30µM), heme (30µM). As células foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ pelos tempos de seis e vinte e quatro horas. Os sobrenadantes foram recolhidos e congelados para posteriores dosagens de mediadores inflamatórios e as células foram separadas para posteriores análises por citometria de fluxo e por reação em cadeia de polimerase quantitativo (PCR em tempo real).

4.6. Culturas primárias

4.6.1. Macrófagos peritoneais

Para a obtenção de macrófagos peritoneais, camundongos CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-} foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂. Após assepsia da pele com álcool etílico a 70%, as cavidades peritoniais dos animais foram abertas, sendo lavadas com injeção de 3mL de meio RPMI 1640 utilizando uma seringa de 5mL (BD). Foram recolhidos cerca de 2mL, por cavidade, de meio contendo os macrófagos do lavado. Os macrófagos recolhidos foram contados em câmara de Neubauer e semeados 10⁶ células por poço de placas de vinte e quatro poços (TPP®). Os macrófagos foram incubados por duas horas para a adesão em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Macrófagos não aderidos foram descartados através de lavagens dos poços com meio RPMI 1640. Macrófagos foram estimulados em triplicata de três poços com LPS (100ng/mL), hemozoína sintética – sHz (30µM), heme (30µM). As células foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂

pelos tempos de seis e vinte e quatro horas. Sobrenadantes foram recolhidos e congelados para posteriores dosagens de mediadores inflamatórios e células foram separadas para posteriores análises por citometria de fluxo e por reação em cadeia de polimerase quantitativo (PCR em tempo real).

4.6.2. Macrófagos diferenciados da medula óssea

Para a obtenção de macrófagos diferenciados da medula óssea, camundongos CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-} foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂. Após assepsia da pele com álcool etílico a 70%, fêmures e tíbias foram cuidadosamente descarnados utilizando um bisturi cirúrgico (LAMEDID). Após a descarnação, epífises foram cuidadosamente cortadas e as medulas foram lavadas através de injeção de 2mL de meio BMM com uma seringa de 3mL. As células obtidas da medula óssea foram contadas em câmara de Neubauer, sendo feito para isso uma diluição de 10mL de células em 390mL de solução de Turk. Foram semeadas 4X10⁶/10 mL em placas de petri (CORNING® FLASKS).

4.7. Ensaios de diferenciação celular.

Com o intuito de avaliar o papel da integrina CD11d/CD18 no processo de diferenciação celular, o total de macrófagos diferenciados no sexto dia de cultura, provenientes da medula óssea de camundongos CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-} foram contados em câmara de Neubauer. Para análises por citometria de fluxo, macrófagos diferenciados *in vitro* de camundongos CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-} foram incubados na concentração de 10⁶ células em 100µL. O anticorpo de rato contra a molécula CD16/CD32 de camundongo clone 2.4G2 (BD Pharmingen) foi utilizado para bloquear receptores Fc. Após 15 minutos de incubação a 4°C, as amostras foram centrifugadas a 200g por 5 min e em seguida foram marcadas com anticorpo de hamster específico para CD11d de camundongo FITC (ICOS clone 205C). Um grupo de células também foi marcado com anticorpo de rato específico para a molécula F4/80 de camundongo PE (BD-Pharmingen). Após 20 minutos de incubação a 4°C e ao abrigo da luz, as células foram fixadas a 3,7% de formalina.

Cerca de 10.000 eventos foram adquiridos na região morfológica característica para macrófagos, utilizando o FACSCalibur e análises foram feitas utilizando o software CellQuest.

4.8. Ensaio de proliferação celular.

Além disso, avaliamos a capacidade proliferativa desses macrófagos diferenciados da medula óssea através do método de CFSE *in vitro*. Um total de 10^6 macrófagos proveniente da medula óssea de camundongos CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-} com 6 dias de diferenciação foram ressuspensos em PBS 1X (0,01% de BSA) e centrifugados a 1200g por 5 minutos. Estes macrófagos foram ressuspensos em uma solução contendo 5 nM/mL de CFSE (sigla em inglês para Carboxifluoresceína éster succinimidyl) (CellTrace™) e incubados a 37°C por 10 minutos. As células foram lavadas com meio RPMI sem soro. Células foram centrifugadas a 1200g por 5 minutos e ressuspensas em PBS 1X.

Cerca de 10.000 eventos foram adquiridos* na região morfológica característica para macrófagos, utilizando o FACSCalibur e análises foram feitas utilizando o software CellQuest.

***Amostras foram adquiridas nos dias 0 e 6 de diferenciação.**

4.9. Extração de RNA

Uma vez que Miyazaki e colaboradores (2008) já demonstraram que a expressão da integrina CD11d aumenta em macrófagos esplênicos e é induzida em macrófagos do fígado no curso da infecção com PbA em modelo *in vivo*. Além disso, este mesmo trabalho demonstrou que a expressão dessa integrina é induzida, também, em células de linhagem leucêmica M1 após a estimulação *in vitro* com citocinas, nós avaliamos a expressão desta molécula em células da linhagem macrófaga murina RAW 264.7 através de qPCR.

Para a extração de RNA foi utilizado 1mL de Trizol (Invitrogen™) a um total de 8×10^6 células por grupo experimental.

Para realizar a separação de ácidos nucleicos da amostra acrescentou-se 200ul de clorofórmio (Merk) e a solução foi misturada por 15 segundos. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente (15-30°C) por 2-3min e foram centrifugadas por não mais que 12.000g por 15min, entre 2-8°C.

Após esta etapa, ocorreu a separação da solução em duas fases, a aquosa onde se encontra o RNA e o DNA e outra orgânica. A fase aquosa foi transferida para outro tubo (no qual foi acrescentado 500ul de álcool isopropílico (Sigma Aldrich). As amostras foram incubadas a temperatura ambiente (15-30°C) por 10min,

sendo centrifugadas em seguida por não mais que 12.000g por 10min, entre 2-8°C para a precipitação do RNA.

O sobrenadante foi retirado com cuidado, e ao *pellet* foi acrescentado 1ml de álcool etílico 75% (Proquímicos). As amostras foram misturadas e centrifugadas por não mais que 7500g por 5min, entre 2-8°C. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram colocados na capela para a secagem do restante do álcool etílico. Depois de ocorrer a secagem foi acrescentado 20µL de água livre de RNase (Invitrogen™). O RNA foi congelado em *freezer* -80°C (Sanyo).

4.10. Preparo do cDNA para a integrina CD11d

Depois da extração, a concentração e a qualidade final do RNA foram determinados através da utilização do espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Foi utilizado 1µg de RNA total para sintetizar o cDNA de fita simples por transcrição reversa utilizando o *Kit SuperScript First-Strand* (Invitrogen™).

Foi utilizado por tubo 1µl de dNTP (indicado pelo *Kit*) 1µl de Primer (indicado pelo *kit*) 1µl de RNA (indicado pelo *kit* usar 0,5ug/500ng) e com água livre de RNase q.s.p. 10ul. Os tubos com as misturas da reação foram, então, colocados no termociclador (Techne) por cinco minutos a 65°C. Foi acrescentado por tubo 9µl da mistura de reação contendo 2µl de 10X RT buffer, 4µl de 25nM MgCl₂, 2µl de 0.1M DTT e 1µl de RNase OUT (40U/µl). Colocamos os tubos no Termociclador nas seguintes condições:

- 42°C por 2min
O programa foi interrompido e acrescentou-se 1µl da enzima Super Script II em cada tubo. Após isso, o programa foi reiniciado.
- 42°C por 50min
- 70°C por 15min

As amostras foram colocadas no gelo por um minuto e 1µl da enzima RNase H por tubo. Por fim, as amostras foram levadas ao termociclador por vinte minutos a 37°C e depois congeladas no freezer -80°C.

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

Os transcritos de CD11d obtidos da reação de transcriptase reversa foram quantificados por PCR fluorogênico quantitativo em tempo real utilizando o sistema *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Para tanto, foram misturados 12,5 µl de Master Mix 2X; 1,25 µl do primer 20X; 10 µl da amostra de cDNA e 1,25 µl de água livre de RNase. A amplificação foi realizada no aparelho de PCR em tempo real modelo 7500 *Real Time PCR System* (Applied Biosystems).

Os primers utilizados foram: para o gene CD11d (TaqMan-murine-Mm01159115_m1) e para o gene HPRT (TaqMan- murine- Mm01545399_m1).

A expressão dos níveis de RNA foi calculada através do *software Data Assist v.3* e normalizadas em relação aos níveis de expressão do gene endógeno gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

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

Para avaliarmos o perfil de produção de MDA entre os macrófagos peritoneais e diferenciados da medula óssea de animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-}, o total de proteínas presentes no sobrenadante das culturas dessas respectivas células foram avaliados para posterior dosagem de MDA por TBARS. Para isso, as proteínas foram dosadas pelo método de BCA.

O reagente de trabalho foi preparado adicionando-se cinquenta partes de Reagente BCA **A** e uma parte de Reagente BCA **B**. Uma curva padrão (de 0,01562 a 2mg/mL) foi construída através de diluições seriadas a partir de albumina humana fornecida pelo fabricante. Um total de 25µL das amostras de sobrenadantes das culturas foi adicionado em triplicata nos poços de placas de fundo em U (Nunc). Foram adicionados 200µL do reagente de trabalho descrito acima nos poços. A placa foi incubada em estufa (Labline) a 37°C por trinta minutos e a leitura das amostras foi realizada a 562 nm na leitora de placas.

4.13. TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio, utilizamos o método de TBARS (sigla em inglês para Thiobarbituric Acid Reactive Substance). Este método avalia o estado de oxidação de hidroperóxidos em sistemas biológicos,

uma vez que os danos em lipídeos de membrana plasmática são determinados pela formação de subprodutos da peroxidação lipídica (como o MDA ou malondialdeído), que são substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico formadas durante a peroxidação nas membranas das células.

MDA reage com o ácido tiobarbitúrico gerando um produto colorido róseo detectado espectrofotometricamente em 535 nm.

A quantidade de proteínas presentes nos sobrenadantes das culturas de linhagem RAW 264.7, macrófagos peritoneais e diferenciados da medula óssea, estimulados como citado acima, foram dosadas pelo método de BCA, para o cálculo do volume necessário para se obter um total de 100µg de proteínas. O volume necessário para a reação foi adicionado em ácido tiobarbitúrico 0,67%, completando um volume final de 500µL. Em seguida, 500µL de BHT (um composto orgânico lipossolúvel e antioxidante, utilizado para evitar a formação de ROS durante o procedimento) foram adicionados à solução. O volume final foi aquecido a 96°C em banho seco por uma hora. A seguir, tubos foram colocados em gelo com o intuito de interromper a reação.

Um total de 200µL da solução de cada amostra foi adicionado em placa de fundo chato (NUNC) e a absorbância em 535nm foi determinada pelo espectrofotômetro. Concentrações de malondialdeído foram calculadas utilizando o coeficiente de redução desta molécula da seguinte forma: **Valor em OD da leitura/(14200*535)**

4.14. Dosagem de citocinas através do ensaio imunoabsorção ligado à Enzima (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ELISA)

Para avaliar o perfil de ativação celular e de resposta inflamatória dessas células, foram dosados os níveis de TNF-α e IL-10 nos sobrenadantes de culturas de macrófagos através do *kit* R&D dual set. Placas de fundo chato (Nunc) para ensaio em volume reduzido foram cobertas com o anticorpo de captura diluído em PBS 1x (50µL/poço) e seladas com filme plástico. Após incubação por 16 horas a 4°C, as placas foram lavadas quatro vezes com tampão de lavagem constituído de PBS 1X acrescido com Tween® 0,05% (100µL/poço) e incubadas durante uma hora com a tampão de bloqueio constituído de PBS 1X acrescido com 1% de albumina sérica bovina-BSA (100µL/poço) (Sigma Aldrich). A curva padrão foi diluída em tampão de bloqueio + Tween® (0,05%) e aplicada na placa, bem como as amostras

(50µL/poço). Após nova incubação por 16 horas a 4°C as placas foram lavadas 4x com tampão de lavagem e o anticorpo de detecção diluído em tampão de bloqueio + Tween® (0,05%) (50µL/poço) foi adicionado. Uma hora após a incubação com o anticorpo de detecção, as placas foram lavadas 6x com tampão de lavagem e foi adicionada a solução de streptavidina-peroxidase (R&D dual set) (50µL/poço). Trinta minutos após a incubação no escuro, as placas foram lavadas 8x com tampão de lavagem e foi acrescentada a solução de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB, Sigma Aldrich), substrato para a reação colorimétrica. Após desenvolvimento satisfatório de cor na curva-padrão, a reação foi interrompida com solução de H₂SO₄ 0,4N (50µL/poço) e a absorbância a 405 nm foi determinada pela leitora de placas.

4.15. Dosagem de prostaglandina E₂ (PGE₂) através do Kit de ensaio imunoenzimático (*Enzyme Immunoassay*, EIA) monoclonal (Cayman Chemical)

Para avaliar o perfil de ativação celular e de resposta inflamatória dessas células dosamos a produção de PGE₂ nos sobrenadantes de macrófagos peritoneais. Os padrões foram preparados em tampão para EIA diluído em noventa 90mL de água MilliQ, com suas concentrações variando de 1 ng/mL a 16,25 pg/mL. Em cada poço da placa revestida com anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo foram pipetados os seguintes valores:

	Tampão EIA	Padrão/ amostra	Rastreador	Anticorpo
Branco	50µL	-	50µL	50µL
Padrões/amostras	-	50µL	50µL	50µL

A placa foi incubada por aproximadamente 16 horas a 4°C. Depois deste período, esvaziou-se a placa e lavou-se a mesma em solução de lavagem fornecida pelo *kit* (5mL diluída em 2L de água MilliQ acrescida com Tween® 0,05%). Adicionou-se 200mL a cada poço do Reagente de Ellman's liofilizado (300 det.) diluído em 20mL de água MilliQ. Incubou-se a placa no escuro por cerca de uma hora e realizou-se a leitura da mesma na leitora de placas a 412 nm.

4.16. Purificação de PRBCs

Com o objetivo de avaliar a capacidade fagocítica dos macrófagos *in vitro*, PRBCs foram purificadas. O sangue de animais infectados com PbA foi recolhido através de punção cardíaca, sendo escolhidos para este procedimento apenas animais que apresentaram parasitemia superior a 50%. Um total de 10mL de sangue recolhido foi cuidadosamente acrescentado a um gradiente de Percoll 60% (GE Healthcare), e centrifugado a 7000g por 30 minutos a temperatura ambiente.

As PRBCs, localizadas na interfase do tubo, foram cuidadosamente retiradas com o auxílio de uma pipeta Pasteur (BD) e transferidas para outro tubo FALCON® de 15mL. Foram adicionados 5mL de PBS1X às células e estas foram centrifugadas a 1200g por 5 minutos (este procedimento foi repetido duas vezes).

4.17. Ensaio de fagocitose de hemácias parasitadas.

Para avaliarmos o perfil de fagocitose de macrófagos peritoneais, células foram recolhidos de animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-} e semeados em placas de 24 poços em meio RPMI 1640 sem soro na densidade de 5X10⁵ células/poço e incubadas por duas horas para aderência. O sangue de animais infectados foi coletado e PRBCs foram purificadas através de gradiente de densidade em Percoll e contadas em câmara de Neubauer. Macrófagos peritoneais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-} foram incubados com hemácias parasitadas ou não parasitadas numa proporção de 1:50 e incubados a 37°C em atmosfera de 5% CO₂ por 2 horas. Em seguida as células foram coradas com kit Panótico e contadas 300 células por lamínula.

Para análises por citometria de fluxo, macrófagos peritoneais e diferenciados da medula óssea de animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-} foram estimulados com hemácias parasitadas com PbA-GFP numa proporção de 1:50 e incubados a 37°C em atmosfera de 5% CO₂ por 15 minutos. Cerca de 10.000 eventos foram adquiridos na região morfológicamente característica de macrófagos utilizando o FACSCalibur (BD-Becton, Dickinson and Company) e análises foram feitas utilizando o software CellQuest.

4.18. Ensaio de fagocitose de β -hematina (sHz)

Como trabalhos anteriores demonstram que a hemozoína é ativamente fagocitada por macrófagos na malária (Coban e cols., 2005), avaliamos se a integrina CD11d/CD18 influencia a capacidade fagocítica de macrófagos em relação a sHz.

Para isso, células RAW 264.7, macrófagos peritoneais e diferenciados da medula óssea foram estimulados com $30\mu\text{M}$ de β -hematina por seis e vinte e quatro horas, sendo as células incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 . Após os intervalos de tempos determinados de incubação, o sobrenadante foi descartado e as células foram lisadas com solução de lise de macrófagos por quatro horas a 4°C . Durante este período de incubação, juntamente com a lise dos macrófagos ocorre a despolimerização da β -hematina em hemina. Após este período de incubação, $50\mu\text{L}$ de cada amostra foi aplicada em placa de fundo chato (NUNC). Uma curva padrão com concentrações conhecidas de hemina foi utilizada e a absorbância de 400nm foi determinada pela leitora de placa.

4.19. Análise Estatística

Os resultados obtidos neste trabalho foram expressos como média e erro padrão da média (SEM) e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e “*Newman-Keuls-Students*” como pós-teste para amostras não pareadas. Para amostras pareadas foi utilizado o teste “t” *Student*. Os valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

5.1. A integrina CD11d/CD18 não interfere na diferenciação e proliferação de macrófagos diferenciados da medula óssea.

Com intuito de compreender se a integrina CD11d/CD18 participa dos processos de proliferação e diferenciação de macrófagos *in vitro*, células da medula óssea de animais CD11^{+/+} e CD11d^{-/-} foram recolhidas e cultivadas por seis dias para diferenciação com o meio contendo o fator GM-CSF, presente no sobrenadante de cultura de células L929. No sexto dia de cultura, o total de células foi contado. Como demonstrado no gráfico 1A, nossos resultados de contagem total de células diferenciadas da medula óssea de animais CD11d^{-/-} mostram que não há diferença quando comparados ao total de células diferenciadas da medula óssea de animais CD11d^{+/+}. Além disso, não observamos nenhuma diferença no percentual de células F4/80⁺ (gráfico1B) assim como na intensidade média de fluorescência (figuras 1C e 1D) entre os macrófagos diferenciados da medula óssea de animais CD11^{+/+} e CD11d^{-/-} no sexto dia de cultura.

Utilizando o método de proliferação celular em nossos experimentos *in vitro*, células da medula óssea foram marcadas com CFSE e analisadas por citometria de fluxo no primeiro e sexto dia de cultura. Nossos resultados demonstram que tanto os macrófagos provenientes de animais CD11d^{+/+} como os CD11d^{-/-} não apresentaram diferenças significativas na sua capacidade proliferativa, tendo em vista que não houve diferença no decréscimo da intensidade de fluorescência entre os macrófagos de animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-} (Figura 1E e 1F respectivamente). Esse conjunto de dados sugerem que a integrina CD11d/CD18 não interfere nos processos de proliferação e diferenciação de macrófagos *in vitro*.

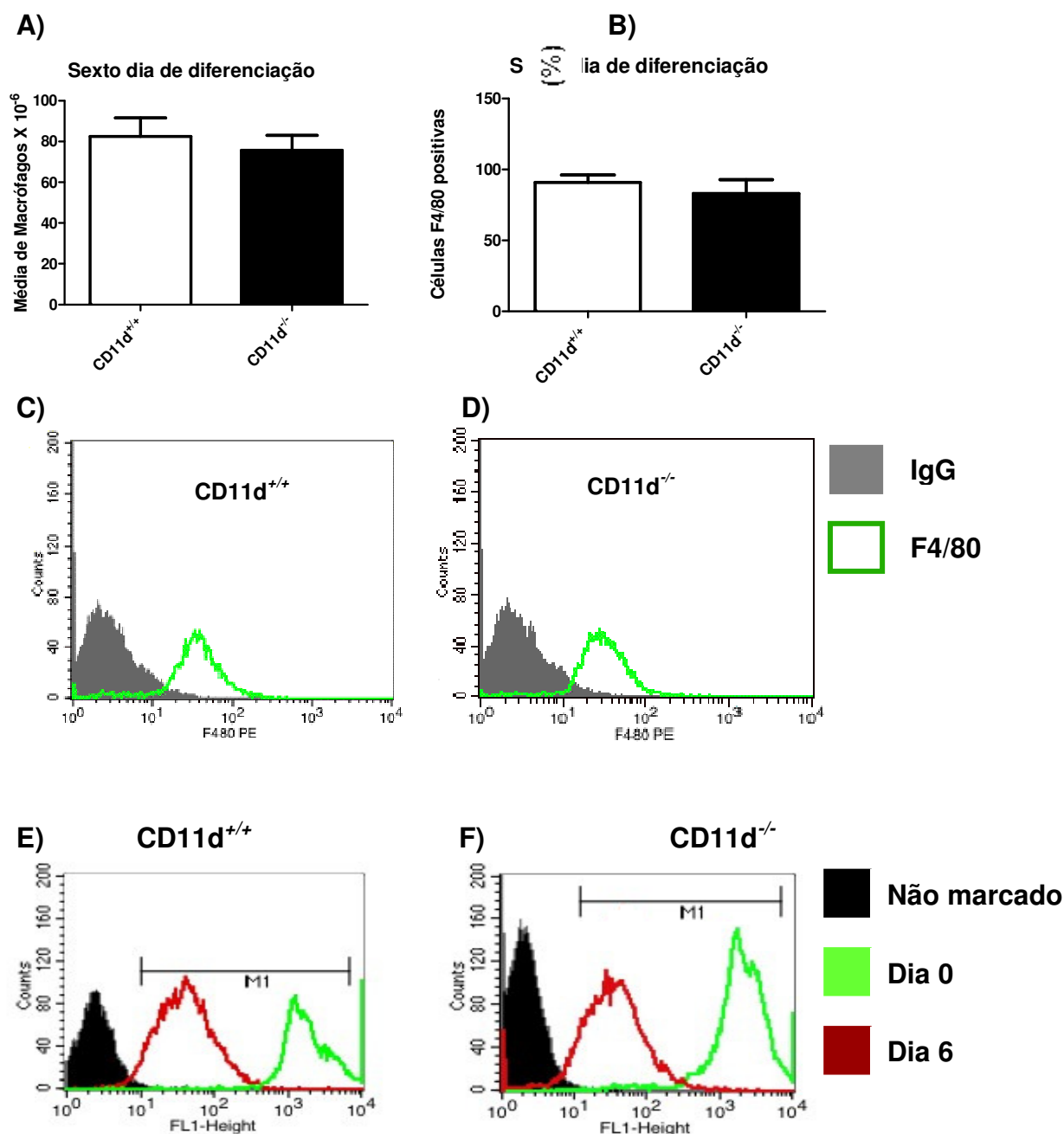


Figura 5.1: Macrófagos de animais $CD11d^{+/+}$ e $CD11d^{-/-}$ não diferem na sua capacidade proliferativa. 4×10^6 células totais da medula óssea foram cultivadas em meio contendo o fator GM-CSF, presente no sobrenadante de cultura de células L929 por seis dias. O total de células de animais $CD11d^{+/+}$ e $CD11d^{-/-}$ foi contado no sexto dia de diferenciação em câmara de Neubauer. Os resultados não apresentaram diferenças significativas no número total de macrófagos (1A). Os macrófagos diferenciados também foram marcados com anticorpo anti-F4/80 no sexto dia para avaliar o número de macrófagos diferenciados entre os dois grupos (1B, 1C e 1D). Macrófagos da medula óssea foram marcados com CFSE e diminuição da fluorescência entre os macrófagos diferenciados da medula óssea ocorreu de forma similar entre os macrófagos $CD11d^{+/+}$ e $CD11d^{-/-}$, não havendo diferenças significativas entre eles (1E e 1F, onde: células não marcadas representadas em preto, células no primeiro dia de cultura representadas em verde e células no sexto dia de cultura representadas em vermelho). Gráfico 1A representa a média de sete experimentos; Gráfico 1B e histogramas 1C, 1D, 1E e 1F representativos de dois experimentos.

5.2. A integrina CD11d é dinamicamente expressa em macrófagos diferenciados da medula óssea.

Com o objetivo de investigar a dinâmica da expressão da integrina CD11d no processo de diferenciação de macrófagos *in vitro*, células totais da medula óssea e macrófagos diferenciados no sexto dia de cultura foram marcadas com anticorpo específico para a cadeia CD11d, F4/80 e seus isotipos controles, sendo analisadas posteriormente através da técnica de citometria de fluxo. Nossas análises demonstram que a integrina CD11d é expressa a partir do primeiro dia de cultura em células F4/80⁺, sendo esta expressão significativamente aumentada no sexto dia de cultura como se pode observar na figura 2B. A figura 2C mostra a especificidade da marcação para ambos os marcadores pela utilização do controle negativo e a figura 2D a representação gráfica dos *dot plots*. Estes resultados sugerem que a integrina é dinamicamente expressa em células provenientes de medula óssea e sua expressão é regulada positivamente ao longo do processo de diferenciação *in vitro*.

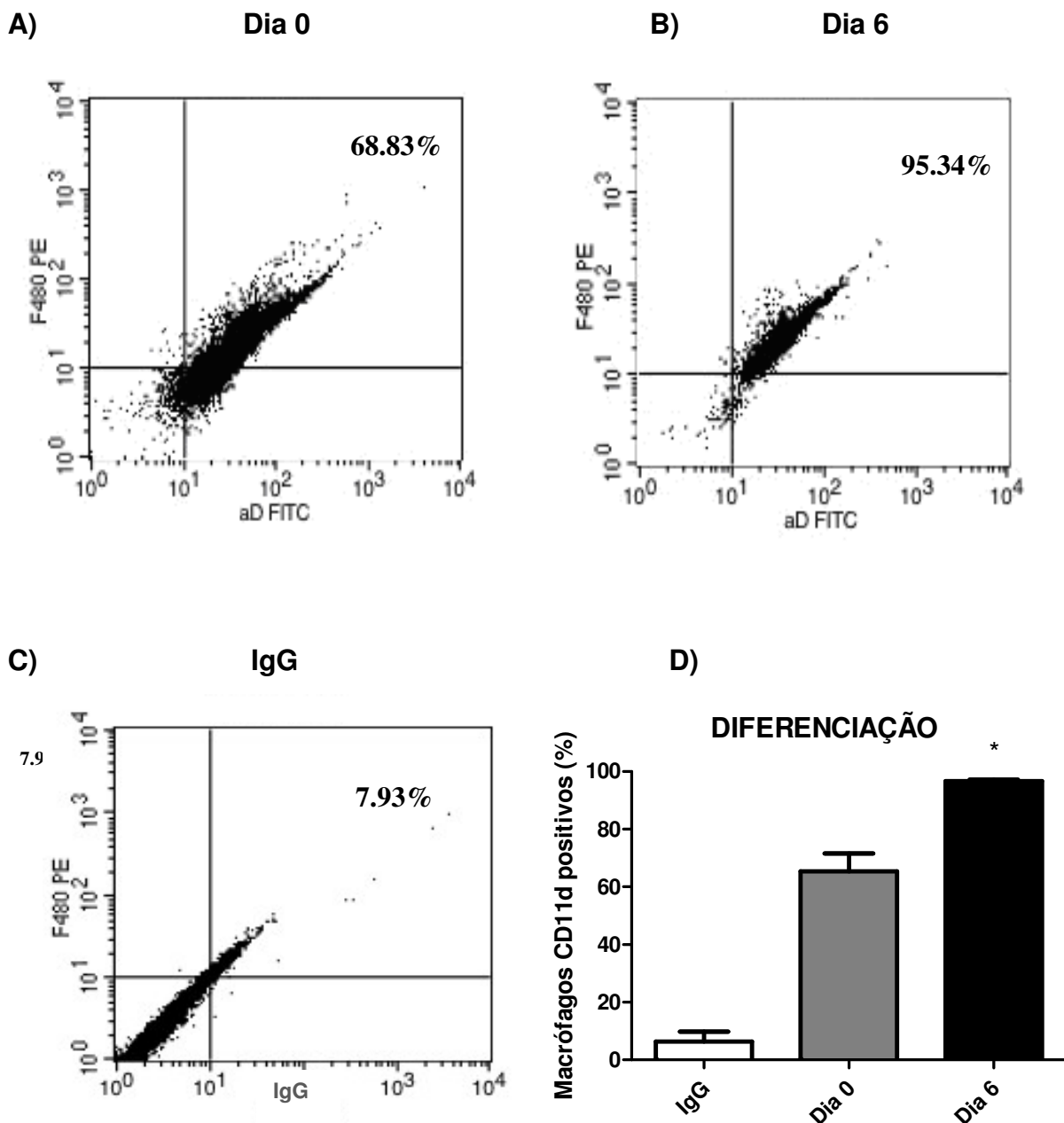


Figura 5.2: Expressão da integrina C11d em macrófagos provenientes da medula óssea durante a diferenciação. As medulas óssea de animais $CD11d^{+/+}$ foram lavadas e suas células foram incubadas em meio contendo o fator GM-CSF por 6 dias a $37^{\circ}C$ sob atmosfera de 5% CO_2 . Células foram marcadas com anticorpos FITC anti-CD11d e PE anti-F4/80, e o número de células duplamente positivas foi verificado no primeiro e sexto dia de cultura em FACSCalibur (BD-Becton, Dickinson and Company) e analisadas utilizando o software CellQuest (dot plots A e B, respectivamente). Como controle negativo, outro grupo de células foram marcadas com isotipo inespecífico (dot plot C). O gráfico D é representativo dos dot plots anteriores. Cada barra representa a média \pm SEM, para poços em triplicata. Diferenças significativas $p < 0,05$ em relação ao Dia 0 (*). Dot plots e gráficos representando dois experimentos.

5. 3. Aumento da expressão da integrina CD11d em macrófagos estimulados *in vitro*.

Estudos anteriores demonstraram que a expressão da integrina CD11d é dinamicamente aumentada em macrófagos esplênicos e induzida em macrófagos do fígado no curso da infecção com PbA em modelo *in vivo*. Além disso, foi demonstrado que sua expressão pode ser modulada em células de linhagem leucêmica M1 após a estimulação *in vitro* com citocinas (Miyazaki e cols, 2008). Com base nessas observações avaliamos a expressão da integrina CD11d no processo de diferenciação de macrófagos provenientes da medula óssea. Em nossos primeiros resultados, observamos que células da medula óssea tem uma expressão constitutiva da integrina CD11d, sendo esta expressão aumentada em macrófagos diferenciados da medula óssea *in vitro* (figuras 2A, 2B e 2D). Posteriormente, decidimos investigar o papel da hemozoina sintética (sHz) na expressão da integrina CD11d em células da linhagem macrófágica murina RAW 264.7 *in vitro*. Nossas análises de PCR em tempo real demonstraram que sHz na concentração de 20 μ M foi capaz de aumentar a expressão da integrina CD11d nos tempos de 2 e 6h (Figura 3A e 3B). No entanto culturas estimuladas com sHz 10 μ M só foram capaz de induzir aumento da expressão da CD11d quando estimuladas por 6h. Além disso, não observamos nenhum efeito da expressão da integrina CD11d quando as culturas foram estimuladas com sHz a 2 μ M (Figura 3B).

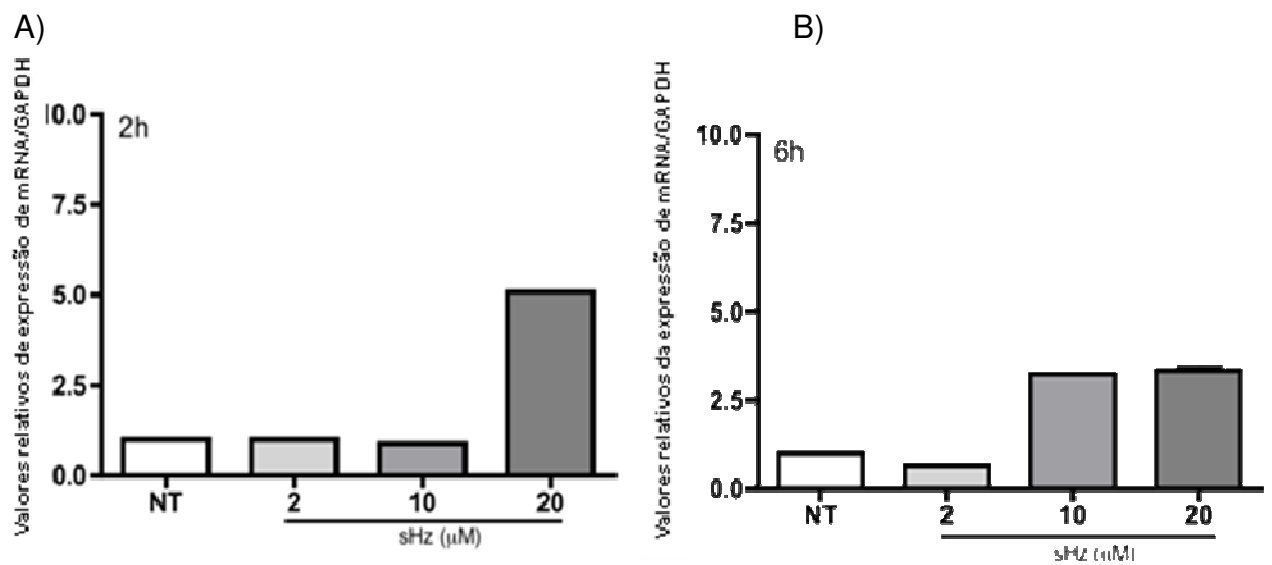


Figura 5.3: Dinâmica da expressão da integrina CD11d em cultura células das linhagens RAW 264.7 estimuladas com sHz in vitro. RNA mensageiro da integrina CD11d, em células RAW 264.7, foram analisados por PCR em tempo real nos tempos de 2 e 6 horas de incubação com sHz (2, 10 e 20 μM) a 37°C em atmosfera de 5% CO₂ (gráficos 3A e 3B, respectivamente). GAPDH foi utilizado como controle interno. Gráficos representativos de dois experimentos.

5.4. A integrina CD11d influencia o padrão de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) *in vitro*.

Na resposta pró-inflamatória ocorre produção de citocinas como o INF- γ , IL-12 e TNF- α , além de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), principalmente o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o óxido nítrico (NO). Esse tipo de resposta é crítica para a eliminação do plasmódio e estimula a fagocitose por envolvido no controle da infecção. Por outro lado, a produção excessiva desses mediadores pró-inflamatórios contribui para a fisiopatologia das formas graves da malária (Malaguarnera & Musumeci, 2002; Becker e cols, 2004).

Com o objetivo de avaliar o papel da integrina CD11d/CD18 no processo de ativação celular, verificamos a influência desta integrina na produção de ROS (Bowie e cols 1997; Choi e cols, 2003). Utilizando a reação de TBARS (substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico), dosamos os níveis de formação de malondialdeído, molécula formada em decorrência da peroxidação lipídica, em macrófagos *in vitro*. Para isso, sobrenadantes de culturas de células da linhagem RAW 264.7 nos tempos de 6 e 24 horas foram utilizados como controle. Observamos que, em células da linhagem RAW 264.7, a produção de malondialdeído foi marcante em células estimuladas com heme nos tempos de 6 e 24 horas (gráficos 4.1A e 4.1B respectivamente), e sHz só foi capaz de induzir a produção desta molécula no tempo de 24 horas (gráfico 4.1B).

Macrófagos peritoneais de animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-} em cultura também foram estimulados com sHz e heme nos tempos de 6 e 24 horas, e a reação de TBARS em seus sobrenadantes mostra que macrófagos peritoneais só produziram quantidades significativas de malondialdeído quando estimulados com heme nos tempos de 6 e 24 horas, não havendo diferenças nos níveis de produção dessa moléculas entre as células derivadas de animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-} (gráficos 4.2A e 4.2B; respectivamente). Entretanto, dosagens feitas em sobrenadantes de macrófagos diferenciados a partir da medula óssea de animais CD11d^{+/+} mostram que esses macrófagos, estimulados com sHz, produziram quantidades relevantes de malondialdeído após 6 horas de incubação, enquanto essa produção não foi significativa nos macrófagos diferenciados da medula óssea de animais CD11d^{-/-} (barra preta), estimulados com sHz também (gráfico 4.3A). Além disso, observamos que células de animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-} estimuladas com heme foram capazes de produzir quantidades significativas de malondialdeído nos tempos de 6 e 24 horas (gráficos 4.3A e 4.3B), sendo essa produção significativamente reduzida em

macrófagos derivados de animais $CD11d^{-/-}$ no tempo de 24 horas de incubação em relação aos macrófagos derivados de animais $CD11d^{+/+}$. Esse conjunto de dados sugere que a integrina $CD11d$ pode participar do processo de ativação celular. Entretanto, nossos resultados também sugerem que esta integrina participa dos processos de oxidação celular.

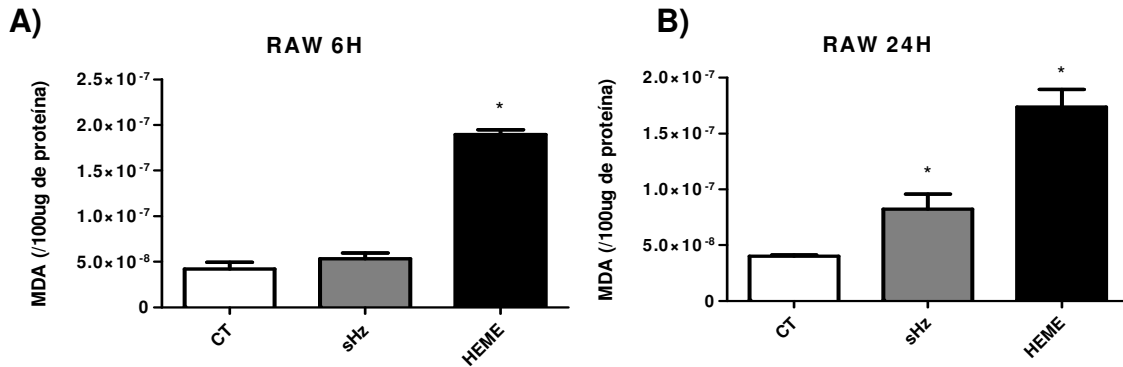


Figura 5.4.1: O papel da integrina $CD11d$ na formação de estresse oxidativo em células RAW 264.7. 1×10^6 células da linhagem RAW 264.7 foram semeadas em placas de 24 poços e estimulados por 6 e 24 horas de incubação com sHz ($30 \mu M$) e heme ($30 \mu M$) por 6 e 24 horas de incubação a $37^\circ C$ em atmosfera de 5% CO_2 (gráficos A e B, respectivamente). Seus sobrenadantes foram congelados e armazenados para dosagem da produção de malondialdeído (MDA) através da reação de TBARS. Cada barra representa a média \pm SEM, para poços em triplicata. Diferenças significativas, $p < 0,05$ em relação ao CT (*). Gráficos representativos de três experimentos.

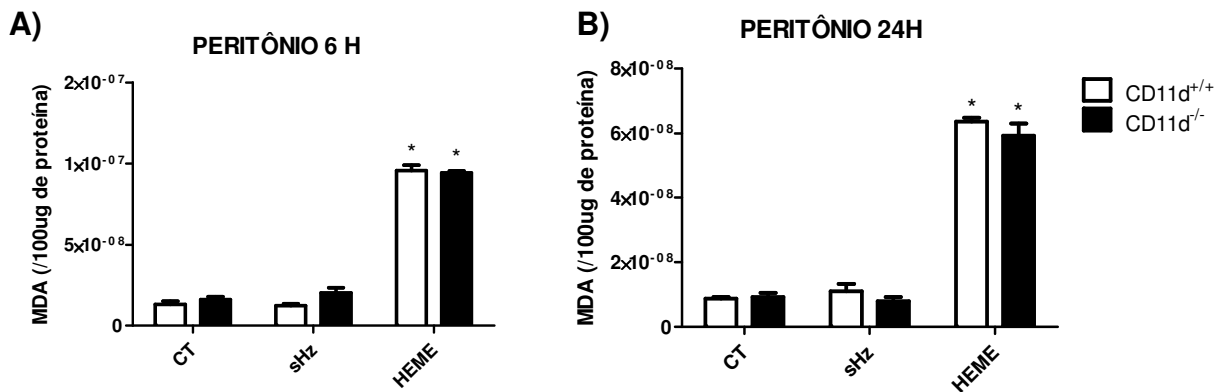


Figura 5.4.2: O papel da integrina $CD11d$ na formação de estresse oxidativo em macrófagos peritoneais. 1×10^6 macrófagos peritoneais de animais $CD11d^{+/+}$ e $CD11d^{-/-}$ foram semeados em placas de 24 poços e estimulados por 6 e 24 horas de incubação e estimulados com sHz ($30 \mu M$) e heme ($30 \mu M$) a $37^\circ C$ em atmosfera de 5% CO_2 (gráficos A e B, respectivamente). Seus sobrenadantes foram congelados e armazenados para dosagem da produção de malondialdeído (MDA) através da reação de TBARS. Cada barra representa a média \pm SEM, para poços em triplicata. Diferenças significativas, $p < 0,05$ em relação ao respectivo CT (*) e em relação aos macrófagos de animais $CD11d^{+/+}$ que receberam o mesmo estímulo (#). Gráficos representativos de três experimentos.

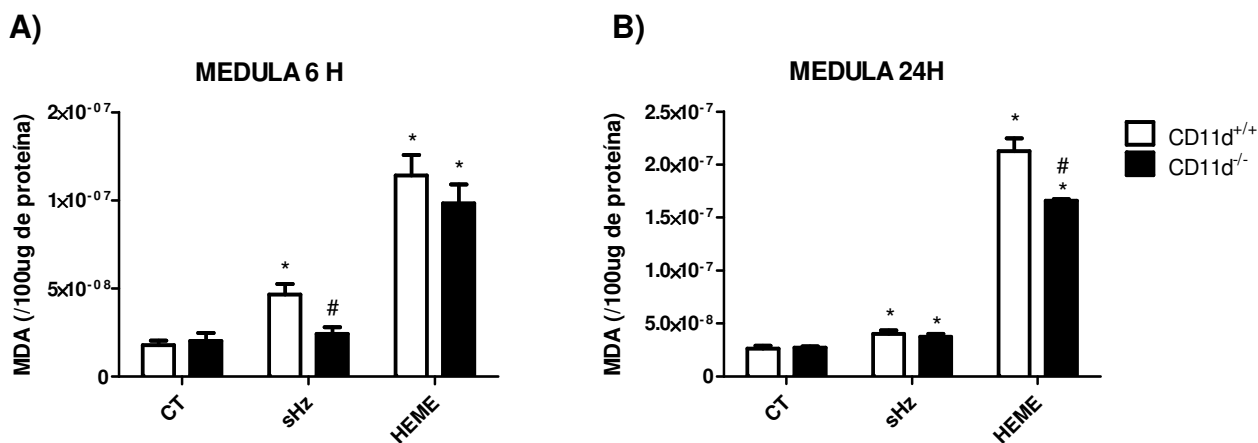


Figura 5.4.3: O papel da integrina CD11d na formação de estresse oxidativo em macrófagos diferenciados da medula óssea. 1×10^6 macrófagos diferenciados da medula óssea de animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-}, foram semeados em placas de 24 poços e estimulados por 6 e 24 horas de incubação e estimulados sHz (30 μ M) e heme (30 μ M) por 6 e 24 horas de incubação (gráfico A e B, respectivamente). Seus sobrenadantes foram congelados e armazenados para dosagem da produção de malondialdeído (MDA) através da reação de TBARS. Cada barra representa a média \pm SEM, para poços em triplicata. Diferenças significativas, $p < 0,05$ em relação ao respectivo CT (*) e em relação aos macrófagos de animais CD11d^{+/+} que receberam o mesmo estímulo (#). Gráficos representativos de três experimentos.

5.5. A integrina CD11d influencia o padrão de produção de citocinas *in vitro*.

As citocinas são um grande grupo de proteínas ou glicoproteínas que atuam no sistema imunológico através do estímulo ou inibição dos processos de ativação, proliferação e/ ou diferenciação de várias células, além de regularem a secreção de anticorpos, produtos celulares e de outras citocinas. Esse grupo de moléculas participa na promoção, inibição ou re-direcionamento da resposta imune. (Kelso, 1998; Opdal e cols., 2003; Henao e cols., 2006). Na malária o balanço entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias é de grande relevância na evolução da parasitemia; gravidade e taxa de recuperação da doença (Day e cols, 1999; Winkler e cols, 1998; Gogos e cols, 2000).

O TNF- α é uma citocina produzida em grande quantidade como consequência da presença de antígenos maláricos (Grau e cols., 1986). Adicionalmente, a citocina IL-10, que possui uma atividade anti-inflamatória é importante na proteção contra a malária cerebral e em casos de coinfeção, uma vez que sua produção fornece um balaço na resposta imune (Niikura e cols, 2010).

Dessa forma, a modulação da produção de citocinas é essencial para o desenvolvimento da malária e, embora várias delas tenham sido estudadas isoladamente o efeito sistêmico é consequência do padrão geral produzido (Schofield e cols, 1995). Por esta razão, compreender o perfil e cinética de liberação das mesmas é importante para o entendimento da fisiopatologia da malária grave.

Sabe-se que as integrinas podem modular o perfil da produção de citocinas pró e antiinflamatórias, podendo ser descritas como parâmetro de ativação celular (Miyazaki e cols., 2008). Por isso, decidimos investigar o papel da integrina CD11d no processo de ativação celular de macrófagos avaliando a produção de citocina *in vitro*.

Primeiramente utilizamos uma linhagem de células macrófágica, a RAW 264.7, para avaliar a produção de citocinas quando estimuladas com sHz e heme. Observamos que o tratamento com sHz e heme foi capaz de induzir a produção de TNF- α nos tempos de 6 e 24 horas (gráficos 5.1A e 5.1B, respectivamente).

Macrófagos peritoneais coletados de animais CD11d^{+/+}, estimulados com sHz apresentaram um perfil de produção de TNF- α significativamente maior em relação aos macrófagos peritoneais coletados de animais CD11d^{-/-}, no tempo de 24 horas de cultura (gráfico 5.2B). Além disso, os macrófagos peritoneais dos animais CD11d^{+/+}, estimulados com heme apresentaram aumento da produção TNF- α quando comparados aos macrófagos dos animais CD11d^{-/-} tanto no tempo de 6 horas quanto 24 horas de estímulo (gráficos 5.2A e 5.2B respectivamente).

Posteriormente caracterizamos esse padrão de ativação em macrófagos diferenciados da medula óssea. Observamos que animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-}, quando estimulados com sHz e heme apresentaram um aumento significativo na produção de TNF- α tanto no tempo de 6 horas quanto 24 horas (Gráficos 5.2C e 5.2D, respectivamente). Entretanto, no gráfico 5.2C, podemos observar que os macrófagos diferenciados da medula óssea de animais CD11d^{-/-} estimulados com sHz por 6 horas produziram quantidades significativamente menores de TNF- α quando comparados com os macrófagos de animais CD11d^{-/-}.

Com intuito de compreender o papel da integrina CD11d na fisiopatologia da malária, fomos avaliar a produção de IL-10 nessas culturas. O gráfico 5.3A, mostra que macrófagos peritoneais provenientes de animais CD11d^{-/-}, estimulados com sHz e heme produziram quantidades significativamente mais altas de IL-10 no tempo de 6 horas quando comparados com macrófagos peritoneais de animais CD11d^{+/+}. No entanto, análises no tempo de 24 horas de cultura não demonstrou

esse perfil anti-inflamatório tão marcante, só havendo alterações nos níveis de IL-10 em macrófago estimulados com sHz (Gráfico 5.3B).

Além disso, macrófagos diferenciados da medula óssea de animais CD11d^{-/-} estimulados com sHz e heme, também foram capazes de produzir quantidades significativamente mais altas de IL-10 quando comparados com macrófagos diferenciados da medula óssea de animais CD11d^{+/+} no tempo de 6 horas de incubação (gráfico 5.3C). Entretanto, esse perfil anti-inflamatório não foi observado quando estimulados por 24 horas, onde somente as células de animais CD11d^{-/-} estimulados com sHz produziram quantidades maiores de IL-10 quando comparados com os macrófagos derivados de da medula óssea de animais CD11d^{+/+} (Gráfico 5.3D). Além disso, esse efeito não foi observado quando estimulamos essas culturas com heme no período de 24 horas.

Esses dados sugerem que a integrina CD11d pode participar do processo de ativação celular, bem como na modulação do perfil da resposta de macrófagos *in vitro*.

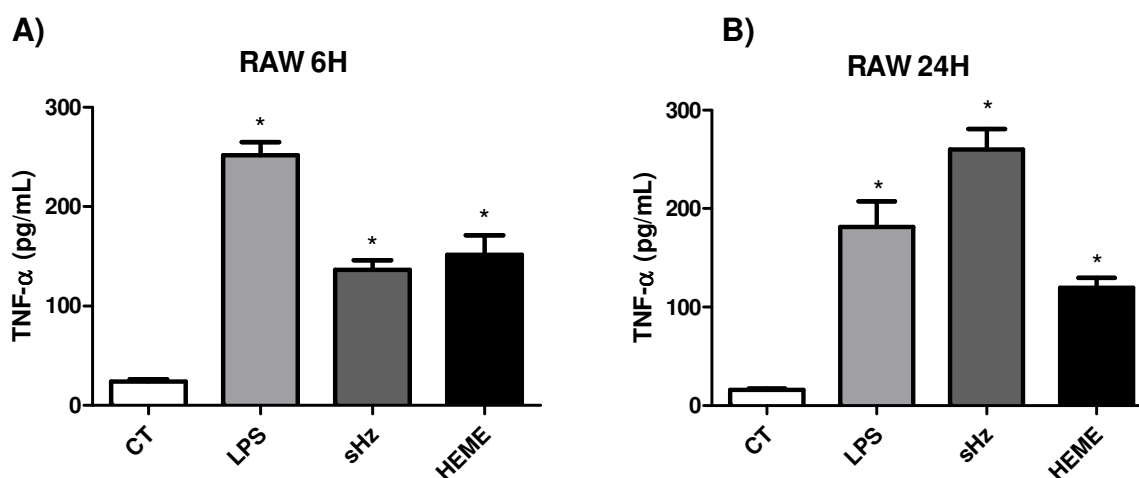


Figura 5.5.1: Diferenças no perfil de produção de TNF- α em células RAW 264.7. 1×10^6 células da linhagem RAW 264.7 foram estimulados com LPS (100 ng/mL), sHz (30 μ M) e heme (30 μ M) por 6 e 24 horas (gráficos A e B). Sobrenadantes foram congelados e armazenados para dosagem de citocinas, que foi feito através de ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA). Cada barra representa a média \pm SEM, para poços em triplicata. Diferenças significativas, $p < 0,05$ em relação ao CT (*). Gráficos de TNF- α em células RAW 264.7 são representativos de dois experimentos.

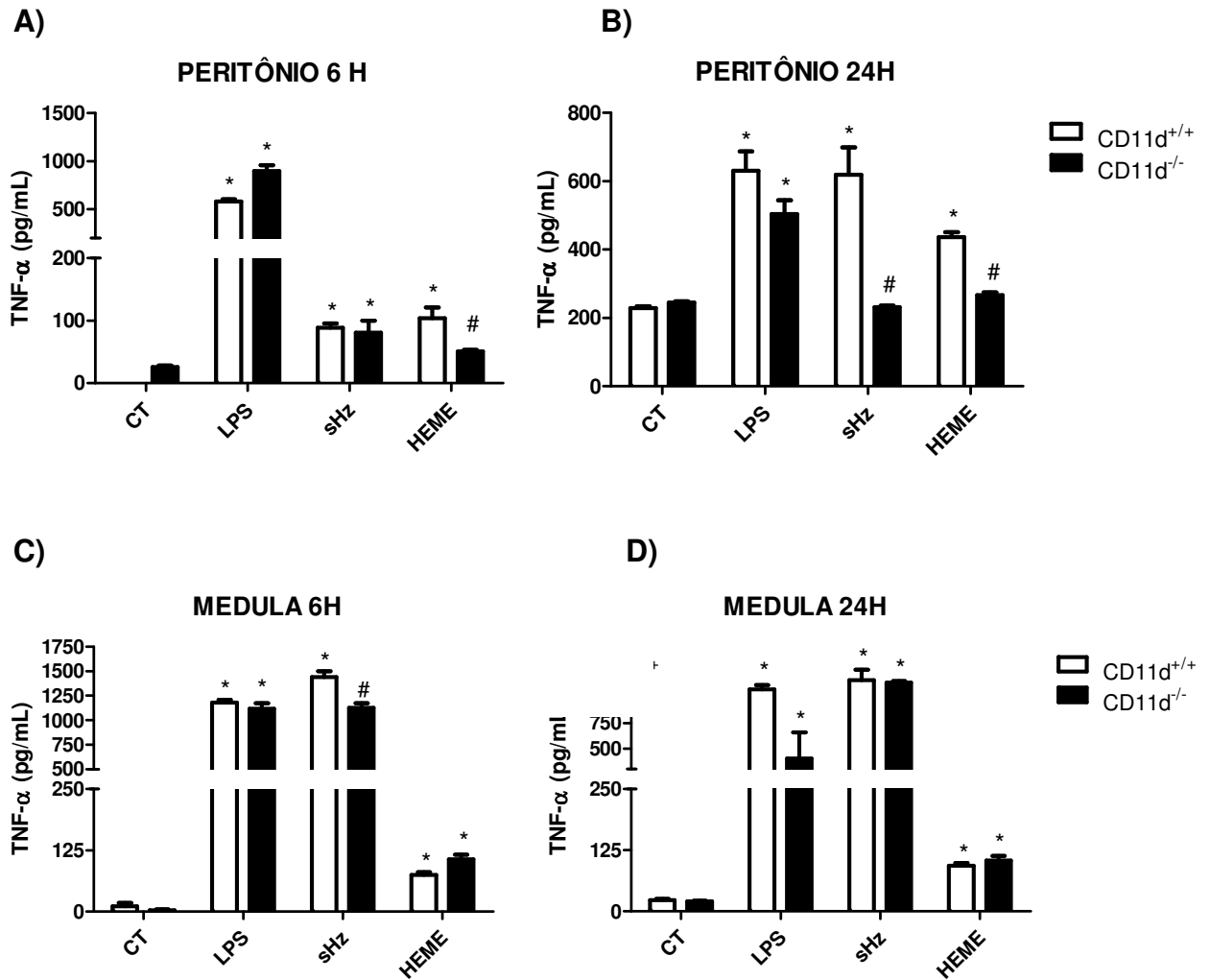


Figura 5.5.2: Diferenças no perfil de produção de TNF- α em macrófagos peritoneais de animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-}. 1×10^6 de macrófagos peritoneais e de medula óssea de animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-} foram semeados em placas de 24 poços e estimulados com LPS (100 ng/mL), sHz (30 μ M) e heme (30 μ M) por 6 horas (gráficos C e E) e 24 horas (gráficos D e F) respectivamente. Seus sobrenadantes foram congelados e armazenados para dosagem de citocinas. Dosagens dos níveis de TNF- α em macrófagos peritoneais (5C e 5D, respectivamente) e em macrófagos diferenciados da medula óssea (5E e 5F). Diferenças significativas, $p < 0,05$ em relação ao respectivo CT (*) e em relação aos macrófagos de animais CD11d^{+/+} que receberam o mesmo estímulo (#). Gráficos são representativos de três experimentos.

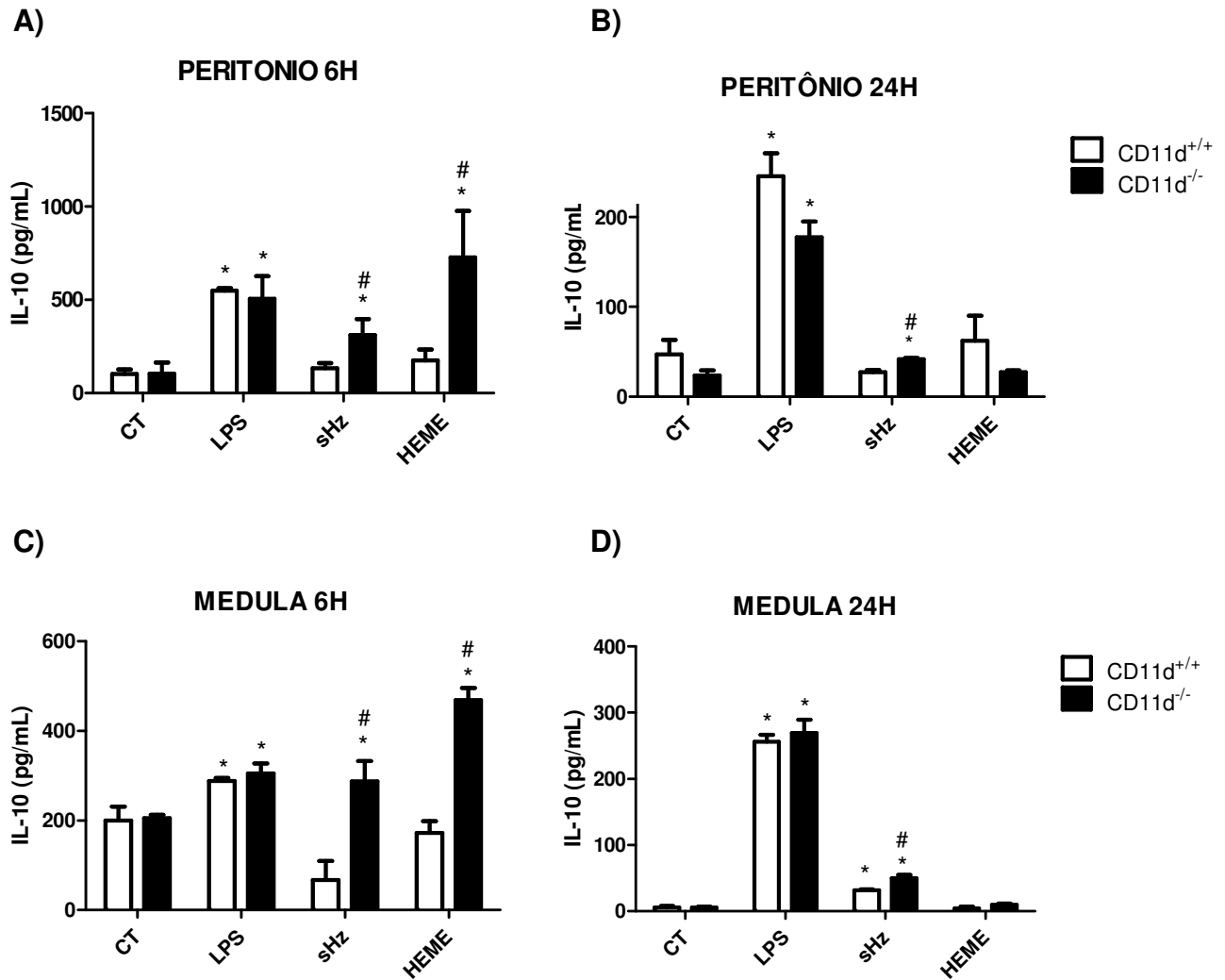


Figura 5.5.3: Diferenças no perfil de produção de IL-10 em macrófagos diferenciados da medula óssea de animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-}.

Um total de 1×10^6 de macrófagos diferenciados da medula óssea de animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-} foram semeados em placas de 24 poços e estimulados com LPS (100 ng/mL), sHz (30 μ M) e heme (30 μ M) por 6 horas (gráficos G e I) e 24 horas de incubação (gráficos H e J) a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Seus sobrenadantes foram congelados e armazenados para dosagem de citocinas, que foi feito através de ensaio de imun absorção ligado à enzima (ELISA). Dosagens dos níveis de IL-10 em macrófagos peritoneais (5G e 5H, respectivamente) e em macrófagos diferenciados da medula óssea (5I e 5J). Diferenças significativas, $p < 0,05$ em relação ao respectivo CT (*) e em relação aos macrófagos de animais CD11d^{+/+} que receberam o mesmo estímulo (#). Gráficos são representativos de três experimentos.

5.6. A integrina CD11d influencia o padrão de produção de Prostaglandina E₂ *in vitro*.

Diversos trabalhos têm demonstrado o papel de PGE₂ na regulação da resposta imune na malária, onde o aumento da produção de IL-10 está relacionado com a diminuição dos níveis de PGE₂ no plasma de criança infectadas com *Plasmodium falciparum* (Perkins e cols., 2001; Keller e cols., 2004). Sabe-se também que a produção de PGE₂ regula a produção de TNF- α (Van e cols., 1998). Entretanto, a inibição da produção de PGE₂ através da utilização de antiinflamatórios não esteroidais geram a supressão de diversas funções nos leucócitos (Stevens, 1995). Como citado anteriormente, nossos resultados mostraram uma diminuição nos níveis de TNF- α , e um aumento nos níveis de IL-10 em culturas estimuladas com sHz e heme. Com base nesses resultados decidimos então avaliar a produção do PGE₂ nessas culturas. O gráfico 5.6 demonstra que macrófagos peritoneais de animais CD11d^{+/+} estimulados com sHz e heme produziram quantidades relevantes de PGE₂. No entanto, macrófagos de animais CD11d^{-/-} estimulados com heme também produziram quantidades relevantes de PGE₂, no entanto, essa produção é similar aos níveis basais em macrófagos quando estimulados com sHz.

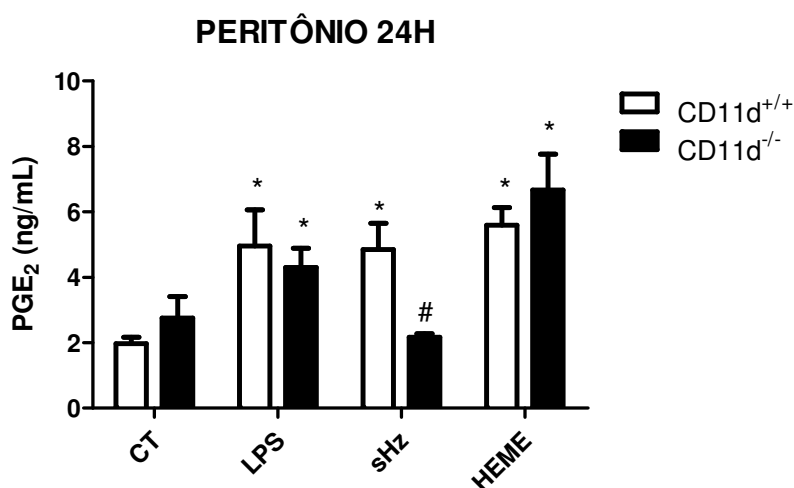


Figura 5.6: Diferenças no perfil de produção de PGE₂ em macrófagos de animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-}. 1x10⁶ macrófagos peritoneais de animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-} foram semeados em placas de 24 poços e estimulados por 24 horas de incubação com LPS (100 ng/mL), sHz (30 μ M) e heme (30 μ M) e seus sobrenadantes foram congelados e armazenados para dosagem de PGE₂ através do ensaio imunoenzimático - EIA. Cada barra representa a média \pm SEM, para poços em triplicata. Diferenças significativas, $p < 0,05$ em relação ao respectivo CT (*) e em relação ao mesmo estímulo CD11d^{+/+} (#).

5.7. A deleção do gene que codifica a integrina CD11d altera a capacidade fagocítica de macrófagos *in vitro*.

Na fisiopatologia da malária, os macrófagos exercem diversas funções extremamente importantes na defesa do hospedeiro, como a fagocitose de hemácias parasitadas para o controle da parasitemia e consequente eliminação dos parasitos, principalmente no baço (Waitumbi e cols, 2000).

Além disso, Basílico e colaboradores (2009) demonstraram que as alterações na expressão de moléculas nas superfícies de hemácias parasitadas e não parasitadas levam à eliminação das mesmas pelo processo de fagocitose relacionando este fenômeno à anemia grave.

Estes dados sugerem que este processo de fagocitose pode ter um efeito deletério em quadros crônicos de malária, principalmente em infecções pelo *Plasmodium falciparum*.

Miyazaki e cols (2008) demonstraram que a integrina CD11d é expressa no baço e tem sua expressão regulada no curso da infecção por PbA. Sua expressão foi demonstrada ser preferencialmente na polpa vermelha, sugerindo que esta proteína pode exercer um papel importante na resposta à infecção sistêmica por patógenos (Van der vieren e cols, 1995; Mebius & Kraal, 2005).

Com base nessas observações decidimos, dessa forma, investigar se macrófagos de animais CD11d^{-/-} teriam alguma alteração na sua capacidade fagocítica em relação aos macrófagos de animais CD11d^{+/+}. A figura 7A mostra através da contagem total de células, que macrófagos CD11d^{-/-} foram capazes de fagocitar um percentual menor de hemácias parasitadas quando comparados a macrófagos CD11d^{+/+}. Além disso, avaliamos o número de hemácias parasitadas fagocitada por macrófago e observamos que um número significativamente menor de PRBCs foram fagocitadas por macrófagos CD11d^{-/-} quando comparados aos macrófagos derivados de animais CD11d^{+/+} (grafico 7B).

Estes dados foram confirmados através de análises por citometria de fluxo, onde os histogramas da figura 7C demonstram que um percentual significativamente menor de hemácias parasitadas com PbA que expressam GFP foram fagocitadas por macrófagos peritoneais de animais CD11d^{-/-} quando comparados com os macrófagos peritoneais de animais CD11d^{+/+}.

Na malária a HZ também é ativamente reconhecida e fagocitada por macrófagos durante o ciclo eritrocítico (Coban e cols, 2005). Avaliamos, então, se a

integrina CD11d exerce influência na fagocitose de sHz. Para isso, células RAW 264.7, macrófagos peritoneais e diferenciados da medula óssea foram estimulados com sHz (30 μ M) por 6 e 24 horas e posteriormente a concentração de sHz, fagocitada pelos macrófagos, foi determinada em espectrofotometria à 400 nm. O gráfico 7E mostra que células da linhagem RAW 264.7 foram capazes de fagocitar sHz de forma tempo dependente. Entretanto, como pode ser observado nos gráficos 7F – 7G não houve diferenças significativas na fagocitose de sHz entre os macrófagos peritoneais e diferenciados da medula óssea de animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-}. Esses resultados sugerem que a integrina CD11d exerce influência na fagocitose de hemácias parasitadas, porém, não exerce influência na fagocitose de sHz.

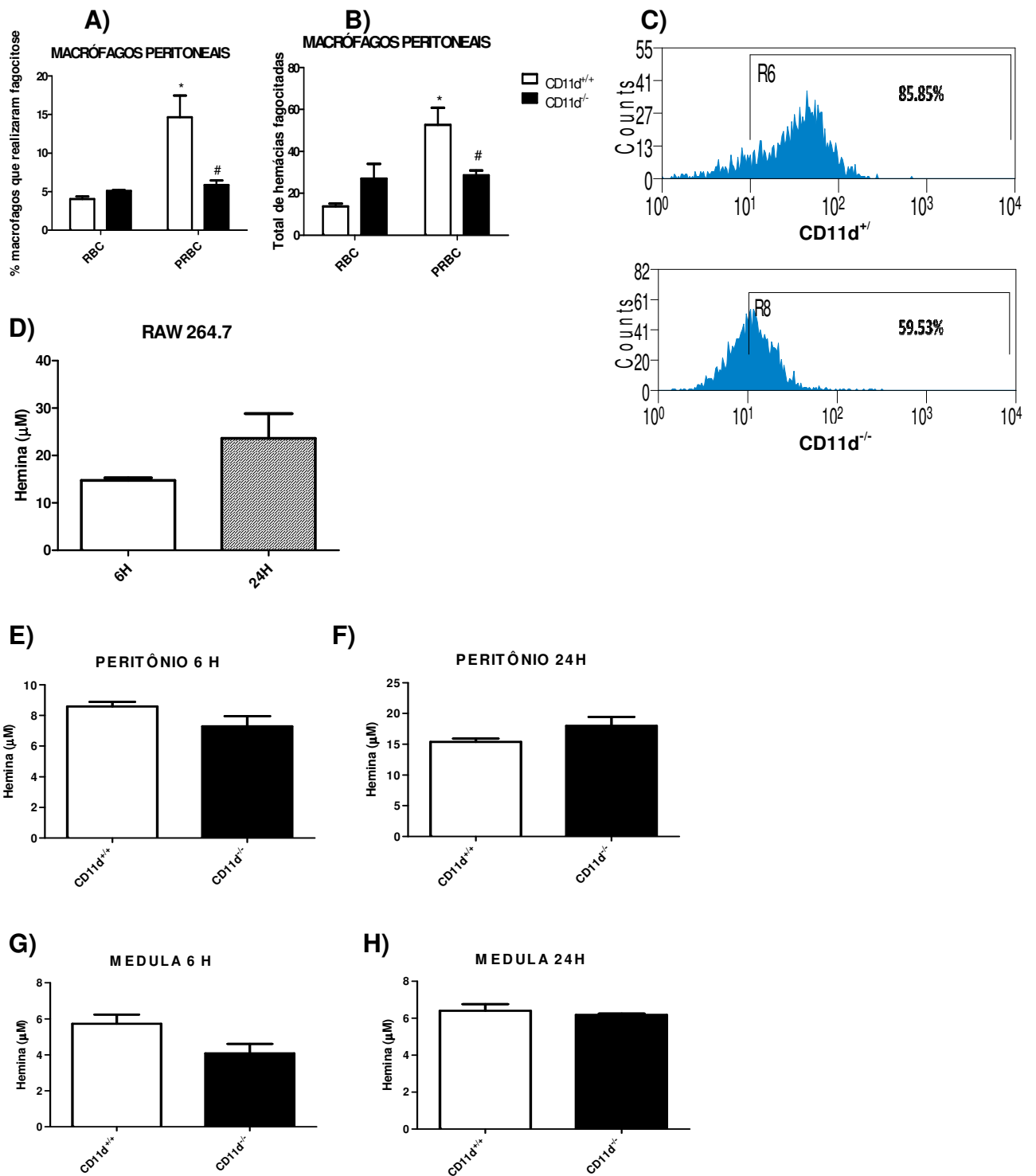


Figura 5.7: A influência da integrina CD11d no processo de fagocitose in vitro. Gráfico 7A mostra a percentual de macrófagos que realizaram fagocitose de hemácias parasitadas, enquanto que o total de hemácias fagocitadas é demonstrado no gráfico 7B. No gráfico 7C, análises por citometria de fluxo utilizando macrófagos infectados com PbA-GFP mostram uma menor intensidade de fluorescência nas células derivadas de animais CD11d^{-/-} em relação aos macrófagos derivados de animais CD11d^{+/+}. Gráficos 7D ao 7H, mostram a fagocitose de sHz em células de linhagem RAW 264.7, macrófagos peritoneais e diferenciados da medula óssea de animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-}. Cada barra representa a média ± SEM, para poços em triplicata. Diferenças significativas, $p < 0,05$ em relação ao CD11d^{+/+}RBC (*) e em relação ao CD11d^{+/+}PRBC (#). Gráficos de fagocitose de PRBCs representando três experimentos. Gráficos de fagocitose de sHz representativos de três experimentos. Histogramas representativos de um experimento.

6. DISCUSSÃO

As integrinas leucocitárias são essenciais para a defesa do hospedeiro na resposta imune-inflamatória à patógenos via a interação célula-célula e célula-matrix extracelular, ambas mediadas pelas interação das integrinas com seus ligantes (van der Heyde, 2006; Kishimoto, 1989; Harris, 2000). Entretanto, a ativação prolongada destes receptores leva a inflamação descontrolada e ao dano tecidual, como exemplificado em lesões de isquemia/reperfusão, enfarto, aterosclerose e algumas doenças auto-imunes (Noti, 2002). Existem várias evidências de que alguns membros da família das integrinas leucocitárias e seus contra-receptores possuem um papel importante na patogênese da malária cerebral (Pichyangkul, 1997; Shimaoka, 2003; van der Vieren, 1995; El-Gabalawy, 1996). Além disto, a hemozoina, um pigmento malárico de heme, parece ser capaz de aumentar a expressão dos membros desta família em fagócitos (Bao e cols., 2005). Diversos estudos já foram realizados para investigar o papel destas integrinas em condições patológicas, a exceção do heterodímero CD11d/CD18, recentemente descrito (Danilenko e cols, 1995; van der Vieren e cols, 1995).

Dentre os diversos tipos de leucócitos, os macrófagos aderidos ao endotélio funcionam como um dos mediadores do processo inflamatório. A ativação exacerbada dessas células provoca danos ao hospedeiro, através de diversas reações adversas como, anemia malárica grave devido à intensa fagocitose de hemácias infectadas e não infectadas (Perkins e cols, 2011), produção exacerbada de mediadores inflamatórios como citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico que causam ativação e danos endoteliais (Stevenson & Riley, 2004; Schofield & Grau, 2005), e infiltrado vascular (Schofield & Grau, 2005).

Outros trabalhos demonstraram que a molécula CD11d é expressa principalmente em macrófagos esplênicos, e que essa expressão aumenta com o desenvolvimento da patogênese da malária causados pelo PbA. Além disso, foi demonstrado sua participação na maior sobrevivência de animais infectados com PbA no modelo de malária experimental, quando comparados aos animais CD11d^{+/+} (Miyazaki e cols., 2008).

O presente trabalho investigou a importância da integrina CD11d no processo de diferenciação de macrófagos, bem como no processo ativação dessas células em resposta a estímulos relacionados a fisiopatologia da malária. Este trabalho sugeriu

que a integrina CD11d participa na modulação da resposta imune do hospedeiro utilizando macrófagos quando estimulados com sHz e heme *in vitro*.

Primeiramente avaliamos o envolvimento da integrina CD11d nos processos de diferenciação e proliferação de macrófagos *in vitro*, assim como sua expressão. Utilizando um modelo de diferenciação de células de medula óssea *in vitro*, observamos que a integrina CD11d tem sua expressão aumentada nos macrófagos ao longo do processo de diferenciação. O aumento da expressão da integrina CD11d em macrófagos diferenciados da medula óssea, ocorreu em células F4/80⁺, um marcador específico de macrófagos murinos. Além disso, percebemos que o percentual de macrófagos F4/80⁺ obtidos de culturas de macrófagos CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-} não foi diferente. Esse conjunto de dados sugere que o processo de diferenciação a partir dos seus progenitores mononucleares, acontece por uma via que não envolve a integrina CD11d no que diz respeito ao marcador F4/80.

Sabe-se que as integrinas leucocitárias são moléculas importantes no processo de proliferação celular, dado este demonstrado através de abordagens experimentais, que mostraram que camundongos deficientes para a subunidade CD18 das integrinas leucocitárias possuem deficiência na proliferação de neutrófilos (Gomez & Doerschuk, 2010). Porém os autores desse trabalho não demonstraram o papel desta família de moléculas no processo de proliferação celular. Observamos que a integrina CD11d especificamente não alterou a capacidade proliferativa desses macrófagos diferenciados da medula óssea *in vitro*, tendo em vista que não houve diferença no número total de células derivadas de animais CD11d^{+/+} quando comparados a animais CD11d^{-/-} contadas no sexto dia de diferenciação, dado este confirmado através do ensaio de proliferação celular por CFSE, e analisados por citometria de fluxo.

Este conjunto de resultados demonstra que a ausência da molécula CD11d não interferiu no percentual de macrófagos positivos para o marcador de diferenciação F4/80 assim como na capacidade proliferativa de macrófagos diferenciados da medula óssea em modelo *in vitro*.

Sabe-se que a infecção pelo *Plasmodium sp.* induz a expressão de diversas moléculas de adesão em leucócitos e células endoteliais através da liberação de seus bioprodutos como a hemozoína (Schofield & Grau, 2005). A liberação de hemozoína, gera um aumento na expressão de moléculas de adesão no endotélio (Basilico e cols., 2009) e plaquetas humanas e murinas (Vieira-de-Abreu e cols.,

2012 e cols, manuscrito em preparação), fenômeno este, que pode contribuir para a instalação de um quadro de malária grave.

Sabendo disso, avaliamos a expressão da integrina CD11d em ensaios *in vitro* utilizando células da linhagem RAW 264.7, onde observamos que estas células ao serem estimuladas com sHz tiveram a expressão da integrina CD11d dinamicamente aumentada (gráfico 5.3 - A), sendo essa expressão mais marcante com seis horas de incubação (gráfico 5.3 - B) ou até mesmo quando estimuladas com concentrações crescentes de sHz. Estes dados sugerem que a integrina CD11d pode ser modulada durante a infecção pelo *Plasmodium sp.* através da liberação de hemozoína na circulação do hospedeiro devido ao rompimento de hemácias parasitadas. Este processo pode ser importante para o estabelecimento e desenvolvimento da patogênese da malária. De acordo com nossos resultados *in vitro*, a sHz induz um aumento na expressão da integrina CD11d, e pode ser capaz de mediar fortemente a adesão de macrófagos ao endotélio dos sítios inflamatórios, prolongando a resposta inflamatória na malária (Yakubenko e cols., 2008).

Estudos anteriores têm mostrado que a malária gera uma resposta imune, através da liberação de diversos mediadores inflamatórios (Day e cols., 1999). Dentre estes diversos mediadores, as espécies reativas de oxigênio (ROS) causam danos nas membranas de monócitos/macrófagos, causando um fenômeno chamado de peroxidação lipídica, que também está envolvida no processo de ativação celular através da indução da ativação da via do NFκB em monócitos/macrófagos (Bowie e cols., 1997; Choi e cols., 2003). Esta via de ativação envolve a translocação deste fator para o núcleo, induzindo a transcrição de diversos genes (Choi e cols., 2003). Além disso, essa ativação celular, causada pela peroxidação lipídica nos monócitos/macrófagos, culmina com a produção de diferentes tipos de citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios, como TNF-α e IL-12 que, por sua vez, ativam as células endoteliais, causando alterações nos níveis de expressão de molécula de adesão nessas células (Leonarduzzi e cols., 2000; Sibmooh e cols., 2004), com o consequente aumento da aderência de hemácias parasitadas neste endotélio (Sibmooh e cols., 2004).

Observamos que células RAW 264.7, produziram grandes quantidades de malondialdeído quando estimuladas com heme (6 e 24 horas) e sHz (24 horas), demonstrando a capacidade oxidante destas moléculas. Macrófagos peritoneais produziram quantidades significantes de malondialdeído quando estimulados com heme, mas não com sHz, nos tempos de 6 e 24 horas de cultura, não havendo

diferenças entre os macrófagos de animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-}. Entretanto, nossos resultados utilizando macrófagos diferenciados da medula óssea demonstram que macrófagos de animais CD11d^{-/-}, produziram níveis de malonaldeído significativamente reduzidos em células estimuladas com sHz e heme com 6 e 24 horas de culturas respectivamente, quando comparado as células de animais CD11d^{+/+}. Estes dados sugerem que a participação da integrina CD11d na peroxidação lipídica é variável de acordo com o tipo de macrófago envolvido.

Apesar dessa diferença na resposta entre os macrófagos peritoneais e diferenciados da medula óssea, nossos resultados sugerem que esta integrina pode estar envolvida no processo de ativação celular de subtipos de macrófagos específicos nos processos inflamatórios da malária (Bowie e cols., 1997). Além disso, nossos dados demonstraram que a deleção funcional da integrina CD11d inibiu parcialmente a ativação celular aqui evidenciado pela produção de MDA em macrófagos, conferindo uma maior resistência aos danos causados pelo excesso de produção de ROS.

Esses dados da produção de MDA, juntamente com nossos dados anteriores demonstram que a sHz induz o aumento da expressão da integrina CD11d, sugerem que esse processo de estresse oxidativo pode ser aumentado na fisiopatologia da malária, uma vez que já foi demonstrado que a HZ é intensamente liberada na circulação ao final do ciclo do plasmódio amplificando essa resposta. Além disso já foi demonstrado que a infecção pelo PbA leva ao aumento da expressão da integrina CD11d em macrófagos esplênicos em modelo experimental murino (Miyazaki e cols., 2008), dados estes que reforçam esta nossa hipótese.

Sabe-se que outro fator importante na fisiopatologia da malária grave é o descontrole do perfil de produção de citocinas anti e pró-inflamatórias, que na resposta imune ao parasito são cruciais para a formação e prolongação de processos inflamatórios exacerbados, causando danos teciduais e dificultando a resolução da infecção (Winkler e cols., 1998; Day e cols., 1999). Citocinas pró-inflamatórias liberadas na circulação ativam as células endoteliais, que aumentam a expressão de diversas moléculas de adesão, produção e liberação de citocinas e quimiocinas, que por sua vez recrutam células do sistema imune para o foco inflamatório.

Devido a essas informações, caracterizamos o potencial de sHz e heme na indução da produção de citocinas em nossos ensaios *in vitro*, através da estimulação de macrófagos com estes bioprodutos. Nossas análises mostram que tanto a sHz

quanto heme foram capazes de induzir a produção de TNF- α em células da linhagem RAW 264.7, corroborando com dados da literatura que sugerem o potencial efeito inflamatório desses subprodutos da malária na indução da resposta inflamatória (Grau e cols., 1986).

Uma vez caracterizada a capacidade de sHz e heme de induzir a produção de citocinas, investigamos se a integrina CD11d participa nos processos de produção e liberação de mediadores inflamatórios em macrófagos *in vitro*. Nossos resultados mostram que macrófagos peritoneais de animais CD11d^{+/+} estimulados com heme, produziram quantidades significativas de TNF- α com 6 e 24 horas de cultura, sendo esta produção significativamente reduzida em macrófagos peritoneais de animais animais CD11d^{-/-} em ambos os tempos. Contudo, quando estas células foram estimuladas com sHz, observamos uma redução na produção desta citocina apenas em culturas com 24 horas de estímulo, sugerindo que a integrina CD11d pode exercer um papel modulador na produção de TNF- α por macrófagos estimulados com sHz.

Nossos resultados, em macrófagos diferenciados da medula óssea, demonstram que heme e sHz foram capazes de induzir a produção de TNF- α em ambos os tempos de cultura, não havendo diferenças na produção desta citocina entre os macrófagos de animais CD11d^{+/+} e CD11d^{+/+} quando estimulados com heme. Entretanto, em culturas estimuladas com sHz com 6 horas de incubação, foi observado uma redução significativa na produção de TNF- α nos macrófagos derivados de animais CD11d^{-/-}. Esses dados sugerem que a ação da integrina CD11d no processo de ativação de macrófagos, a exemplo do que observamos em nossas dosagens de ROS, é um processo dependente tempo e do tipo celular estudado em questão, o que nos sugere que a esta integrina pode modular a resposta imune de forma diferente, de acordo com a localização anatômica destes macrófagos, o tempo de de exposição e a natureza do estímulo.

Além de TNF- α , avaliamos a produção de IL-10 em nossos experimentos. A IL-10 é descrita como uma citocina anti-inflamatória, importante na regulação da resposta imune, além de ser importante na proteção contra a malária cerebral e em casos de coinfeção, uma vez que sua produção controla a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IFN- γ (Niikura e cols, 2010).

Em nossos dados, podemos observar que tanto em cultura de macrófagos peritoneais, quanto em macrófagos diferenciados da medula óssea de animais CD11d^{-/-}, sHz e heme induziram uma produção significativa de IL-10 com 6 horas de

cultura, sendo essa produção significativamente menor em macrófagos peritoneais e diferenciados da medula óssea de animais CD11d^{+/+}. No entanto, não observamos este perfil de resposta inflamatória nos macrófagos peritoneais e diferenciados da medula óssea quando estimulados por 24 horas de cultura, onde observamos que apenas sHz foi capaz de induzir um aumento na produção de IL-10 nas células de animais CD11d^{-/-}, produção essa menor em macrófagos de animais CD11d^{+/+}.

Nossos resultados sugerem que a integrina CD11d pode influenciar a resposta imune do hospedeiro, sendo importante não só no processo de ativação de macrófagos, mas, também, no controle dessa ativação, no que diz respeito ao controle de produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, uma vez que a deleção funcional dessa integrina diminuiu a produção de TNF- α e aumentou a produção de IL-10, sugerindo, assim, que a molécula CD11d possa participar da modulação do perfil de resposta mediada por essas células.

Além disso, diversos dados da literatura também mostram que o aumento da produção de IL-10 está relacionado com a diminuição dos níveis de PGE₂ no plasma de crianças infectadas com *Plasmodium falciparum* (Perkins e cols., 2001; Keller e cols., 2004). Outros grupos demonstram que a produção de PGE₂ regula a produção de diversos mediadores inflamatórios como TNF- α (Van e cols., 1998). Em contrapartida, a inibição da produção de PGE₂ através de antiinflamatórios não esteroidais induz a uma supressão de diversas funções nos leucócitos (Stevens, 1995). Como nossos resultados mostram a queda na produção de TNF- α em macrófagos provenientes de animais CD11d^{-/-}, juntamente com o aumento da produção de IL-10, avaliamos a produção de PGE₂ nessas células. Observamos uma diminuição considerável na produção de PGE₂ em macrófagos estimulados com sHz, o que reforça nossos dados anteriores de dosagens de citocinas, que sugerem que a integrina CD11d possa ter um papel regulador na ativação de macrófagos, bem como no controle do perfil de resposta imune dessas células.

Sabe-se que além uma das funções imunes dos macrófagos é a fagocitose, que é um dos meios pelos quais essas células controlam diversos tipos de infecção e eliminam patógenos através da produção de diferentes moléculas com atividades microbicidas, como ROS, óxido nítrico, etc. (Figueiredo e cols., 2007).

Com base nessas observações e em nossos resultados, decidimos avaliar se integrina CD11d no processo de fagocitose *in vitro*.

Observamos em nossos ensaios, que a deleção da integrina CD11d inibiu significativamente o processo de fagocitose em macrófagos peritoneais incubados

com PRBCs, demonstrado pela significativa queda no percentual de macrófagos que foram capazes de realizar a fagocitose, além da diminuição do total de hemácias parasitadas fagocitadas por macrófagos peritoneais. Como nossos resultados de dosagens de citocinas mostram que a deleção da integrina CD11d reduziu os níveis de TNF- α produzidos e induziu um aumento na produção de IL-10 nos macrófagos analisados, é possível que este perfil anti-inflamatório possa ter interferido na capacidade fagocítica dessas células, tornando esses macrófagos menos ativos no reconhecimento de hemácias parasitadas. Esses dados sugerem que integrina CD11d participa no processo de eliminação de hemácias parasitadas, o que é crucial na fisiopatologia da malária, uma vez que a fagocitose é um fenômeno que contribui para a ativação desses macrófagos.

Como citado anteriormente, sabe-se que os macrófagos ao serem ativados, em decorrência da fagocitose, produzem diversas moléculas como ROS e óxido nítrico que tem por objetivo a eliminação do parasito, e como consequência o controle da parasitemia, porém, na malária, ocorre a produção exacerbada dessas moléculas, que são liberadas na circulação gerando danos ao hospedeiro (Stevenson & Riley, 2004; Schofield & Grau, 2005, Figueireido e cols., 2007). Entretanto, como nossos resultados demonstram que a deleção funcional da integrina CD11d culminou com um decréscimo significativo do processo de fagocitose, é possível que esta molécula também contribua para o controle da resposta imune desses macrófagos, evitando, assim, possíveis danos ao hospedeiro decorrentes do processo de fagocitose.

Além das hemácias parasitadas, os macrófagos são capazes de reconhecer e fagocitar a hemozoína, que é liberada na circulação quando as hemácias se rompem no final do ciclo eritrocítico (Coban e cols., 2005). Avaliamos então o papel da integrina CD11d no processo de fagocitose de sHz, e nossas análises demonstram que não há diferença nas concentrações de sHz fagocitada pelos macrófagos peritoneais de animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-}. Nossos resultados foram confirmados em macrófagos diferenciados da medula óssea, onde observamos que também não houve diferença nas concentrações de sHz fagocitada entre os macrófagos de animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-}.

Estes dados sugerem que a integrina CD11d pode participar em processos de fagocitose, entretanto, como nossos resultados demonstram que a deleção funcional da integrina CD11d não alterou o processo de fagocitose de sHz, o papel da

molécula CD11d no processo de fagocitose pode ser um fenômeno dependente do alvo a ser fagocitado e da via de sinalização fagocítica utilizada.

Sabe-se que a fagocitose de hemácias parasitadas e não parasitadas contribui para o estabelecimento de anemia grave em casos de infecções por *Plasmodium falciparum* (Waitumbi e cols., 2000; Perkins e cols, 2011), além disso, a fagocitose de hemozoína por monócitos e macrófagos, induz a supressão da eritropoiese de forma indireta, pois essas células, ao fagocitarem o pigmento malárico, sofrem uma marcante desregulação na produção de mediadores anti- e pró-inflamatórios, além do descontrole na produção de fatores de crescimento, que influenciam a maturação das hemácias (Perkins e cols, 2011).

Juntamente com esses dados, nossas investigações do papel da integrina CD11d no processo de fagocitose de hemácias parasitadas e de sHz *in vitro*, sugerem que a molécula CD11d possa participar de forma parcial no desenvolvimento do quadro de anemia causada pela infecção pelo *Plasmodium sp.*

Nosso trabalho sugere que a integrina CD11d pode exercer diversas funções na resposta imune mediada por macrófagos como o processo de ativação celular e fagocitose. No conjunto, os dados indicam que esta integrina pode ser um potencial alvo terapêutico para o controle da fisiopatologia da malária, porém diversos estudos ainda são necessários para melhor elucidar as funções desta molécula na malária e em outros tipos de infecções.

7. CONCLUSÕES

A execução deste trabalho demonstrou, de acordo com nossos objetivos, que:

- A expressão da integrina CD11d no curso da diferenciação de macrófagos da medula óssea não influencia este processo, de acordo com a expressão de F4/80, nem interfere na capacidade proliferativa desses macrófagos.
- A integrina CD11d exerce influência no perfil de produção de ROS em macrófagos diferenciados da medula óssea, não havendo essa influência em macrófagos peritoneais sugerindo que esta molécula pode possuir funções distintas em diferentes subtipos de macrófagos.
- A integrina CD11d influencia o perfil de resposta imune dos macrófagos, uma vez que sua deleção alterou o balanço de produção de citocinas pró e anti-inflamatórias e a produção de PGE₂ nos macrófagos avaliados.
- A integrina CD11d pode ser importante no processo de fagocitose de PRBCs, porém não na fagocitose de sHz, sugerindo que esta integrina atua em vias específicas de fagocitose.

8. PESPECTIVAS

- Avaliar a produção de IL-12 e Leucotrieno B₄ em macrófagos peritoneais e diferenciados da medula óssea de animais CD11d^{+/+} e CD11d^{-/-} *in vitro*;
- Avaliar a expressão da integrina CD11d em macrófagos estimulados com heme; e
- Avaliar a expressão das demais leuointegrinas da família CD18 nos macrófagos peritoneais e diferenciados da medula óssea provenientes de animais CD11d^{-/-} *in vitro*;

9. Referências Bibliográficas:

- Abbas AK, Lichtman AJ, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology – 6^a ed. Elsevier. 2008.
- Aft RL, Mueller GC: Hemin-mediated oxidative-degradation of proteins. J Biol Chem 1984. 259:301-305.
- Aft RL, Mueller GC: Hemin-mediated DNA strand scission. J Biol Chem 1983. 258:2069-2072.
- Ammon C, Meyer SP, Schwarzfischer L, Krause SW, Andreesen R, Kreutz M. Comparative analysis of integrin expression on monocyte-derived macrophages and monocyte-derived dendritic cells. Immunology. 2000. 100(3):364-9.
- Ancsin JB, and R Kisilevsky. A binding site for highly sulfated heparan sulfate is identified in the N terminus of the circumsporozoite protein: significance for malarial sporozoite attachment to hepatocytes. J. Biol. Chem. 2004. 279:21824–21832.
- Anthony RM, Urban JF Jr, Alem F, Hamed HA, Rozo CT, Boucher JL, Van Rooijen N, Gause WC.. Memory TH2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. Nature Med. 2006. 12, 955–960.
- Ashford RW, Crewe W. The parasites of *Homo sapiens*. Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool, United Kingdom 1998.
- Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. Annu Rev Immunol. 2009;27:669-92.
- Baldacci P, Menard R. The elusive malaria sporozoite in the mammalian host. Mol. Microbiol. 2004. 54:298–306.

- Baker DA. Malaria gametocytogenesis. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 2010. 172 57–65. Review.
- Bao F, Dekaban GA, Weaver LC. Anti-CD11d antibody treatment reduces free radical formation and cell death in the injured spinal cord of rats. *J Neurochem*. 2005. 94(5):1361-73.
- Bao F, Brown A, Dekaban GA, Omana V, Weaver LC. CD11d integrin blockade reduces the systemic inflammatory response syndrome after spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2011. 231(2):272-83.
- Barrera V, Skorokhod OA, Baci D, Gremo G, Arese P and Schwarzer E. Host fibrinogen stably bound to hemozoin rapidly activates monocytes via TLR-a and CD11b/CD18-integrin: a new paradigm of hemozoin action. *Immunobiology*. 2011. 10-312413.
- Baruch DI. Adhesive receptors on malaria-parasitized red cells. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*. 1999. 12:747-761.
- Basilico N, Parapini S, Sisto F, Omodeo-Sal F, Coghi P, Ravagnani F, Olliaro P, and Taramelli D. The Lipid Moiety of Haemozoin (Malaria Pigment) and *P. falciparum* Parasitised Red Blood Cells Bind Synthetic and Native Endothelin-1. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2009. 0.1155/2010/854927.
- Baum J, Maier AG, Good RT, Simpson KN, Cowman AF. Invasion by *P. falciparum* merozoites suggests a hierarchy of molecular interactions. *PLoS Pathog*. 2005.1(4):e37.
- Becker K, Tilley L, Vennerstrom JL, Roberts D, Rogerson S, Ginsburg H. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int J Parasitol*. 2004 Feb;34(2):163-89.
- Berg MA, Khan R, Baig SM, Gulzar Z, Hussain R, Smego Jr. RA. Cerebral involvement in benign tertian malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2002. 67(3), pp. 230–232.
- Biswas SK & Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. 2010. *Nature Immunol*. 11, 889–896.

- Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res.* 2011. 26(2):229-38.
- Bowie AG, Moynagh PN, O'Neill LA. Lipid peroxidation is involved in the activation of NF-kappaB by tumor necrosis factor but not interleukin-1 in the human endothelial cell line ECV304. Lack of involvement of H₂O₂ in NF-kappaB activation by either cytokine in both primary and transformed endothelial cells. *J Biol Chem.* 1997. 272(41):25941-50.
- Bunting M, Harris ES, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Leukocyte adhesion deficiency syndromes: adhesion and tethering defects involving beta 2 integrins and selectin ligands. *Curr Opin Hematol.* 2002. 9(1):30-5.
- Cailhier JF, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Ko K, Watson S, Savill J, Hughes J, Lang RA. Conditional macrophage ablation demonstrates that resident macrophages initiate acute peritoneal inflammation. *Immunol.* 2005. 174(4):2336-42.
- Chin W, Contacos Pg, Coatney Gr, Kimball Hr. A naturally acquired quotidian-type malaria in man transferable to monkeys. *Science.* 1965. 149(3686):865.
- Choi C, Cho H, Park J, Cho C, Song Y. Suppressive effects of genistein on oxidative stress and NFkappaB activation in RAW 264.7 macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003. 67(9):1916-22.
- Clark IA, Alleva LM, Vissel B. The roles of TNF in brain dysfunction and disease. *Pharmacol Ther.* 2010. 128(3):519-48.
- Coban C, Ishii KJ, Kawai T, Hemmi H, Sato S, Uematsu S, Yamamoto M, Takeuchi O, Itagaki S, Kumar N, Horii T, Akira S. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med.* 2005. 201(1):19-25.
- Coban C, Ishii KJ, Uematsu S, Arisue N, Sato S, Yamamoto M, Kawai T, Takeuchi O, Hisaeda H, Horii T, Akira S. Pathological role of Toll-like receptor signaling in cerebral malaria. *Int Immunol.* 2007. 19(1):67-79.

- Collins WE, Jeffery GM. *Plasmodium ovale*: Parasite and Disease. Clinical Microbiology Reviews. 2005. p. 570–581. Review.
- Collins WE, Jeffery GM. *Plasmodium malariae*: Parasite and Disease. Clinical Microbiology Reviews. 2007. p. 579–592. Review.
- Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. Cell. 2006. 24;124(4):755-66.
- Cox FEG. History of Human Parasitology. Clinical Microbiology. 2002. p. 595–612. Reviews.
- Cox-Singh J, Singh B, Daneshvar C, Planche T, Parker-Williams J, Krishna S. Anti-inflammatory cytokines predominate in acute human *Plasmodium knowlesi* infections. PLoS One. 2011. 6(6):e20541.
- Crozat K, Eidenschenk C, Jaeger BN, Krebs P, Guia S, Beutler B, Vivier E, Ugolini S. Impact of $\beta 2$ integrin deficiency on mouse natural killer cell development and function. Blood. 2011. 117(10):2874-82.
- Danilenko DM, Rossitto PV, Van der Vieren M, Le Trong H, McDonough SP, Affolter VK, Moore PF. A novel canine leukointegrin, alpha d beta 2, is expressed by specific macrophage subpopulations in tissue and a minor CD8+ lymphocyte subpopulation in peripheral blood. J Immunol. 1995 Jul 1;155(1):35-44.
- Day NP, Hien TT, Schollaardt T, Loc PP, Chuong LV, Chau TT, Mai NT, Phu NH, Sinh DX, White NJ, Ho M. The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. J Infect Dis. 1999. 180:1288.
- Déchamps S, Maynadier M, Wein S, Gannoun-Zaki L, Maréchal E, Vial HJ. Rodent and non-rodent malaria parasites differ in their phospholipid metabolic pathways. Journal of Lipid Research, 2009.
- Di Santi MS, Boulos M. Protozoário – malária. Parasitologia humana. Atheneu, 2002. 2. ed. São Paulo: p. 137-150.

Dixon FJ. Comments on immuno-pathology. *Mil. Med.* 1996. 131 (Suppl.): 1233–1234.

Dondorp AM, Ince C, Charunwatthana P, Hanson J, van Kuijen A, Faiz MA, Rahman MR, Hasan M, Bin Yunus E, Ghose A, Ruangveerayut R, Limmathurotsakul D, Mathura K, White NJ, Day NP. Direct in vivo assessment of microcirculatory dysfunction in severe falciparum malaria. *J Infect Dis.* 2008.197(1):79-84.

Dondorp AM, Pongponratn E, White NJ. Reduced microcirculatory flow in severe falciparum malaria: pathophysiology and electron-microscopic pathology. *Acta Tropica.* 2004. 89:309–317.

Duraisingh MT, Maier AG, Triglia T, Cowman AF. Erythrocyte-binding antigen 175 mediates invasion in *Plasmodium falciparum* utilizing sialic acid-dependent and independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003. 100(8):4796-80.

Ejigiri I, Sinnis P. *Plasmodium* Sporozoite-Host Interactions From the Dermis to the Hepatocyte. *Curr Opin Microbiol.* 2009 August ; 12(4): 401–407.

El-gabalawy H, Canvin J, Ma GM, Van der Vieren M, Hoffman P, Gallatin M. Synovial distribution of alpha d/CD18, a novel leukointegrin. Comparison with other integrins and their ligands. *Arthritis Rheum.* 1996. 39:1913-1921.

Eloranta ML & Alm GV. Splenic marginal metallophilic macrophages and marginal zone macrophages are the major interferon- α/β producers in mice upon intravenous challenge with herpes simplex virus. *Scand. J. Immunol.* 1999. 49, 391–394.

Engwerda CR, Mynott TL, Sawhney S, De Souza JB, Bickle QD, Kaye PM. Locally up-regulated lymphotoxin alpha, not systemic tumor necrosis factor alpha, is the principle mediator of murine cerebral malaria. *J Exp Med.* 2002. 195:1371.

Erdman LK, Cosio G, Helmers AJ, Gowda DC, Grinstein S, Kain KC. CD36 and TLR interactions in inflammation and phagocytosis: implications for malaria. *J Immunol.* 2009. 183(10):6452-9.

- Feltri ML, Graus Porta D, Previtali SC, Nodari A, Migliavacca B, Cassetti A, Littlewood-Evans A, Reichardt LF, Messing A, Quattrini A, Mueller U, Wrabetz L. Conditional disruption of beta 1 integrin in Schwann cells impedes interactions with axons. *J Cell Biol.* 2002. 156(1):199-209.
- Ferreira UM, Foronda AS, Schumaker STT. Plasmodium-Malária In: Fundamentos da parasitologia humana. Manole. 2003. São Paulo. p. 5-14.
- Figueiredo RT, Fernandez PL, Mourao-Sa DS, Porto BN, Dutra FF, Alves LS, Oliveira MF, Oliveira PL, Graça-Souza AV, Bozza MT. Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 2007. 282(28):20221-9.
- Geissman F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science.* 2010. 327(5966):656-61.
- Genton B, D'Acremont V, Rare L, Baea K, Reeder JC, Alpers MP, Ller IM. Plasmodium vivax and Mixed Infections Are Associated with Severe Malaria in Children: A Prospective Cohort Study from Papua New Guinea. *PLoS Med.* 2008. 17;5(6):e127.
- Giusti P, Urban BC, Frascaroli G, Albrecht L, Tinti A, Troye-Blomberg M, Varani S. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes and beta-hematin induce partial maturation of human dendritic cells and increase their migratory ability in response to lymphoid chemokines. *Infect Immun.* 2011. 79(7):2727-36.
- Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A. Pro-versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis, a marker of prognosis and future therapeutic options. *J. Infect. Dis.* 2000. 181:176.
- Goldberg DE, Slater AFG, Cerami A and Henderson GB. Hemoglobin degradation in the malaria parasite Plasmodium falciparum: An ordered process in a unique organelle. *Proc. Natl. Acad. USA* 87, 2931–2935.
- Gomez JC and Doerschuk CM. The role of CD18 in the production and release of neutrophils from the bone marrow. *Lab Invest.* 2010. 90(4):599-610.

- Goodman TG, Bajt ML. Identifying the putative metal ion-dependent adhesion site in the beta2 (CD18) subunit required for alphaLbeta2 and alphaMbeta2 ligand interactions. *J Biol Chem.* 1996. 271(39):23729-36.
- Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell.* 2002. 111(7):927-30.
- Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005. 5(12):953-64.
- Gowda DC. (2007) TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs. *Trends Parasitol.* 23, 596–604.
- Grau GE, Mackenzie CD, Carr RA, Redard M, Pizzolato G, Allasia C, Cataldo C, Taylor TE and Molyneux ME. Platelet accumulation in brain microvessels in fatal pediatric cerebral malaria. *J Infect Dis.* 2003. 187:461.
- Grau GE and Kossodo S. Cerebral malaria: mediators, mechanical obstruction or more? *Parasitol Today.* 1994. 10:408.
- Grau GE, Piguet PF, Engers HD, Louis JA, Vassalli P, Lambert PH. L3T4+ T lymphocytes play a major role in the pathogenesis of murine cerebral malaria. *J Immunol.* 1986. 137:2348.
- Grayson MH, Van der Vieren M, Sterbinsky SA, Michael Gallatin W, Hoffman PA, Staunton DE, Bochner BS. alphadbeta2 integrin is expressed on human eosinophils and functions as an alternative ligand for vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). *J Exp Med.* 1998. 188(11):2187-91.
- Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kapp SH, Alonso PL, Collins FH, Duffy PE. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest.* 2008. 118(4):1266-76.
- Grose R, Hutter C, Bloch W, Thorey I, Watt FM, Fässler R, Brakebusch C, Werner S. A crucial role of beta 1 integrins for keratinocyte migration in vitro and during cutaneous wound repair. *Development.* 2002. 129(9):2303-15.

- Griffith JW, Sun T, McIntosh MT, Bucala R. Pure Hemozoin is inflammatory in vivo and activates the NALP3 inflammasome via release of uric acid. *J Immunol.* 2009. 183(8):5208-20.
- Haldar K and Mohandas N. Erythrocyte remodeling by malaria parasites. *Curr Opin Hematol.* 2007. 14(3):203-9.
- Haldar K and Mohandas N. Malaria, erythrocytic infection, and anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009:87-93. Review.
- Hanna S, Etzioni A. Leukocyte adhesion deficiencies. 2012. *Ann N Y Acad Sci.* 10.1111/j.1749-6632.
- Hansen DS and Schofield L. Natural regulatory T cells in malaria: host or parasite allies? *PLoS Pathog.* 2010. 29;6(4). Review.
- Harris ES, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. The leukocyte integrins. *J Biol Chem.* 2000. 4;275(31):23409-12.
- Henaoui MI, Montes C, París SC, García LF. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb).* 2006. 86(1):11-9.
- Holder AA, Blackman MJ, Borre M, Burghaus PA, Chappel JA, Keen JK, Ling IT, Ogun SA, Owen CA, Sinha KA. Malaria parasites and erythrocyte invasion. *Biochem Soc Trans.* 1994;22:291-295.
- Hughes PE, Diaz-Gonzalez F, Leong L, Wu C, McDonald JA, Shattil SJ, Ginsberg MH. Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. *J Biol Chem.* 1996. 271(12):6571-4.
- Hunt NH and Grau GE. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol.* 2003. 24:491.

- Janeway CA, Travers P, Hunt P, Walport M. Immunobiology-The immune system in the health and disease. Garland Publ. 2008.
- Kantele A, Jokiranta TS. Review of cases with the emerging fifth human malaria parasite, *Plasmodium knowlesi*. Clin Infect Dis. 2011. 52(11):1356-62.
- Kappe SH, Kaiser K, Matuschewski K. The *Plasmodium* sporozoite journey: a rite of passage. Trends Parasitol. 2003. 19:135–143.
- Keller CC, Hittner JB, Nti BK, Weinberg JB, Kremsner PG, Perkins DJ. Reduced peripheral PGE2 biosynthesis in *Plasmodium falciparum* malaria occurs through hemozoin-induced suppression of blood mononuclear cell cyclooxygenase-2 gene expression via an interleukin-10-independent mechanism. Mol Med. 2004. 10(1-6):45-54.
- Kelso A. Cytokines: principles and prospects. Immunol Cell Biol. 1998. 76(4):300-17.
- Kishimoto TK, Larson RS, Corbi AL, Dustin ML, Staunton DE, Springer TA. The leukocyte integrins. Adv Immunol. 1989;46:149-82.
- Kraal G. Cells in the marginal zone of the spleen. Int. Rev. Cytol. 1992. 132, 31–74.
- Krauss K, Altevogt P. Integrin leukocyte function associated antigen-1-mediated cell binding can be activated by clustering of membrane rafts. J Biol Chem. 1999. 274(52):36921-7.
- Kucik DF, Dustin ML, Miller JM, Brown EJ. Adhesion-activating phorbol ester increases the mobility of leukocyte integrin LFA-1 in culture lymphocytes. J Clin Invest. 1996. 97(9):2139-44.
- Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas AM, Marsh K. Immunity to malaria: more questions than answers. 2008. Nat Immunol. 2008. Jul;9(7):725-32. Review.
- Lara FA, Lins U, Bechara GH, Oliveira PL: Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*. J Exp Biol 2005. 208:3093-3101.

- Lee JO, Rieu P, Arnaout MA, Liddington R. Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell*. 1995. 80(4):631-8.
- Leonarduzzi G, Arkan MC, Basaga H, Chiarpotto E, Sevanian A, Poli G: Lipid peroxidation products in cell signaling. *Free Radic Biol Med* 2000. 28:1370-1378.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 2007. 7: 678–689.
- Liddiard K, Rosas M, Davies LC, Jones SA, Taylor PR. Macrophage heterogeneity and acute inflammation. *Eur J Immunol.* 2011. 41(9):2503-8.
- Lou J, Lucas R, Grau GE. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clin Microbiol Rev.* 2001. 14(4):810-20.
- Lowell CA, Mayadas TN. Overview: studying integrins in vivo. *Methods Mol Biol.* 2012. 757:369-97.
- Marchiafava E, Bignami A: *On Summer-Autumn Malarial Fevers*. London: New Sydenham Society; 1894.
- Maier AG, Duraisingh MT, Reeder JC, Patel SS, Kazura JW, Zimmerman PA, Cowman AF. Plasmodium falciparum erythrocyte invasion through glycophorin C and selection for Gerbichnegativity in human populations. *Nat Med.* 2003. 9(1):87-92.
- Maier AG, Cooke BM, Cowman AF, Tilley L. Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nat Rev Microbiol.* 2009. 7(5):341-54.
- Malaguarnera L, Pignatelli S, Musumeci M, Simporè J, Musumeci S. Plasma levels of interleukin-18 and interleukin-12 in Plasmodium falciparum malaria. *Parasite Immunol.* 2002 Sep-Oct;24(9-10):489-92.
- Marsh K and Snow RW. Host-parasite interaction and morbidity in malaria endemic areas. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1997. 352(1359):1385-94.

- McDonough SP, Moore PF. Clinical, hematologic, and immunophenotypic characterization of canine large granular lymphocytosis. *Vet Pathol.* 2000. 37(6):637-46.
- McGilvray ID, Serghides L, Kapus A, Rotstein OD, Kain KC. Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance. *Blood.* 2000 Nov 1;96(9):3231-40
- Medana IM, Hunt NH, Chan-Ling T. Early activation of microglia in the pathogenesis of fatal murine malaria. *Glia.* 1997. Feb; 19(2):91-103.
- Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2001. 64(1-2 Suppl):97-106.
- Miyazaki Y, Bunting M, Stafforini DM, Harris ES, McIntyre TM, Prescott SM, Frutuoso VS, Amendoeira FC, de Oliveira Nascimento D, Vieira-de-Abreu A, Weyrich AS, Castro-Faria-Neto HC, Zimmerman GA. Integrin alphaDbeta2 is dynamically expressed by inflamed macrophages and alters the natural history of lethal systemic infections. *J Immunol.* 2008. 180(1):590-600.
- Miyata R, van Eeden SF. The innate and adaptive immune response induced by alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011. 257(2):209-26.
- Mohammadi Z. Endotoxin in endodontic infections: a review. *J Calif Dent Assoc.* 2011. 39(3):152-5, 158-61.
- Morrisette NS, Sibley LD. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol. Mol. Biol.* 2002. Rev. 66:21–38.
- Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008. 8(12):958-69.

- Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* 2011. 11(11):723-37.
- Neves DP. *Parasitologia Humana*. 11^a ed. São Paulo: Atheneu. 2005. 493 p.
- Neniskyte U, Neher JJ, Brown GC. Neuronal death induced by nanomolar amyloid β is mediated by primary phagocytosis of neurons by microglia. *J Biol Chem.* 2011. 286(46):39904-13.
- Niikura M, Kamiya S, Nakane A, Kita K, Kobayashi F. IL-10 plays a crucial role for the protection of experimental cerebral malaria by co-infection with non-lethal malaria parasites. *Int J Parasitol.* 2010. 40(1):101-8.
- Niikura M, Inoue SI, Kobayashi F. Role of Interleukin-10 in malaria: Focusing on coinfection with lethal and nonlethal murine malaria parasites. *J Biomed Biotechnol.* 2011. 2011:383962.
- Noti JD. Expression of the myeloid-specific leukocyte integrin gene CD11d during macrophage foam cell differentiation and exposure to lipoproteins. *Int J Mol Med.* 2002. 10:721.
- Opdal SH, Opstad A, Vege A, Rognum TO. IL-10 gene polymorphisms are associated with infectious cause of sudden infant death. *Hum Immunol.* 2003. 64(12):1183-9.
- Pardi R, Bender JR, Dettori C, Giannazza E, Engleman EG. Heterogeneous distribution and transmembrane signaling properties of lymphocyte function-associated antigen (LFA-1) in human lymphocyte subsets. *J Immunol.* 1989. 143(10):3157-66.
- Perkins DJ, Kremsner PG, Weinberg JB. Inverse relationship of plasma prostaglandin E2 and blood mononuclear cell cyclooxygenase-2 with disease severity in children with *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis.* 2001. 183(1):113-8.
- Perkins DJ, Were T, Davenport GC, Kempaiah P, Hittner JB, Ong'echa JM. Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis. *Int J Biol Sci.* 2011. 7(9):1427-42.

- Pesce JT, Ramalingam TR, Mentink-Kane MM, Wilson MS, El Kasmi KC, Smith AM, Thompson RW, Cheever AW, Murray PJ, Wynn TA.. Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS Pathog.* 2009. 5, e1000371.
- Petruzzelli L, Maduzia L, Springer TA. Differential requirements for LFA-1 binding to ICAM-1 and LFA-1-mediated cell aggregation. *J Immunol.* 160(9):4208-16.
- Pichyangkul S, Saengkrai P, Yongvanitchit K, Heppner DG, Kyle DE, Webster HK. Regulation of leukocyte adhesion molecules CD11b/CD18 and leukocyte adhesion molecule-1 on phagocytic cells activated by malaria pigment. *Am J Trop Med Hyg.* 1997. 57(4):383-8.
- Piguat FP, Laperrousaz C, Vesin C and Donati Y. Incidence of apoptosis in the lymphoid organs of normal or malaria infected mice is decreased in CD18 and urokinase – receptor (UPAR, CD87) deficient mice. *Developmental Immunology.* 2001. 8(3-4) 183-191.
- Planche T, Krishna S. Severe malaria: metabolic complications. *Current Molecular Medicine.* 2006. 6:141–153.
- Ponomarev ED, Veremeyko T, Barteneva N, Krichevsky AM and Weiner HL. MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP- α -PU.1 pathway. *Nature Med.* 2011. 17, 64–70.
- Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. Vivax malaria. neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg.* 2007. 77(6 Suppl): 79–87.
- Ren Y. Peroxisome Proliferator-Activator Receptor γ : A Link between Macrophage CD36 and Inflammation in Malaria Infection. *PPAR Res.* 2012. 640769.
- Rey L. *Parasitologia.* 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008. 883 p.

- Richie TL, Saul A. Progress and challenges for malaria vaccines. *Nature*. 2002. 415(6872):694-701.
- Riley EM, Wahl S, Perkins DJ, Schofield L. Regulating immunity to malaria. *Parasite Immunol*. 2006. 28(1-2):35-49.
- Robbins CS, Swirski FK. The multiple roles of monocyte subsets in steady state and inflammation. *Cell Mol Life Sci*. 2010. 67(16):2685-93.
- Rossetti G, Collinge M, Bender JR, Molteni R, Pardi R. Integrin-dependent regulation of gene expression in leukocytes. *Immunol Rev*. 2002. 186:189-207.
- Rowe JA, Claessens A, Corrigan RA, Arman M. Adhesion of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutics implications. *Expert Rev Mol Med*. 2009. 11:e16.
- Rudin W, Eugster HP, Bordmann G, Bonato J, Muller M, Yamage M, Ryffel B. Resistance to cerebral malaria in tumor necrosis factor-alpha/beta-deficient mice is associated with a reduction of intercellular adhesion molecule-1 up-regulation and T helper type 1 response. *Am J Pathol*. 1997. 150:257.
- Sabja DP and Sarker MR. Interactions between *Clostridium Perfringens* spores and Raw 264.7 macrophages. *Anaerobe*. 2011.
- Sanni LA, Jarra W, Li C, Langhorne J. Cerebral edema and cerebral hemorrhages in interleukin-10-deficient mice infected with *Plasmodium chabaudi*. *Infect Immun*. 2004. 72(5):3054-8.
- Seki E, Schnabl B. Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis: crosstalk between the liver and gut. *J Physiol*. 2012. 590(Pt 3):447-58.
- Senaldi G, Vesin C, Chang R, Grau G and Piguet PF. Role of polymorphonuclear neutrophil leukocytes and their integrin CD11a (LFA-1) in the pathogenesis of severe murine malaria. 1994. *Infection and immunity*. 1144-1149.

- Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocytes-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:421-52.
- Sim BK, Chitnis CE, Wasniowska K, Hadley TJ, Miller LH. Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Science.* 1994. 264(5167):1941-4.
- Sibmooch N, Pipitaporn B, Wilairatana P, Dangdougjai J, Udomsangpetch R, Looareesuwan S, Chantharaksri U: Effect of artemisinin on lipid peroxidation and fluidity of the erythrocyte membrane in malaria. *Biol Pharm Bull.* 2000. 23:1275-1280.
- Sibmooch N, Yamanont P, Krudsood S, Leowattana W, Brittenham G, Looareesuwan S, Udomsangpetch R. Increased fluidity and oxidation of malarial lipoproteins: relation with severity and induction of endothelial expression of adhesion molecules. *Lipids Health Dis.* 2004. 3:15.
- Sindrilaru A, Peters T, Wieschalka S, Baican C, Baican A, Peter H, Hainzl A, Schatz S, Qi Y, Schlecht A, Weiss JM, Wlaschek M, Sunderkötter C, Scharffetter-Kochanek K.. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *J. Clin. Invest.* 2011. 121, 985–997.
- Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol.* 2005. 5(9):722-35.
- Schofield L. Intravascular infiltrates and organ-specific inflammation in malaria pathogenesis. *Nature Immunol Cell Biol.* 2007. 85(2):130-7.
- Schwarzer E, Kuhn H, Valente E & Arese P. Malariaparasitized erythrocytes and hemozoin nonenzymatically generate large amounts of hydroxy fatty acids that inhibit monocyte functions. *Blood* 2003; 101: 722–728.
- Shanley TP, Warner RL, Crouch LD, Dietsch GN, Clark DL, O'Brien MM, Gallatin WM, Ward PA. Requirements for alpha d in IgG immune complex-induced rat lung injury. *J Immunol.* 1998. 160(2):1014-20.

- Shi C, Zhang X, Chen Z, Sulaiman K, Feinberg MW, Ballantyne CM, Jain MK, Simon DI. Integrin engagement regulates monocyte differentiation through the forkhead transcription factor Foxp1. *J Clin Invest*. 2004. 114(3):408-18.
- Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011. 11(11):762-74.
- Shimaoka M, Springer TA. Therapeutic antagonists and conformational regulation of integrin function. *Nat Rev Drug Discov*. 2003. 2(9):703-16.
- Skorokhod OA, Alessio M, Mordmuller B, Arese P & Schwarzer E. Hemozoin (malarial pigment) inhibits differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effect. *J Immunol* 2004. 173: 4066–4074.
- Smith JD, Graig AG. The surface of the *Plasmodium falciparum* – infected erythrocyte. *Curr Issues Mol Biol*. 2005. 7(1):81-93. Review.
- Stevens DL. Could nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) enhance the progression of bacterial infections to toxic shock syndrome? *Clin Infect Dis*. 1995. (4):977-80.
- Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol*. 2004. 4(3):169-80.
- Sullivan DJ. Theories on malarial pigment formation and quinoline action. *Int J Parasitol*. 2002. 32(13):1645-53.
- Suh KN, Kain KC, Keystone JS. Malária. *CMAJ*. 2004. 170(11):1693-702. Review.
- Tarun AS, Baer K, Dumpit RF, Gray S, Lejarcegui N, Frevert U, Kappe SH. Quantitative isolation and in vivo imaging of malaria parasite liver stages. *Int J Parasitol*. 2006. 36(12):1283-93.

- Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, Gordon S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 2005. 23, 901–944.
- Taylor MC, Kelly JM: Iron metabolism in trypanosomatids, and its crucial role in infection. *Parasitology* 2010. 137:899-917.
- Tilley L, Dixon MW, Kirk K. The *Plasmodium falciparum*-infected red blood cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011. 43(6):839-42.
- Toh SQ, Glanfield A, Gobert GN, Jones MK. Heme and blood-feeding parasites: friends or foes? *Parasit Vectors.* 2010 Nov 18;3:108.
- Utagawa A, Bramlett HM, Daniels L, Lotocki G, Dekaban GA, Weaver LC, Dietrich WD. Transient blockage of the CD11d/CD18 integrin reduces contusion volume and macrophage infiltration after traumatic brain in rats. *Brain Res.* 2008. 1207: 155 - 63.
- van der Laan LJ, Döpp EA, Haworth R, Pikkarainen T, Kangas M, Elomaa O, Dijkstra CD, Gordon S, Tryggvason K, Kraal G.. Regulation and functional involvement of macrophage scavenger receptor MARCO in clearance of bacteria in vivo. *J. Immunol.* 1999. 162, 939–947.
- van der Vieren M, Le Trong H, Wood CL, Moore PF, St John T, Staunton DE, Gallatin WM. A novel leukointegrin, alpha d beta 2, binds preferentially to ICAM-3. *Immunity.* 1995. 3(6):683-90.
- van der Heyde HC, Nolan J, Combes V, Gramaglia I, Grau GE. A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends in Parasitology.* 2006. 22:503–508.
- Vaughan AM, Aly ASI and Kappe SHI. Malaria Parasite Pre-Erythrocytic Stage Infection: Gliding and Hiding. *Cell Host & Microbe.* 2008. 08.010.

- Yakubenko VP, Yadav SP, Ugarova TP. Integrin alphaDbeta2, an adhesion receptor up-regulated on macrophage foam cells, exhibits multiligand-binding properties. *Blood*. 2006. 107(4):1643-50.
- Yakubenko VP, Belevych N, Mishchuk D, Schurin A, Lam SC, Ugarova TP. The role of integrin alpha D beta2 (CD11d/CD18) in monocyte/macrophage migration. *Exp Cell Res*. 2008. 314(14):2569-78.
- Yonekawa K, Harlan JM. Targeting leukocyte integrins in human diseases. *J Leukoc Biol*. 2005 Feb;77(2):129-40.
- Waitumbi JN, Opollo MO, Muga RO, Misore AO, Stoute JA. Red cell surface changes and erythrophagocytosis in children with severe *Plasmodium falciparum* anemia. *Blood*. 2000. 15;95(4):1481-6.
- Wassmer SC, Combes V, Candal FJ, Juhan-Vague I, Grau GE. Platelets potentiate brain endothelial alterations induced by *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*, 2006. 74(1): 645-653.
- Williams TN, Maitland K, Phelps L, Bennett S, Peto TE, Viji J, Timothy R, Clegg JB, Weatherall DJ, Bowden DK. *Plasmodium vivax*: a cause of malnutrition in young children. *QJM*. 1997. 90(12):751-7.
- Winkler S, Willheim M, Baier K, Schmid D, Aichelburg A, Graninger W, Kremsner PG. Reciprocal regulation of Th1 and Th2-cytokine-producing T cells during clearance of parasitemia in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun*. 1998. 66:6040.
- WHO - World Health Organization. Malaria. 2009. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/en/>. Acesso em 30 out. 2009.
- WHO - World Health Organization. Malaria. 2010. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/en/>. Acesso em 15 abril de 2011.

- Wong DA, Davis EM, LeBeau M, Springer TA. Cloning and chromosomal localization of a novel gene-encoding a human beta 2-integrin alpha subunit. *Gene*. 1996.171(2): 291-4.
- Wu H, Rodgers JR, Perrard XY, Perrard JL, Prince JE, Abe Y, Davis BK, Dietsch G, Smith CW, Ballantyne CM. Deficiency of CD11b or CD11d results in reduced staphylococcal enterotoxin-induced T cell response and T cell phenotypic changes. *J Immunol*. 2004. 173(1):297-306.
- Zhu J, Wu X, Goel S, Gowda NM, Kumar S, Krishnegowda G, Mishra G, Weinberg R, Li G, Gaestel M, Muta T, Gowda DC. MAPK-activated protein kinase 2 differentially regulates plasmodium falciparum glycosylphosphatidylinositol-induced production of tumor necrosis factor- α and interleukin-12 in macrophages. *J Biol Chem*. 2009 Jun 5;284(23):15750-61.
- Ziegler-Heitbrock L. The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007. 81(3):584-92.