

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Daniela Chaves Renhe

**MALÁRIA GRAVE MURINA: ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E
IMUNOLÓGICA EM TECIDO CEREBRAL E PULMONAR DE
CAMUNDONGOS C57BL/6 IMUNIZADOS COM PARASITOS
VIVOS DE FASE SANGUÍNEA DE *Plasmodium berghei* (CEPAS
ANKA E NK65) E DESAFIADOS COM *Plasmodium berghei*
ANKA**

Juiz de Fora

2015

DANIELA CHAVES RENHE

**MALÁRIA GRAVE MURINA: ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E
IMUNOLÓGICA EM TECIDO CEREBRAL E PULMONAR DE
CAMUNDONGOS C57BL/ IMUNIZADOS COM PARASITOS
VIVOS DE FASE SANGUÍNEA DE *Plasmodium berghei* (CEPAS
ANKA E NK65) E DESAFIADOS COM *Plasmodium berghei*
ANKA**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e DIP, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e DIP.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Kézia Katiani Gorza Scopel

Juiz de Fora

2015

Daniela Chaves Renhe

**MALÁRIA GRAVE MURINA: ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E
IMUNOLÓGICA EM TECIDO CEREBRAL E PULMONAR DE
CAMUNDONGOS C57BL/6 IMUNIZADOS COM PARASITOS
VIVOS DE FASE SANGUÍNEA DE *Plasmodium berghei* (CEPAS
ANKA E NK65) E DESAFIADOS COM *Plasmodium berghei*
ANKA**

Dissertação de Mestrado do Curso
de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Área: Imunologia e DIP,
para obtenção do Título de Mestre
em Ciências Biológicas: Área:
Imunologia e DIP.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Elaine Soares Coimbra- Presidente da Banca

Prof.^a Dr.^a Jacy Gameiro - Examinadora UFJF

Dr. Josué da Costa Lima Junior - Examinador IOC/Fiocruz

Prof.^a Dr.^a Clarice Abramo- Examinadora Suplente UFJF

Prof.^a Dr.^a Claudia Martins Carneiro - Examinadora Suplente UF

Juiz de Fora, 20 de agosto de 2015

Dedico este trabalho à minha família e amigos, sobretudo a minha mãe, que nos ensinou que o conhecimento e o amor são as únicas coisas que permanecem.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter permitido o início e o término dessa etapa.

À Professora Kézia Katiani Gorza Scopel pela orientação, colaboração e paciência para realização desse trabalho.

À professora Cláudia Martins Carneiro pela colaboração no trabalho, sua solicitude, atenção e delicadeza.

Aos Professores Dr.^a Jacy Gameiro, Dr. Josué da Costa Lima Junior, Dr.^a Clarice Abramo e Dr.^a Claudia Martins Carneiro por terem gentilmente aceitado contribuir na concretização deste trabalho e também à Professora Dr.^a Elaine Soares Coimbra por se disponibilizar a presidir a banca examinadora.

À UFJF, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, ao CNPq e à FAPEMIG pela oportunidade e apoio para realização do projeto.

Aos animais, que deram suas vidas para realização deste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica e companheiros de bancada: Bárbara, Vinícius, Tamíres, Jéssica, Camila, Juliana e Érica que sempre demonstraram boa vontade em aprender e ensinar.

À doutoranda Roberta, pela ajuda e presteza em momentos críticos.

Aos colegas do laboratório, que me acolheram com carinho.

À Alyssa e Bárbara, companhias de muitos dias e noites no laboratório, e que, através da amizade, fizeram do trabalho árduo fluir com mais alegria.

Às minhas colegas de especialização e que se tornaram grandes amigas, Laila, Thamara, Thaiana e Rosalline. Mesmo distantes, me apoiaram em momentos de dificuldade.

Às minhas amigas Cíntia e Valesca, pelos instrutivos e tranquilizadores cafés.

Agradeço à minha família, pelo apoio e incentivo.

À minha mãe que nos fez perceber, desde muito cedo, que a única coisa que não podem nos tirar é o conhecimento.

Ao meu pai por ter me proporcionado o acesso aos estudos.

À minha irmã Isabela e sua linda família, pelo apoio e por ter me escutado e me aconselhado tantas vezes.

Ao meu filho Bernardo, pela paciência com a minha ausência, seu carinho e amor.

Ao meu marido Italo, pelo suporte e incentivo constantes, pelo seu grande amor, carinho e compreensão, que tornaram essa jornada um pouco mais leve.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

RESUMO

Dentre as várias estratégias utilizadas com o intuito de induzir imunidade antimalárica está o uso de doses ultra-baixas de parasitos vivos de fase sanguínea dos plasmódios. Contudo, apesar desse método aparentemente induzir imunidade transcendente a cepa e espécie dois pontos precisam ser esclarecidos: 1- nenhum estudo tem avaliado se imunizações com parasitos vivos de baixa virulência são capazes de proteger contra o desenvolvimento de quadros graves da doença incluindo malária cerebral; 2 - considerando que crianças africanas frequentemente apresentam malária grave somente após reexposição a parasitos altamente virulentos, a relação entre o uso de parasitos vivos e o possível desenvolvimento de infecções graves precisa ser investigada. Para esclarecer tais questões, animais C57BL/6 foram imunizados uma ou duas vezes com 10^3 hemácias infectadas por *P. berghei* NK65 ou *P. berghei* ANKA e posteriormente desafiados com 10^5 hemácias parasitadas por *P. berghei* ANKA. Imediatamente após primeira imunização, somente animais imunizados com *P. berghei* NK65 apresentaram níveis positivos de anticorpos IgG, os quais reconheceram tanto o antígeno homólogo quanto heterólogo. Independentemente do protocolo de imunização, animais imunizados uma vez apresentaram, tanto no cérebro quanto nos pulmões, menos áreas com acúmulo de hemácias e infiltrado inflamatório que animais somente desafiados ou imunizados duas vezes. Apesar das imunizações (uma ou duas vezes) com *P. berghei* ANKA e *P. berghei* NK65 terem controlado o desenvolvimento da parasitemia sanguínea por *P. berghei* ANKA, somente animais imunizados com *P. berghei* NK65 permaneceram vivos por até 30 dias após desafio experimental com *P. berghei* ANKA. Tanto no cérebro quanto nos pulmões, os níveis de TNF- α tenderam a elevar-se em relação ao IFN- γ em animais que sofreram dois ciclos de imunizações, o que pode espelhar os maiores danos teciduais observados nesses animais. Contudo, os padrões de citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias observados nesse estudo não explicam a mortalidade ou sobrevivência observada em animais imunizados com *P. berghei* ANKA e *P. berghei* NK65, respectivamente, e desafiados com *P. berghei* ANKA.

Palavras-chave: Imunização, parasitos vivos, *Plasmodium berghei*.

ABSTRACT

The use of ultra-low doses of live blood stage parasites is one of several strategies used to induce anti-malarial immunity. Although this method apparently induces cross-species and strain-transcendent immune response, there are two points that need to be explored: 1) no study has assessed whether immunization with live low virulence parasites is able to protect against the development of severe malaria, including cerebral malaria; 2) African children often develop severe malaria only after re-exposure to highly virulent parasites. Thus, the relationship between the use of live parasites and possible development of serious infections needs to be investigated. To clarify these two points, C57BL/6 mice were immunized once or twice with 10^3 erythrocytes infected with *P. berghei* NK65 or *P. berghei* ANKA, and subsequently challenged with 10^5 *P. berghei* ANKA-parasitized erythrocytes. After the first immunization, only *P. berghei* NK65 immunized animals showed positive levels of IgG antibodies, which recognizes both homologous and heterologous antigen. In animals immunized only once, both brain and lungs exhibited fewer regions with accumulation of red blood cells and inflammation, when compared to control group or twice-immunized animals. Regardless of immunization protocols, all of the mice exhibit controlled development of *P. berghei* ANKA blood parasitemia. However, only *P. berghei* NK65 immunized animals remained alive 30 days after the being challenged with *P. berghei* ANKA. The TNF- α levels, on both brain and lungs, tended to rise in relation to IFN- γ in animals undergoing two cycles of immunizations, which might reflect the higher tissue damage observed in these animals. However, the patterns of pro and anti-inflammatory cytokines present do not explain the observed mortality and survival rate in animals immunized with *P. berghei* ANKA and *P. berghei* NK65, respectively.

Keywords: Immunization, Live parasites, *Plasmodium berghei*.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 Ciclo evolutivo de <i>P. falciparum</i> evidenciando o desenvolvimento dos gametócitos.....	16
Figura 2 Índice de reatividade de anticorpos IgG e suas subclasse IgG1 e IgG2a	42
Figura 3 Fotomicrografias de secções do cérebro e pulmões.	44
Figura 4 Frequência média das parasitemias observadas em animais imunizados com <i>P. berghei</i> ANKA e <i>P. berghei</i> NK65 e desafiados com <i>P. berghei</i> ANKA.....	47
Figura 5 Frequência média das parasitemias observadas em animais imunizados com <i>P. berghei</i> ANKA ou <i>P. berghei</i> NK65 e desafiados com <i>P. berghei</i> ANKA.....	48
Figura 6 Efeito das imunizações com <i>P. berghei</i> ANKA ou <i>P. berghei</i> NK65 na sobrevivência dos animais desafiados com <i>P. berghei</i> ANKA	49
Figura 7 Níveis de citocinas anti-inflamatória e pró-inflamatórias determinadas no cérebro e pulmões de animais imunizados..	50
Figura 8 Peso médio do baço no momento da eutanásia em animais imunizados com <i>P. berghei</i> ANKA ou <i>P. berghei</i> NK65 e desafiados com <i>P. berghei</i> ANKA.....	52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- CSP** Circumsporozoite protein - Proteína circunsporozoíto
- AMA-1** Apical Membrane Antigen – Antígeno 1 da membrana apical
- TRAP** Thrombospondin-related adhesive protein – Proteína adesiva relacionada à trombospondina
- IFN- γ** Interferon gama
- TNF- α** Tumour necrosis factor- Fator de necrose tumoral
- PfEMP 1 e PfEMP2** - *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein – Proteína de membrana do eritrócito associada ao *Plasmodium falciparum*
- PfHRP 1** *Plasmodium falciparum* Histidine-rich protein – Proteína rica em histidina associada ao *Plasmodium falciparum*
- KAHRP** Knob-associated histidine-rich protein - Proteína rica em histidina associada ao knob
- ELAM-1** Endothelial-leukocyte adhesion molecule 1- Moléculadeadesão endotelial do leucócito
- ICAM-1** Intercellular Adhesion Molecule 1 – Molécula de adesão intracelular
- VCAM-1** Vascular cell adhesion molecule 1 – Molécula de adesão de celular vascular
- ROS** Reactive oxygen species - Espécies reativas de oxigênio
- NO** Óxido nítrico
- CD 36** Cluster of Differentiation 36 – Agrupamento de diferenciação 36
- IgG** Imunoglobulina G
- NK** Natural killer
- IL** interleucina
- TGF- β** Transforming growth factor beta - Fator transformador de crescimento beta
- mRNA** Messenger RNA – RNA mensageiro
- APC** Antigen-presenting cell – Célula apresentadora de antígeno
- HLA** Human leukocyte antigen – Antígeno leucocitário humano
- MHC** Major histocompatibility complex – Complexo principal de histocompatibilidade
- CCR** Chemokine receptor- receptor de quimiocina

ADCI Antibody dependent cellular inhibition- Inibição celular dependente de anticorpo

CpG- ODN CpG oligodeoxynucleotides – Oligodeoxinucleotídeo CpG

PBS Tampão fosfato-salino

Sumário

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA.....	13
1.2	O PARASITO E SEU CICLO BIOLÓGICO EM HUMANOS	15
1.3	A MALÁRIA NÃO COMPLICADA E COMPLICADA	18
1.4	RESPOSTA IMUNE À MALÁRIA	21
1.5	VACINAS.....	24
2	JUSTIFICATIVA	28
3	OBJETIVOS	30
3.1	GERAL	30
3.2	ESPECÍFICOS.....	30
4	METODOLOGIA	31
4.1	ANIMAIS	31
4.2	ENSAIOS DE IMUNIZAÇÃO	31
4.2.1	Procedimento de imunização com parasitos vivos	31
4.3	PROCEDIMENTO DE OBTENÇÃO DE EXTRATO PROTEICO BRUTO PARA REALIZAÇÃO DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA).....	33
4.3.1	Detecção de anticorpos igg	34
4.3.2	Detecção de anticorpos das subclasses igg1 e igg2a	35
4.4	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS APÓS O DESAFIO	36
4.4.1	Eutanásia	36
4.4.2	Análise histológica.....	36
4.4.3	Extração de citocinas <i>in loco</i>	38
4.4.4	Curva de parasitemia	39
4.4.5	Curva de mortalidade	39
5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	40
6	RESULTADOS	41

6.1	ANÁLISE DE SOROCONVERSÃO NOS ANIMAIS IMUNIZADOS	41
6.2	ANÁLISE DE LESÕES EM TECIDO CEREBRAL E PULMONAR EM ANIMAIS IMUNIZADOS COM PARASITOS VIVOS: ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA APÓS DESAFIO EXPERIMENTAL COM CEPAS HOMÓLOGAS OU HETERÓLOGAS DE P. BERGHEI.....	43
6.3	EFEITO DAS IMUNIZAÇÕES COM PARASITOS VIVOS NO DESENVOLVIMENTO DE PARASITEMIA SANGUÍNEA.....	45
6.4	MORTALIDADE	49
6.5	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS (TNF-A E IFN - γ) E ANTI-INFLAMATÓRIA (IL-10)	50
6.6	AVALIAÇÃO DO PESO DO BAÇO EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE IMUNIZAÇÕES	52
7	DISCUSSÃO.....	53
7.1	IMUNIZAÇÕES COM PARASITOS VIVOS DE FASE SANGUÍNEA DOS PLASMÓDIOS E INDUÇÃO DE IMUNIDADE ANTIMALÁRICA EM MODELO MURINO.....	53
7.2	PESO DO BAÇO EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE IMUNIZAÇÕES	60
8	CONCLUSÕES.....	62
	REFERÊNCIAS.....	Erro! Indicador não definido.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico e epidemiologia

Os primeiros relatos de sintomas que remetem a malária datam do ano de 2700 a.C. Existem também tabuletas em argila da Mesopotâmia datadas do ano 2000 a.C, papiros egípcios de 1570 a.C e textos hindus provenientes do século VI a.C que apontam para a doença. Além disso, Homero, na Grécia antiga (cerca de 850 a.C), Empédocles de Agrigento (cerca de 550 a.C) e Hipócrates (cerca de 400 a.C) relataram problemas de saúde, incluindo febre e esplenomegalia, em pessoas que viviam em locais pantanosos ajudando, assim, a sedimentar o conceito de que o ar proveniente de áreas alagadas era o responsável pelo desenvolvimento desses sintomas. Assim originou-se o nome Malária, que vem do italiano “mal aire” e significa “ar estragado” (Revisto por COX, 2010).

Somente em 1880, influenciado pelas descobertas de Pasteur e Koch sobre a associação de microrganismos com determinadas doenças, Charles Louis Alphonse Laveran, oficial do exército francês, examinou o sangue fresco de pacientes que apresentavam sintomas febris. Assim, Laveran identificou as diferentes formas do protozoário no interior dos eritrócitos, sugerindo, inclusive, o curso de desenvolvimento intraeritrocítico desses estágios e sua associação aos acessos febris característicos da malária. Laveran foi agraciado em 1907 com o Prêmio Nobel de Medicina por suas descobertas (COX, 2010).

No Brasil, o primeiro relato de sintomas que se referiam à febre terçã e quartã ocorreu entre os índios tupinambás em 1587 e foram documentados pelo colonizador português Gabriel Soares de Souza no “Notícia do Brasil”. Contudo, durante o período colonial não foram encontrados registros de sintomas que pudessem ser associados à malária (DEANE, 1986).

Relatos de sintomatologia relacionados com a malária voltaram a emergir por volta de 1870, quando imigrantes nordestinos, que fugiam da seca e buscavam trabalho na extração de látex, saíram de seus estados em direção a Amazônia. Entre 1907 e 1912, durante a construção da ferrovia Madeira-Mamoré, o estado de Rondônia apresentou uma vasta epidemia de malária, a

qual resultou em um alarmante número de óbitos. Já na região sudeste do Brasil, especificamente no Rio de Janeiro e no estado de São Paulo, em áreas de fazendas que foram abandonadas após a abolição da escravidão também ocorreram novos surtos da infecção na mesma época (DEANE, 1986).

Na atualidade, a malária é consensualmente um problema de saúde mundial com cerca de 226 milhões de casos registrados no ano 2000, seguido de 244 milhões em 2005. Graças a campanhas de controle da doença, em 2007 foram registrados 207 milhões de casos, 15% a menos que em 2005. Desses, 80% ocorreram na região africana, seguidos por 13% de casos ocorridos na Região do Sudeste Asiático e cerca de 9% na Região Oriental Mediterrânea (WHO, 2014).

Considerando dados emitidos pela Organização Mundial de Saúde em 2013, atualmente, 97 países são considerados endêmicos para a malária. A maioria deles se localiza em áreas de clima tropical e subtropical, onde as altas temperaturas e os elevados índices de pluviosidade tornam ideais as condições ambientais para o desenvolvimento dos mosquitos vetores da malária (WHO, 2014).

Em 2013 foram notificados cerca de 198 milhões de casos de malária no mundo, dos quais 584 mil evoluíram para óbito, sendo 90% dessas mortes registradas no continente africano, onde *P. falciparum* é a espécie de plasmódio predominante. Cerca de 78% do número global de mortes nesse ano ocorreram em crianças com menos de 5 anos (WHO, 2014).

No Brasil, a Amazônia Legal, composta pelos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, é responsável por 99% dos casos de malária registrados anualmente (SVS, 2013). São três as espécies de plasmódios que ocorrem no país: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium malariae*. As infecções por *P. vivax* são responsáveis por 85% dos casos notificados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

De maneira geral, existe uma correlação estreita entre a pobreza e a presença da doença nas áreas endêmicas. Preocupantemente, países endêmicos podem ter seu PIB (Produto Interno Bruto) diminuído em 1,3% a cada ano, causando grande impacto no desenvolvimento econômico e social

(SACHS e MALANEY, 2012). Estima-se que na década de 2010-2020 seja necessário empregar globalmente 6,2 bilhões de dólares com a finalidade de controlar a doença (WHO, ROLL BACK MALARIA, 2011).

1.2 O parasito e seu ciclo biológico em humanos

A malária é uma doença causada por protozoários intracelulares, filo Apicomplexa, ordem Haemosporida, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium*. Cerca de 150 espécies podem infectar hospedeiros vertebrados (NCBI TAXONOMY BROWSER, 2014). Atualmente são descritas cinco espécies infectantes para o homem: *P. falciparum*, frequentemente associado à óbitos e, predominante na África; *P. vivax*, mais amplamente disseminada pelo mundo e associado a grande morbidade; *P. malariae*; *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi* (WHO, 2014).

O ciclo de vida dos protozoários do gênero *Plasmodium* (Figura 1), envolve um hospedeiro vertebrado e um inseto vetor. No hospedeiro vertebrado, a infecção se inicia com a picada da fêmea infectada de mosquitos do gênero *Anopheles* infectada. Durante o repasto sanguíneo, esporozoítos saem das suas glândulas salivares e são depositados na derme do hospedeiro; em uma hora cerca de 50% dos esporozoítos deixam a derme invadindo vasos sanguíneos (~70%) e linfáticos (~30%). Os esporozoítos que invadiram os vasos linfáticos são carregados ao linfonodo mais próximo, onde podem se desenvolver o ciclo exoeritrocítico. Contudo, não está claro se esses parasitos podem originar o ciclo sanguíneo da doença (AMINO *et al.*, 2006).

Uma vez no interior dos vasos sanguíneos, os esporozoítos alcançam rapidamente os hepatócitos, e cerca de 30 minutos após a infecção, não são mais detectados na corrente sanguínea (SHIN *et al.*, 1982). O estabelecimento da infecção ocorre após a invasão dos hepatócitos pelos esporozoítos. Acredita-se que essa invasão se deve a sinais moleculares e bioquímicos que direcionam a migração ou preparam o esporozoíto para invasão. Já foi demonstrado, em modelo murino, que as células que expressam altos níveis de proteoglicanos de heparan-sulfato interagem com a proteína circunsporozoíto (CSP), presente em grande quantidade na superfície dos esporozoítos,

ativando o início do processo de invasão. Hepatócitos que expressam menores quantidades dessas moléculas levam à migração dos esporozoítos (COPPI *et al.*, 2005; COPPI *et al.*, 2007).

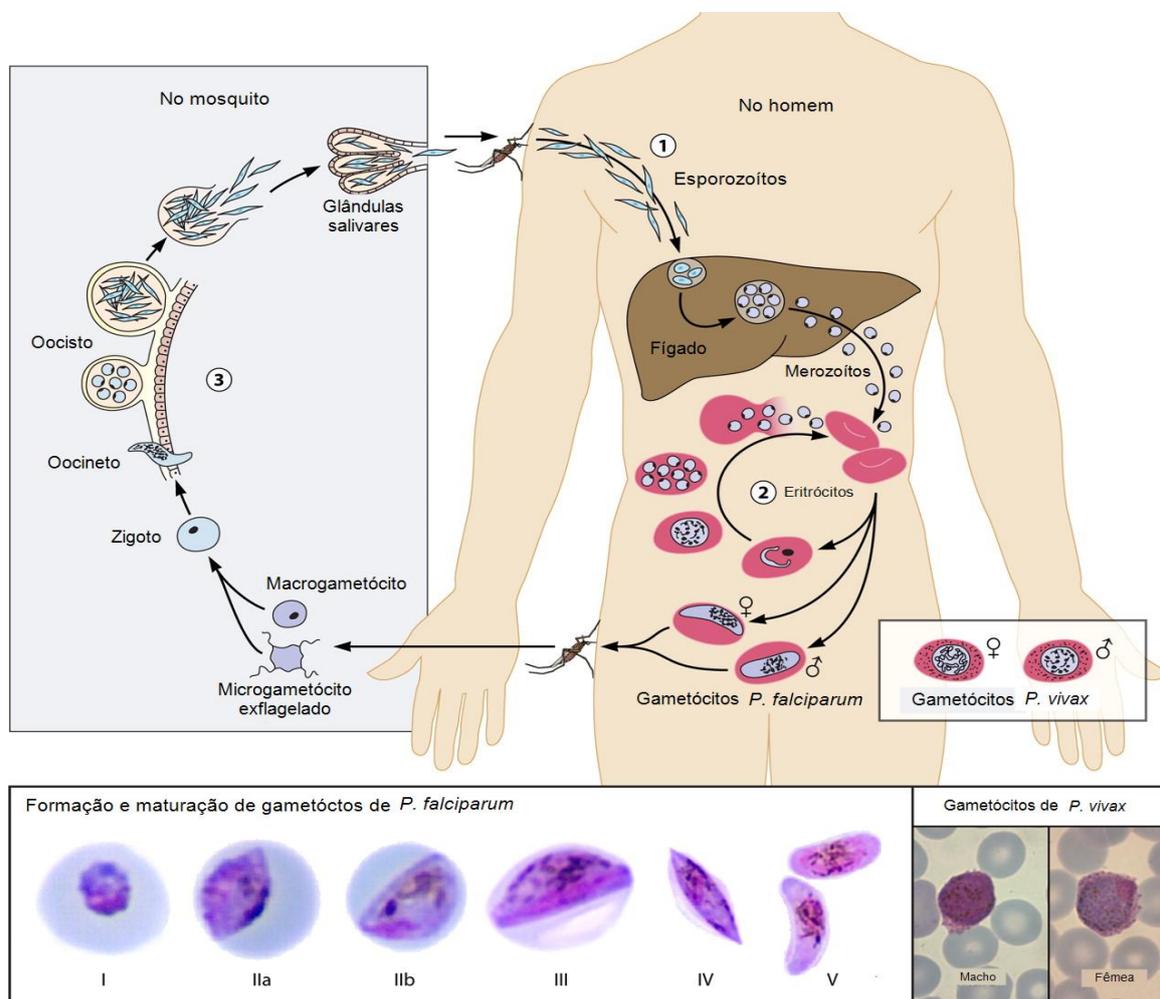


Figura 1- Ciclo evolutivo de *P. falciparum* evidenciando o desenvolvimento dos gametócitos. (Adaptado de BOUSEMA e DRAKELEY, 2011).

Outras moléculas importantes na invasão dos hepatócitos por esporozoítos são o antígeno 1 da membrana apical (AMA-1), que participa da reorientação do parasito, permitindo o contato entre o polo apical e a célula hospedeira (MITCHELL *et al.*, 2004); e a proteína adesiva relacionada a trombospondina (TRAP), presente nos micronemas. TRAP é uma proteína expressa na superfície do parasito, ligando-se aos receptores da célula do hospedeiro, facilitando a invasão (THOMPSON *et al.*, 2004).

Os parasitos permanecem no fígado por cerca de 14 a 16 dias. Durante esse tempo os esporozoítos se diferenciam e sofrem reprodução assexuada

dando origem a esquizontes multinucleados que, por sua vez, darão origem aos merozoítos. Os merozoítos alcançam o interior dos sinusóides hepáticos através da liberação de estruturas denominadas merossomas, para finalmente invadir os eritrócitos (STURM *et al.*, 2006). Para que a invasão ocorra é necessária a interação de moléculas do parasito com ligantes da superfície das hemácias. As etapas de reconhecimento e entrada na célula acontecem em um período de cerca de 60 segundos, o que é favorável para o parasito, uma vez que os antígenos presentes na sua superfície extracelular são alvos para o sistema imune do hospedeiro (COWMAN e CRAB, 2006).

A esquizogonia, etapa de multiplicação assexuada, leva a decomposição progressiva do citoesqueleto e aumento do volume do eritrócito infectado, favorecendo a formação do esquizonte. Durante esse período acontecem modificações na célula e no vacúolo parasitóforo que culminam no rompimento do eritrócito e na liberação de merozoítos, então, prontos para invadir novos eritrócitos (GLUSHAKOVA *et al.*, 2005). Enquanto a fase hepática é silenciosa, a liberação dos merozoítos pelos eritrócitos é responsável pela patogenia da malária, sendo a duração do estágio eritrocítico dependente da espécie de parasito infectante. No caso de infecção por *P. falciparum*, *P. vivax*, e *P. ovale* esse intervalo é de 48 horas. Para *P. malariae*, o ciclo eritrocítico é de 72 horas (COWMAN e CRAB, 2006).

Alguns dos merozoítos, no entanto, se diferenciam em formas sexuadas, femininas ou masculinas denominadas macrogametócitos e microgametócitos, respectivamente. O estímulo responsável pela produção dos gametócitos ainda não é bem compreendido, embora tenham sido propostas pelo menos duas hipóteses que expliquem essa diferenciação. A primeira sugere uma pré-determinação genética que compromete certos merozoítos com a evolução para formas sexuadas ou assexuadas. A outra hipótese propõe que fatores ambientais como os hormônios produzidos pelo hospedeiro, a resposta imune específica e não específica ao protozoário, a utilização de drogas no tratamento da doença, o ambiente intracelular dos eritrócitos determinem a diferenciação de merozoítos em gametócitos (DYER *et al.*, 2000).

Os gametócitos permanecem na corrente sanguínea e quando ingeridos por mosquitos do gênero *Anopheles* iniciarão o ciclo esporogônico. No interior

do estômago do mosquito ocorre a geração de zigotos, que se tornam móveis (ocinetos) e invadem a parede do mesentério, onde se tornam oocistos. Esses oocistos se desenvolvem originando os esporozoítos que, então, migram para as glândulas salivares do inseto, sendo inoculados no homem no momento de um novo repasto (COWMAN e CRAB, 2006) (Figura 1).

1.3 A malária não complicada e a malária complicada

Os diversos sintomas apresentados por indivíduos com malária podem ser explicados por uma série de eventos desencadeados pela presença dos parasitos no organismo (MILLER *et al.*, 2002). Contudo, dependendo do tempo de infecção e da espécie de parasito infectante, os sintomas podem se apresentar de forma branda, caracterizando a malária não complicada, ou grave, dita complicada.

A malária não complicada é caracterizada por febre, fortes dores de cabeça, musculares e articulares, taquicardia, calafrios, vômito, convulsões, dentre outros. Todos esses sintomas são decorrentes do ciclo eritrocítico do parasito e ocorrem no momento da ruptura dos eritrócitos infectados. Especificamente, são desencadeados por antígenos liberados para a corrente sanguínea com conseqüente estímulo de reações bioquímicas e imunológica (BARTOLONI e ZAMMARCHI, 2012).

A malária complicada ou grave, por sua vez, está associada predominantemente às infecções por *P. falciparum* e é caracterizada pelo sequestro/adesão sistêmico de eritrócitos infectados com formas maduras assexuadas do parasito em capilares de pequeno calibre (CLARK e COWDEN, 2003). Embora tal estratégia possa ser interpretada como um mecanismo de evasão imune e, portanto, vantajosa para o parasito, o acúmulo de eritrócitos nos capilares, juntamente com a liberação de metabólitos e conseqüente indução de respostas inflamatórias, comprometem a função de órgãos vitais como cérebro e pulmões (revisto por SCHOFIELD e GRAU, 2005). Contudo, o padrão de desenvolvimento da doença e sua evolução para a forma grave estão diretamente ligados a elementos como: a idade, histórico imunológico e fatores genéticos do hospedeiro (MILLER *et al.*, 2002).

De maneira geral, o agravamento da infecção é a grande causa de morte em crianças de até 5 anos e de gestantes residentes em áreas altamente endêmicas. Embora ainda não bem compreendida, a fisiopatologia da malária grave ou complicada se caracteriza por falência renal, patologia pulmonar, malária cerebral e anemia grave, dentre outros (WHO, 2014).

A insuficiência renal aguda tem como causas a citoaderência, embolia da microcirculação (DONDORP *et al.*, 2008) e isquemia renal. Além dos componentes microembólicos, estão presentes a ativação endotelial, causada pela liberação de citocinas vasoativas que levam a hipovolemia, a redução da viscosidade sanguínea, além de mediadores inflamatórios, leucotrienos e prostaglandinas, liberados pela resposta imune que aumentam a vasoconstrição (BARSOU, 2000).

A disfunção pulmonar apresenta como primeiro sinal o aumento da frequência respiratória, que pode evoluir para a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). A SDRA é caracterizada pela presença de infiltrado pulmonar bilateral e hipoxemia grave ($PaO_2/FiO_2 < 200$ onde, PaO_2 = pressão arterial de oxigênio e FiO_2 = fração inspirada de oxigênio). Em infecções maláricas esse quadro é desencadeado por resposta inflamatória local que causa danos às células epiteliais alveolares e tecido endotelial dos capilares, dificultando ou impedindo o fluxo gasoso ou hipoxemia (LOVEGROVE *et al.*, 2008). Aumento de permeabilidade pulmonar e sequestro do parasito nos capilares participam do processo inflamatório, mas os mecanismos exatos que desencadeiam a síndrome ainda permanecem obscuros (MOHAN *et al.*, 2008).

No cérebro, durante a infecção malárica, a barreira hematoencefálica - que recobre o sistema nervoso central, diminuindo sua reatividade imune e inflamatória - também sofre modificações na sua permeabilidade (ADAMS *et al.*, 2002; PETTY e LO, 2002) graças à ativação endotelial mediada pelo sequestro de eritrócitos parasitados e da resposta inflamatória local (LOU *et al.*, 2001). A adesão dos eritrócitos infectados ao endotélio vascular cerebral ocorre pela interação entre proteínas derivadas do parasito - especialmente as *Proteínas de Membrana do Eritrócito 1 e 2* (PfEMP1 e PfEMP2) - e receptores presentes nas células do hospedeiro, especialmente ICAM-1. Outras proteínas, tais como PfHRP1 e KAHRP (*Proteína de P. falciparum Rica em Histidina e Proteína de*

P. falciparum Rica em Histidina Associadas aos Knobs, respectivamente) também podem mediar a adesão celular. Inicialmente, tais proteínas permanecem na porção interna do eritrócito associadas ao material eletrodense, sendo transportadas de dentro do vacúolo parasitóforo para o citoplasma e finalmente para a porção extracelular por um sistema de vesículas durante o processo de maturação dos parasitos (POUVELLE *et al.*, 1994; FRANCISCHETTI *et al.*, 2008; FINNEY *et al.*, 2010). Sabe-se, no entanto, que a expressão dos receptores presentes nas células endoteliais do hospedeiro varia de acordo com a concentração de certas citocinas como TNF- α , produzida por macrófagos ativados, e interleucinas 1, 6 e 8 (WHITE *et al.*, 2008). Apesar de a malária cerebral ser interpretada como resultante da redução do fluxo sanguíneo causado pela obstrução mecânica dos vasos por eritrócitos infectados levando à hipóxia tecidual (BERENDT *et al.*, 1994), admite-se que uma resposta imune exacerbada, causada por citocinas tais como TNF- α e IFN- γ , também pode causar danos em nível tecidual (CLARK *et al.*, 1994; VAN DER HEYDE *et al.*, 2006).

Outra complicação importante decorrente da infecção malárica é a anemia. O quadro anêmico grave (taxa de hemoglobina <5g/100mL de sangue ou inferior a 15%), quando observado em pacientes infectados, deve-se a um conjunto de eventos que culminam na destruição das hemácias. Entre tais eventos destacam-se os processos de liberação do parasito, o aumento da fagocitose de hemácias parasitadas e sadias e a diminuição da eritropoiese (WEATHERALL *et al.*, 2002; CHANG e STEVENSON, 2004). Efetivamente, a redução da eritropoiese associa-se a elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α , capazes de atuarem diretamente na medula óssea reduzindo sua função (CALIS *et al.*, 2008).

Logo, a evolução da malária não complicada para a forma grave envolve mecanismos distintos e complexos, sendo o diagnóstico e o tratamento rápido fundamentais para o seu controle.

1.4 Resposta imune à malária

A intensidade com a qual os sintomas da malária se manifestam depende de vários fatores, inclusive de seu estado imunológico. Já foi demonstrado que indivíduos residentes em áreas de transmissão estável durante longos períodos de tempo desenvolvem a denominada imunidade clínica; capaz de impedir a manifestação de sintomas clínicos acentuados, embora não proteja quanto à aquisição de novas infecções e nem seja capaz de eliminar completamente os parasitos circulantes (imunidade dita “não esterilizante”). Logo, o avanço da idade e a exposição contínua e ininterrupta do indivíduo aos parasitos mostram-se fundamentais para o desenvolvimento e manutenção de imunidade capaz de controlar a evolução da doença (BEJON *et al.*, 2010). Postula-se que o longo tempo necessário para que indivíduos residentes em áreas de alta transmissão desenvolvam imunidade natural se deva a existência de cepas geneticamente distintas de parasitos circulantes, bem como da intensa variedade de moléculas antigênicas presentes nos diferentes estágios evolutivos observadas em seu ciclo de vida (GUPTA e DAY, 1994). Portanto, fatores associados aos parasitos (tais como elevada variabilidade genética e intenso polimorfismo) e ao hospedeiro (estado gestacional, idade) podem levar ao atraso na aquisição da imunidade incompleta, não esterilizante, por parte do hospedeiro (MACKINNON *et al.*, 2005; SCHERF *et al.*, 2001). Algumas características herdadas geneticamente podem, no entanto, manter o indivíduo naturalmente protegido contra a infecção malárica. Dentre estas, destacam-se a anemia falciforme, talassemia, defeitos na membrana dos eritrócitos (ovalocitoses do Sudoeste Asiático, algumas formas de eliptocitoses) e algumas anormalidades metabólicas (deficiência em glicose-6-fosfato dehidrogenase -G6PD) (MIN-OO e GROS, 2005; HEDRICK, 2011)).

Em linhas gerais, a resposta imune à malária é bastante complexa podendo ser mediada inicialmente por diferentes tipos celulares (a imunidade inata) e, a seguir, por anticorpos (imunidade adaptativa ou adquirida).

A imunidade inata mostra-se fundamental no início da infecção. Estudos realizados em modelo murinos demonstraram, por exemplo, que a capacidade do animal de controlar a parasitemia nos primeiros 7-14 dias após o desafio

está diretamente associada a sua maior chance de sobreviver à infecção. Assume-se, nesse sentido, que os macrófagos são os mais importantes “soldados” no combate aos parasitos uma vez que além de atuarem como células apresentadoras de antígenos, também fagocitam eritrócitos infectados mesmo na ausência de anticorpos específicos, através da interação do receptor de superfície CD36 e a proteína pfEMP-1 (*P. falciparum*- encoded erythrocyte membrane protein 1) (PATEL *et al.*, 2004). Macrófagos ativados atuam na produção de citocinas como IFN- γ e TNF- α . TNF- α , além de atuar como pirogênio endógeno estimulando a febre (KIRUNPETCHARAT *et al.*, 1999) também atua na inibição do desenvolvimento do estágio hepático do parasito, juntamente com o IFN- γ , IL-6 e IL-12, secretadas por macrófagos, linfócitos T ativados, células de Kupffer, células NK e células endoteliais (ARTAVANIS-TSAKONAS *et al.*, 2003).

As células NK, por sua vez, são também importantes na imunidade inata. Após ativadas por IL-12, especialmente, essas células são uma importante fonte de INF- γ , citocina que além de atuar na ativação de macrófagos e de outras células do sistema imunológico induzindo fagocitose também atua diretamente na eliminação dos parasitos pelo processo de ADCI (ARTAVANIS-TSAKONAS *et al.*, 2002). Outros mecanismos de atuação do INF- γ envolvem a indução da produção da enzima óxido nítrico sintetase, que por sua vez desencadeia a produção de óxido nítrico (NO) que, então agirá na eliminação dos esquizontes ou da célula infectada. Os radicais de oxigênio e reativos intermediários de nitrogênio também atuam no sentido de eliminar o parasito (KIRUNPETCHARAT *et al.*, 1999; DOOLAN e HOFFMAN 2000).

Apesar da importância no combate a infecção malárica, IFN- γ , bem como outras citocinas que desempenham papel pró-inflamatório, deve ser induzido e mantido em níveis adequados, proporcionando a eliminação da infecção com o mínimo de dano ao hospedeiro (ARTAVANIS-TSAKONAS e RILEY, 2002). Neste sentido, atuam citocinas classicamente ditas anti-inflamatórias, IL-10 e TGF- β (ARTAVANIS-TSAKONAS e RILEY, 2002; ARTAVANIS-TSAKONAS *et al.*, 2003). Estudos em modelos murinos demonstram que IL-10 e TGF- β são responsáveis pelo controle da

exacerbação da resposta pró-inflamatória e, conseqüentemente, de danos teciduais ocorridos durante o “clearance” parasitário (OMER *et al.*, 2003).

Assim, a resposta imune antimalárica deve se iniciar rapidamente, sendo mediada por citocinas pró-inflamatórias e deve ser suprimida ou controlada pela ação de citocinas anti-inflamatórias na mesma velocidade tão logo o parasito seja erradicado para que não haja nenhum efeito imunopatológico nos sítios de atuação das mesmas (RILEY *et al.*, 2006).

A resposta imune adquirida conta com a participação dos linfócitos T CD8+, que são ativados através da apresentação de antígenos via MHC I, atuando no desenvolvimento da atividade citotóxica sobre os hepatócitos infectados. Uma vez que eritrócitos não expressam MHC I, o papel das células T CD8+ na proteção contra a malária fica restrito a fase pré-eritrocítica (HOFFMAN *et al.*, 1989; DOOLAN e HOFFMAN 2000). Por outro lado, os linfócitos T CD4+ agem tanto na fase hepática, polarizando para o perfil de resposta Th1 (pró-inflamatória) através da secreção de citocinas como IFN- γ e Th2 (anti-inflamatória), quanto no curso da infecção eritrocítica, pelo favorecimento da produção de anticorpos pelos linfócitos B (CLERICI e SHEARER, 1994; SIDDIQUI *et al.*, 2007). Especificamente, os anticorpos da subclasse IgG são os mais relevantes no combate a infecção malárica.

A importância dos anticorpos no combate a infecção malárica foi demonstrada na década de 1960, no qual a transferência passiva de anticorpos IgG totais de adultos infectados para crianças levou a diminuição da parasitemia. Após o esgotamento dos anticorpos a parasitemia voltou a crescer, retornando a níveis baixos após uma nova transferência (COHEN *et al.*, 1961). Anos mais tarde, outro estudo demonstrou que 30 minutos após a picada do mosquito, os esporozoítos que se aproximam dos hepatócitos são opsonizados por anticorpos bloqueadores sendo impedidos de invadirem os hepatócitos. Os parasitos, porém, que escapam da ação dos anticorpos nessa fase invadem os hepatócitos, iniciando o ciclo eritrocítico.

Na fase sanguínea, os anticorpos podem atuar por mecanismos distintos os quais envolvem ligação às células infectadas com conseqüente lise mediada pela ativação do sistema complemento, fagocitose e/ou citotoxicidade celular dependente de anticorpos-ADCC (revisto por PLEBANSKI e HILL, 2000). A

ADCI é um processo que se inicia com a liberação dos merozoítos a partir de hemácias infectadas com posterior opsonização por anticorpos IgG. Anticorpos opsonizadores, ligam-se através de sua porção Fc a receptores Fc expressos na superfície de monócitos, os quais passam a liberar mediadores solúveis que irão inibir a divisão intraeritrocítica de parasitos circundantes (PÉRIGNON e DRUILHE, 1994; BOUHAROUN-TAYOUN *et al.*, 1995). IgG1 e IgG3, classificadas como citofílicas, parecem ser as subclasses mais importantes de imunoglobulinas G no combate a infecção malária uma vez que indivíduos que apresentam níveis reduzidos dessas subclasses parecem serem mais susceptíveis a infecção quando comparados aqueles que apresentam níveis elevados (revisto por GREEN e KRIER, 1978; HILL *et al.*, 2013).

Uma expressiva resposta humoral, direcionada a vários antígenos plasmodiais, geralmente é observada em áreas altamente endêmicas. Isso ocorre devido ao constante estímulo proporcionado por repetidas exposições aos parasitos (WEISS *et al.*, 2010) e está relacionada com a ativação de células B policlonais com consequente produção de anticorpos contra vários antígenos expressos pelo parasito em seus diversos estágios de desenvolvimento. (MAYXAY *et al.*, 2004).

Em síntese, apesar das respostas imunes inata e adaptativa mostrarem-se fundamentais no controle da infecção malária, as vias pelas quais tais respostas são ativadas e controladas são bastante complexas e não totalmente compreendidas.

1.5 Vacinas

O desenvolvimento de imunidade contra a malária é incontestável e existem diversos estudos descrevendo o importante papel dos anticorpos IgG (COHEN *et al.*, 1961; SABCHAREON, 1991) e de citocinas de perfil Th1 na imunidade antiparasitária (revisto por SOUZA, 2014).

Devido ao crescente desenvolvimento de resistência aos antimaláricos e à instabilidade das estratégias de controle da doença, muitos esforços têm sido direcionados ao desenvolvimento de uma vacina antimalárica segura e eficaz.

Nesse contexto, são três os principais pontos de interesse para atuação de uma vacina: 1- vacinas direcionadas à esporozoítos e/ou célula hepática infectada com a finalidade de evitar a infecção e doença, conseqüentemente; 2- vacinas direcionadas a parasitos assexuados de fase sanguínea com o objetivo de evitar ou amenizar os sintomas decorrentes do ciclo eritrocítico; 3- vacinas contra estágios sexuados com a finalidade de evitar a transmissão da doença (GOOD *et al.*, 1998). Contudo, o desenvolvimento de protótipos vacinais contra infecções maláricas é limitado por fatores que podem ser atribuídos tanto ao parasito quanto ao hospedeiro. Em relação a fatores atribuídos ao hospedeiro, existe a dificuldade em gerar memória imunológica que induza imunidade duradoura e esterilizante. Atualmente, admite-se que a forma mais efetiva de se alcançar imunidade duradoura contra a malária para seres humanos é exposição repetida à infecção por *Plasmodium* (NUSSENZWEIG *et al.*, 1967; ; BELNOUE *et al.*, 2004; RÉNIA *et al.*, 2006; BELNOUE *et al.*, 2008; MURHANDARWAT *et al.*, 2008; PINZON-CHARRY e GOOD, 2008; CULLETON *et al.*, 2011; GERALD *et al.*, 2011; SEDER *et al.*, 2013). Contudo, a presença de diversos estágios de desenvolvimento dos plasmódios aliada a variação antigênica que ocorre entre as linhagens de uma mesma espécie de *Plasmodium* leva ao que se define de imunidade estágio e cepa específica. Isso é observado tanto em estudos utilizando modelos experimentais (GOOD *et al.*, 2005; MARTINELLI *et al.*, 2005) quanto em seres humanos (EISEN *et al.*, 2002).

Partindo-se, portanto, da pressuposta ocorrência de imunidade cepa específica, espera-se que a resposta imune seja mais vigorosa quando parasitos homólogos ao imunógeno são utilizados no desafio (CULLETON *et al.*, 2011; TAYLOR *et al.*, 1998). Contudo, ensaios realizados em voluntários humanos demonstram que imunizações realizadas com esporozoítos atenuados de diferentes linhagens *P. falciparum* podem gerar proteção contra parasitos heterólogos (HOFFMAN *et al.*, 2002). Na verdade, existem poucos estudos que avaliam proteção contra cepas heterólogas àquelas utilizadas nos protótipos vacinais, e mesmo esses não geram resultados totalmente conclusivos. Existem indícios de imunidade protetora cruzada (imunidade induzida por determinada cepa de *Plasmodium* parece conferir proteção contra

outra geneticamente distinta), mas muitas lacunas precisam ser melhor compreendidas (SEDEGAH *et al.*, 2007; BELNOUE *et al.*, 2008; PURCELL *et al.*, 2008; INOUE *et al.*, 2012). Na década passada, um ensaio vacinal experimental com doses extremamente baixas de parasitos vivos, injetados por via intravenosa (30 eritrócitos infectados com a cepa 3D7 de *P. falciparum*), foi capaz de induzir imunidade protetora em seres humanos contra o desafio com parasitos homólogos. Apesar da já descrita importância dos anticorpos anti-plasmodiais, essa proteção mostrou-se independente de anticorpos, sendo predominantemente associada à ativação de linfócitos T (CD4+ principalmente e CD8+) e à presença de citocinas (principalmente IFN- γ) (POMBO *et al.*, 2002). Já em modelos experimentais, foi possível demonstrar que a imunidade induzida por doses ultrabaixas de parasitos sanguíneos viáveis também protege os camundongos contra o desafio com cepas heterólogas (ELLIOTT *et al.*, 2005; PINZON-CHARRY *et al.*, 2010). Essa proteção tem sido mediada principalmente por células T CD4+, IFN- γ e óxido nítrico, não havendo participação evidente de anticorpos (PINZON-CHARRY *et al.*, 2010, DA SILVA *et al.*, 2013). Realmente, Grun e colaboradores já na década de 80 demonstraram a ocorrência de imunidade protetora em animais deficientes de células B, inclusive contra cepas heterólogas de parasitos (GRUN *et al.*, 1983). Além dos muitos resultados conflitantes encontrados na literatura no que se refere à imunidade transcendente a cepa, nenhum estudo, tem avaliado se a imunidade induzida por um parasito que não causa malária cerebral poderia proteger contra tal desafio.

Mesmo que a imunidade esterilizante e duradoura ainda não tenha sido alcançada naturalmente e/ou indiretamente por meio de vacinas, estudos sugerem que protótipos vacinais produzidos a partir de parasito completo como fonte de antígeno (RÉNIA *et al.*, 2006), atenuados por radiação (HOFFMAN *et al.*, 2002) ou por modificação genética (MUELLER *et al.*, 2005), levam à proteção clínica contra o agravamento da doença e o desenvolvimento de malária cerebral em modelos murinos (GERALD *et al.*, 2011). Apesar de polêmica, a utilização de parasitos vivos, especialmente quando atenuados, pode ser benéfica, visto a não necessidade da identificação dos epítomos

antigênicos e a mais ampla exposição do sistema imunológico aos antígenos dos parasitos (Revisto por RÉNIA *et al.* , 2006).

Enfim, apesar de não estar totalmente evidente se a ocorrência de imunidade transcendente a cepa é verdadeira, o impacto dessa constatação pode ser de grande importância para o contexto do desenvolvimento de uma vacina efetiva, uma vez que em áreas endêmicas de malária os parasitos tendem a apresentar intensa diversidade genética que se reflete em menor ou maior grau de virulência.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar das dificuldades encontradas no desenvolvimento de uma vacina antimalárica capaz de induzir proteção de longa duração em humanos, existem diversas evidências sugerindo sua viabilidade: (a) pode-se induzir imunidade completa em animais de experimentação e em seres humanos, utilizando-se parasitos de fase hepática atenuados por irradiação, (b) as infecções naturais despertam imunidade incompleta, porém capaz de controlar as manifestações clínicas da doença e reduzir as cargas parasitárias, e (c) a transferência passiva de anticorpos de adultos imunes, seja experimental ou natural (por via transplacentária), protege crianças contra as formas graves da doença.

Vacinas com parasitos vivos, porém atenuados por irradiação ou modificados geneticamente, vêm sendo testadas contra estágios pré-eritrocíticos e sanguíneos dos plasmódios (BELNOUE *et al.*, 2004; GERALD *et al.*, 2011; INOUE *et al.*, 2012). Dentre as vantagens dessas vacinas em relação às recombinantes e de subunidades está a indução de resposta imune direcionada a múltiplos antígenos dos parasitos (GOOD 2011; INOUE *et al.*, 2012). Nesse contexto, estudos desenvolvidos com os plasmódios de roedores têm sido fundamentais para o entendimento de fatores associados à proteção, sobretudo quando há envolvimento de órgãos vitais tais como cérebro e pulmões. No entanto, apesar da vasta literatura relacionada à indução de imunidade em modelos experimentais, nenhum estudo tem averiguado o papel da imunidade heteróloga na proteção contra quadros graves de malária, como malária cerebral. Em sua grande maioria, os estudos são realizados com cepas de parasitos não indutoras de malária cerebral (por exemplo, *P. yoelii*, *P. chabaudi*), sendo a proteção investigada somente em relação à inibição do desenvolvimento do parasito no sangue circulante. Além disso, nada se sabe sobre o impacto dessa imunização em infecções posteriores com parasitos altamente virulentos. Deve-se, no entanto, considerar essa uma questão relevante já que crianças africanas expostas continuamente à malária raramente apresentam acometimento cerebral durante a primeira infecção, o que se torna “comum” em infecções subsequentes (ERUNKULU *et al.*, 1992). Mesmo assim, no contexto do desenvolvimento natural ou de indução de

imunidade, sabe-se que em áreas endêmicas geralmente circulam diferentes espécies e cepas de parasitos com distintos graus de virulência (GUERRA *et al.*, 2006) e que com a globalização a introdução de uma nova espécie/cepa pode alterar a médio prazo o perfil de virulência das cepas preexistentes (MAYXAY *et al.*, 2004). Assim, uma vacina que induza proteção simultânea contra variados estágios evolutivos dos parasitos e contra cepas heterólogas, com diferentes graus de virulência e segura para o hospedeiro torna-se fundamental.

Considerando-se, portanto, a possibilidade de indução de imunidade por meio de injeção intraperitoneal de parasitos de fase sanguínea (PINZON-CHARRY *et al.*, 2010), o objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto de imunizações com parasitos vivos (cepas virulentas e não virulentas de *P. berghei*) no desenvolvimento de malária cerebral e danos pulmonares após o desafio com cepa virulenta de *P. berghei* ANKA bem como a ocorrência de imunidade transcendente a cepa. Para isso, ciclos repetidos de imunização com *P. berghei* NK65 ou *P. berghei* ANKA foram realizados seguindo-se posterior desafio com a cepa ANKA, principal modelo para a indução de malária cerebral em camundongos C57BL/6.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o impacto de imunizações com parasitos vivos (*P. berghei* cepas NK65 e ANKA) no desenvolvimento de malária grave (cerebral e pulmonar) após desafio com *P.berghei* ANKA e a ocorrência de imunidade transcendente a cepa.

3.2 Específicos

- Investigar, com base nos níveis sorológicos de anticorpos IgG totais, IgG1 e IgG2a, a indução de imunidade homóloga e heteróloga após os processos de imunização;
- Investigar se os níveis de anticorpos detectados por ELISA estão associados com número de imunizações;
- Avaliar o efeito das imunizações no desenvolvimento da malária grave com base nas lesões histopatológicas observadas no cérebro e pulmões;
- Determinar a curva de parasitemia e mortalidade nos animais imunizados e controles;
- Avaliar os níveis de IFN- γ , TNF- α e IL-10 no cérebro e pulmões de animais imunizados traçando associação com número de imunizações;
- Estabelecer relação entre níveis de IFN- γ , TNF- α e IL-10 e a presença/intensidade das lesões histopatológicas observadas nos pulmões e cérebro, bem como com a densidade parasitária em cada grupo avaliado.
- Avaliar o efeito das imunizações no tamanho do baço dos animais, em relação ao número de imunizações.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Para esse estudo, foram utilizados camundongos C57BL/6, fêmeas com 6 a 8 semanas de idade, fornecidos pelo Centro de Biologia de Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os animais foram mantidos em gaiolas acondicionadas em estante ventilada, sendo fornecidas água e ração *ad libitum*. O estudo contou com aprovação do Comitê de Ética em Experimentação animal (Protocolos # 053/2011 e #102/2012)

4.2 Ensaios de imunização

4.2.1 Procedimento de imunização com parasitos vivos

4.2.1.1 Animais repique

Amostras criopreservadas de *P. berghei* (cepas ANKA e NK65) foram descongeladas em temperatura ambiente e posteriormente inoculadas via intraperitoneal em camundongos C57/BL6 (200 μ L/animal). A seguir, a parasitemia sanguínea foi monitorada diariamente por meio da análise de esfregaços confeccionados a partir da veia caudal até atingir taxas entre 5 e 15%. Então, os animais foram anestesiados com solução de cloreto de sódio contendo Xilazina 1% e Quetamina 5%, procedendo-se a exsanguinação por meio da veia braquial. Em seguida, o sacrifício foi finalizado por meio de deslocamento cervical. O sangue coletado foi, então, diluído em Tampão fosfato-salino (PBS), seguindo-se centrifugação por duas vezes a 1500 rpm (rotações por minuto) por 5 minutos. Após a retirada do sobrenadante, o sedimento de hemácias foi ressuspensionado em 1 mL de meio RPMI1640 e o número total de hemácias na suspensão foi estimado por meio de contagem em Câmara de Neubauer após diluição de 1000x. Considerando-se o número de células e a parasitemia, uma nova diluição foi realizada de forma a se obter

10^3 hemácias infectadas para cada 100 μ L de meio RPMI1640; volume o qual foi inoculado via intraperitoneal em cada animal experimental.

4.2.1.2 Grupos experimentais e procedimento de imunização.

Para esse estudo foram definidos sete grupos experimentais, cada qual composto por 12 animais agrupados aleatoriamente, conforme descrito no Quadro 1.

Quadro 1 Descrição dos grupos experimentais segundo número e cepas de *P. berghei* utilizadas nos processos de imunização e desafio experimental, respectivamente.

Grupo	Descrição do grupo	1ª imunização	2ª imunização	Parasito utilizado para desafio (10^5 hemácias parasitadas)
1	Controle	Não imunizados		Não desafiados
2	Controle	Não imunizados		Desafio com <i>P.berghei</i> ANKA
3	Desafio homólogo	<i>P.berghei</i> ANKA	X	<i>P.berghei</i> ANKA
4	Desafio homólogo	<i>P.berghei</i> ANKA	<i>P.berghei</i> ANKA	<i>P.berghei</i> ANKA
5	Controle	Não imunizados		<i>P.berghei</i> NK65
6	Desafio heterólogo	<i>P.berghei</i> NK65	X	<i>P.berghei</i> ANKA
7	Desafio heterólogo	<i>P.berghei</i> NK65	<i>P.berghei</i> NK65	<i>P.berghei</i> ANKA

X- sem imunização

As imunizações foram realizadas inoculando-se 10^3 hemácias infectadas com parasitos da cepa *P. berghei* ANKA conforme descrito no item 4.2.1.1. Em camundongos C57BL/6 essa linhagem é altamente virulenta causando malária grave e óbito dentro de sete dias após o desafio. Mesmo procedimento foi realizado com a cepa de *P. berghei* NK65, linhagem de baixa virulência para camundongos C57BL, embora induza anemia grave associada à alta carga parasitária.

Após cada imunização, esfregaços sanguíneos foram confeccionados diariamente a partir do 3º dia, até o aparecimento das primeiras formas sanguíneas dos parasitos. Então, uma dose diária de 25mg/kg de Artesunato + 25mg/kg de Cloridrato de Mefloquina foi oferecida a cada animal, por meio de gavagem durante cinco dias consecutivos visando à cura da infecção. A eficácia do tratamento foi monitorada por meio do exame de esfregaços sanguíneos confeccionados no 10º dia após a finalização do mesmo.

Animais pertencentes aos grupos **3** e **6** foram desafiados 30 dias após a finalização do tratamento com 10^5 hemácias infectadas por via intraperitoneal. Animais pertencentes aos grupos **4** e **7** sofreram novo ciclo de imunização seguindo-se mesmos procedimentos descritos anteriormente e posterior desafio após a finalização do tratamento. Animais pertencentes aos grupos **2** e **5** foram somente desafiados sem qualquer exposição prévia aos parasitos. Antes, porém, de cada desafio, uma alíquota de sangue foi obtida a partir da veia caudal para obtenção de soro para realização da análise da soroconversão.

Para obtenção de soro, o sangue foi centrifugado a 1500 rpm por 20 minutos, seguindo-se coleta do sobrenadante e armazenagem a -20°C até o momento do uso.

4.3 Procedimento de obtenção de extrato proteico bruto para realização do ensaio imunoenzimático (ELISA)

A análise de soroconversão, ou seja, a determinação dos níveis de anticorpos IgG circulantes nos animais imunizados, foi realizada por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). Para tal, extrato proteico total oriundo de parasitos obtidos a partir de sangue de animais foi utilizado como antígeno. Para produção de antígeno de *P. berghei* NK65 utilizou-se animais cuja parasitemia estivesse entre 15-30% e entre 6-8% no caso de *P. berghei* ANKA. Após anestesia (solução de NaCl contendo Xilasina 1% e Quetamina 5%), o sangue, coletado com anticoagulante por punção da veia braquial, foi centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente. O plasma

foi desprezado e as hemácias lavadas usando-se meio RPMI1640 incompleto. Após centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 10 mL de PBS 1X. Para lise dos eritrócitos, foi adicionada à suspensão, 60 µL de saponina a 1%, seguindo-se incubação à temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse tempo, foram acrescentados 10 mL de PBS 1X, seguindo-se centrifugação a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 20 mL de PBS 1X seguindo-se nova centrifugação a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Ao final de duas lavagens, foram acrescentados ao sedimento dois volumes de tampão TEM-Triton X-100 (1 mL de tris-base - 1M - pH8.0); contendo 10 µL dos inibidores de proteases (iodacetamida, Tosilina Clorometil Cetona-TLCK, Fluoreto de Fenilmetilsulfonil-PMSF e aprotinina). Após 15 minutos de incubação em gelo, a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a concentração proteica determinada pelo método de Lowry. O material foi distribuído em criotubos e criopreservado em nitrogênio líquido até o uso.

4.3.1 Detecção de Anticorpos IgG

O ELISA para determinação das taxas de anticorpos IgG totais foi realizado de acordo com o protocolo previamente padronizado no laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Juiz de Fora. Para isso, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 1 µg de antígeno bruto de *P. berghei* NK65 ou *P.berghei* ANKA diluídos 50 µl de solução tampão carbonato, seguindo-se incubação a 4°C por 12 a 16 horas. Então, as placas foram lavadas com PBS+Tween 0,05% e secas em papel absorvente. Em seguida adicionou-se aos poços 150 µl de solução PBS+Tween 0,05% contendo 5% de caseína, seguindo-se incubação por 2h a 37° C. Após 4 lavagens com PBS+Tween 0,05% e secagem em papel absorvente, 50 µl de uma solução de PBS contendo 5% de caseína e amostras de soro na diluição de 1:100 foram adicionados aos poços seguindo-se nova incubação por 1h e 30 min a 37°C.

Ao final desse período, as placas foram lavadas 4 vezes e secas em papel absorvente, seguindo-se adição de 50 µl de solução contendo anticorpo monoclonal conjugado a enzima peroxidase na diluição de 1:2500. Após incubação por 1h a 37°C e lavagem, 50µl por poço de solução de TMB (Becton Dickinson - BD) foram adicionados às placas seguindo-se nova incubação por 10 min em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A reação enzimática foi interrompida utilizando-se 30 µl/poço de solução de ácido sulfúrico (1:20). A densidade ótica (DO) foi determinada em um leitor de placas de ELISA (Costar) em comprimento de onda de 450 nm (DO 450). Para determinação do *cut-off* foram utilizados soros de seis animais nunca expostos aos parasitos da malária, sendo o valor do mesmo definido como média das absorbâncias acrescidas de três desvios padrões.

4.3.2 Detecção de Anticorpos das subclasses IgG1 e IgG2a

O ELISA para determinação das taxas de anticorpos IgG totais foi realizado de acordo com o protocolo previamente padronizado no laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Juiz de Fora. Para isso, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 1µg de antígeno bruto de *P. berghei* NK65 ou *P.berghei* ANKA diluídos 50 ul de solução tampão carbonato, seguindo-se incubação a 4°C por 12 a 16 horas. Então, as placas foram lavadas com PBS+Tween 0,05% e seca em papel absorvente. Em seguida adicionou-se aos poços 150 ul de solução PBS+Tween 0,05% contendo 5% de caseína, seguindo-se incubação por 2h a 37° C. Após 4 lavagens com PBS+Tween 0,05% e secagem em papel absorvente, 50 µl de uma solução de PBS contendo 5% de caseína e amostras de soro na diluição de 1:100 foram adicionados aos poços seguindo-se nova incubação por a 4º por 12 a 16 horas. Ao final desse período, as placas foram lavadas 4 vezes e seca em papel absorvente, seguindo-se adição de 50ul de anticorpo anti-IgG1 ou anti-IgG2a biotilado (1:8000) e incubação por 1h em temperatura ambiente no escuro. Após incubação por 1h a 37°C e lavagem, 50µl por poço de solução de TMB (Becton Dickinson - BD) foram adicionados às placas seguindo-se nova

incubação por 10 min em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A reação enzimática foi interrompida utilizando-se 50 µl/poço de solução de ácido sulfúrico a 2N. A densidade ótica (DO) foi determinada em um leitor de placas de ELISA (Costar) em comprimento de onda de 492nm (DO 492). Para determinação do *cut-off* foram utilizados soros de seis animais nunca expostos aos parasitos da malária, sendo o valor do mesmo definido como média das absorbâncias acrescidas de três desvios padrões.

Os resultados foram expressos como índice de reatividade (IR), tanto Para IgG quanto para as subclasses analisadas. Esses valores foram determinados pela razão: médias das absorbâncias/ valor de *cutoff* previamente obtido. A soroconversão foi considerada positiva quando o IR apresentou valor maior ou igual a 1.

4.4 Procedimentos experimentais após o desafio

4.4.1 Eutanásia

Cinco dias após o desafio, sete animais de cada grupo foram escolhidos aleatoriamente e eutanasiados. Os animais foram anestesiados com solução de Xilazina 1% e Quetamina 5%, procedendo-se a perfusão cardíaca com PBS. A seguir, foram removidos cérebro e pulmões, sendo uma fração desses órgãos fixada em paraformaldeído 4% para posterior desidratação, diafanização, inclusão e análise histológica. A outra fração foi armazenada em soro fetal bovino em freezer -80°C para posterior extração e análise dos níveis de IL-10 e TNF-α por ELISA. O baço foi pesado em balança de precisão para correlação entre o volume do órgão e o tipo e número de imunizações.

4.4.2 Análise histológica

Para avaliar o impacto das imunizações no desenvolvimento de malária cerebral e pulmonar após desafio com *P. berghei* ANKA, foram feitos cortes histológicos a partir dos órgãos de cada animal. Tanto no cérebro quanto nos pulmões foram avaliados a ocorrência de adesão endotelial de hemácias

parasitadas e de processo inflamatório (extravasamento de hemácia, infiltração linfocitária). Para isso, uma fração dos órgãos coletados foram fixados em solução de paraformaldeído a 4%, pH 7.2-7.4 por 24 h e posteriormente transferidos para uma solução álcool 70%. Então, os tecidos fixados foram acondicionados em cassetes histológicos e desidratados pela imersão em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90%, absoluto e 50% álcool/50% xilol), por 30 minutos em cada solução. A diafanização foi feita através da utilização de duas imersões em xilol por 20 minutos cada. Finalmente, os órgãos foram impregnados e incluídos em parafina. Os blocos foram submetidos à microtomia e as lâminas foram submetidas à coloração com Hematoxilina-Eosina.

4.4.2.1 Coloração de Hematoxilina-eosina

A coloração de rotina Hematoxilina-Eosina foi realizada em lâminas com cortes do tecido cerebral e pulmonar para uma observação geral das alterações histopatológicas. O processo de coloração foi iniciado com a imersão das lâminas em 3 banhos de xilol, de duração de 10 minutos (primeiro banho) e 5 minutos (segundo e terceiro banhos), para desparafinização. Em seguida, para hidratação dos tecidos, as lâminas foram imersas em banhos subseqüente, de 1-3 minutos cada, em solução de álcool absoluto, álcool 95%, álcool 80%, álcool 70%, e água por 5 minutos e em água destilada por mais 5 minutos. Então os cortes foram submersos em corante Hematoxilina (corante ácido) por 2 minutos, seguindo-se lavagem em água corrente por 5 minutos. Seguindo-se nova imersão em corante Eosina (corante básico), por 30 segundos a 2 minutos e lavagem em água corrente por 1 minuto. Finalmente, as lâminas foram imersas em quatro banhos de álcool (70%, 80%, 95% e 100%) por 1 minuto em cada concentração e depois em três banhos de Xilol por 2 minutos cada. Seguindo-se montagem da lâmina com lamínula e Enthelan. A análise das mesmas foi realizada utilizando-se objetiva de 40x.

4.4.3 Extração de citocinas *in loco*

Para a extração de citocinas foram preparados 100ml de solução de extração, contendo: NaCl 0,4M; tween 20 0,05%; albumina de soro bovino 0,5%; fluoreto de fenilmetilsufonila (PMSF) 0,1 mM; cloreto de benzetônio 0,1mM; EDTA 10 mM; 0,002% de aprotinina e água ultra pura ou destilada para completar 100ml. Para cada 100mg de tecido foram utilizados 1mL do tampão de extração, seguindo-se homogeneização e centrifugação a 10 000 rpm por 1 minutos a 4°C. O sobrenadante oriundo da centrifugação foi armazenado em freezer -80°C para posterior análise pelo método de ELISA. No momento do uso, as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos para coleta do sobrenadante.

4.4.3.1 Detecção dos níveis de citocinas *in loco*

Ensaio de ELISA para determinação *in loco* dos níveis de IFN- γ , TNF- α e IL-10 foram realizados de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (eBioscience, Inc.). Para tal, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 μ l/poço de tampão de revestimento contendo os anticorpos de captura de cada citocina de interesse (IL-10- 1:1000; TNF- α - 1:250; IFN- γ -1:250) seguindo-se incubação a 4°C por 18 horas. Então, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem, secas em papel absorvente, bloqueadas com 200 μ l/poço de solução diluente e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Para determinar a concentração em pg/mL de cada citocina presente no homogenato, curvas padrões foram incluídas em cada placa nas diluições recomendadas pelo fabricante. As amostras foram, então, adicionadas às placas em duplicata (100 μ l/poço), seguindo-se incubação a 4°C por 18 horas. Após esse período, as placas foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem e secas em papel absorvente. Então, 100 μ l de solução de solução diluente contendo os anticorpos de detecção foram adicionados a cada poço seguindo-se incubação por 1 hora a temperatura ambiente. Após lavagem por 5 vezes com tampão de lavagem, 100 μ l de Avidin-HRP diluída em solução

diluíte foram acrescentados a cada poço, seguindo-se nova incubação por 30 minutos. Finalmente, após lavagem das placas (5 – 7 vezes) foram adicionados 100 µl de solução substrato em cada poço, seguindo-se incubação por 15 minutos à temperatura ambiente. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µl de solução de parada em cada poço. A densidade ótica (DO) foi determinada em um leitor de placas de ELISA em comprimento de onda de 450 nm (DO 450).

4.4.4 Curva de parasitemia

Para avaliar o efeito das imunizações no desenvolvimento parasitário (seja desafio homólogo ou heterólogo), esfregaços sanguíneos foram confeccionados diariamente do 5º ao 10º dia após o desafio e em dias alternados até o 30º dia do desafio nos animais não eutanasiados. Para tal, uma gota de sangue foi coletada a partir da veia caudal, seguindo-se esfregaço sanguíneo, fixação com metanol e coloração pelo método de Giemsa. Os níveis de parasitemia foram definidos pela porcentagem do número de hemácias parasitas em um total de 1000 hemácias avaliadas.

4.4.5 Curva de mortalidade

Para avaliar a eficácia das imunizações na sobrevivência dos animais, aqueles remanescentes da eutanásia foram observados diariamente até o 30º dia após desafio, verificando-se a presença de sinais clínicos pertinentes à malária grave e delineamento da curva de mortalidade.

5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para análise entre os grupos foi utilizado o software GraphPad Prism (Versão 5.0). Foi utilizado o teste de ANOVA 1-via, seguindo-se pós-teste de Tukey nas comparações múltiplas (baço, citocinas, parasitemia), pós-teste de Dunn na análise dos índices de reatividade (anticorpos) e teste χ^2 para análise da sobrevivência dos animais. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativo.

6 RESULTADOS

6.1 Análise de soroconversão nos animais imunizados

O primeiro objetivo desse estudo foi avaliar se imunizações com parasitos vivos são capazes de induzir níveis elevados de anticorpos IgG antígenos específicos em animais C57BL/6. Além disso, objetivou-se investigar a ocorrência de reatividade cruzada entre cepas, ou seja, se anticorpos produzidos em resposta a uma determinada cepa de parasito são capazes de reconhecer antígeno derivado de outra que apresenta distinto grau de virulência, e a associação entre número de imunizações e níveis de anticorpos. Os resultados são apresentados na Figura 2.

Conforme esperado, soros de animais controles (não imunizados ou somente desafiados com *P. berghei* ANKA ou *P. berghei* NK65) não apresentaram níveis detectáveis de IgG total e subclasses contra nenhum dos antígenos aos quais foram expostos (Figura 2 - A, B, C, D). Em especial, observa-se com base nos grupos somente desafiados que a soroconversão é um processo que não ocorre imediatamente após exposição aos parasitos, sejam homólogos ou heterólogos àqueles a que foram expostos previamente (Figura 2 - A e C).

Por outro lado, observa-se que animais imunizados e desafiados com *P. berghei* ANKA (aqui classificada como desafio homólogo) são capazes de apresentar altos títulos de anticorpos IgG total (IR>20), contudo, somente após repetida exposição ao imunógeno (Figura 2 - A e B). Além disso, anticorpos IgG total produzidos por animais imunizados e desafiados com *P. berghei* ANKA são capazes de reconhecer antígeno de *P. berghei* NK65 na mesma intensidade observada para o antígeno homólogo (Figura 2 - A e B).

A análise do perfil de reconhecimento imune dos antígenos de *P. berghei* ANKA e *P. berghei* NK65 no soro de animais imunizados com *P. berghei* NK65 e desafiados com *P. berghei* ANKA (classificada aqui como desafio heterólogo) mostra-se distinto daquele observado em desafio homólogo (Figura 2 - C e D versus A e B, respectivamente). Neste contexto, animais imunizados com *P. berghei* NK65 são capazes de soroconverter já no decorrer

do primeiro ciclo de imunização, mostrando níveis elevados de anticorpos IgG total (IR>15). Porém, após uma nova imunização, os níveis desses anticorpos no soro mostram-se ligeiramente estáveis ($p>0,05$) independentemente do antígeno ao qual está sendo exposto (Figura 2 - C e D).

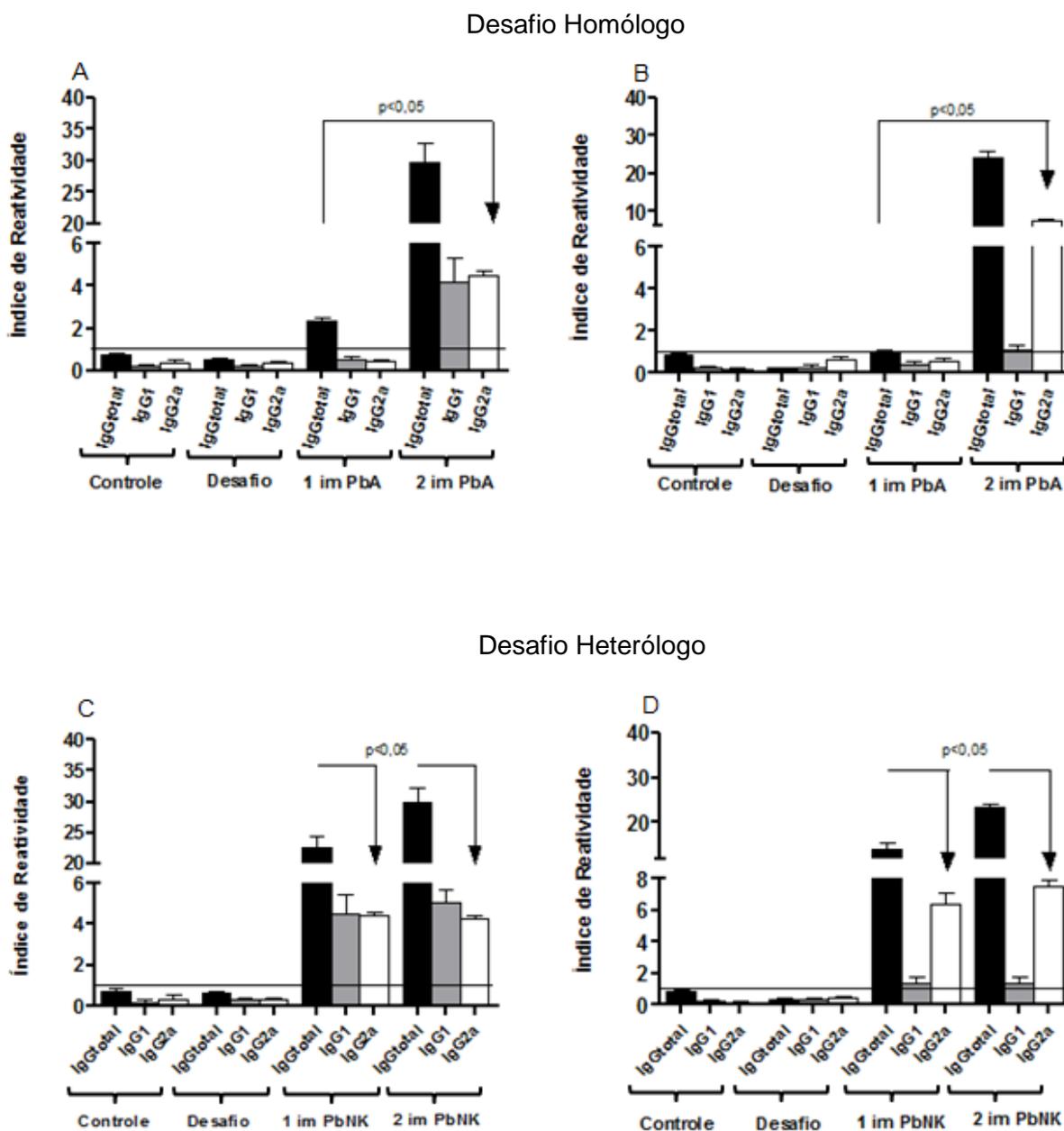


Figura 2 Índice de reatividade de anticorpos IgG e suas subclasse IgG1 e IgG2a

Em A e B, imunizações realizadas com *P. berghei* ANKA e desafio homólogo. C e D, grupos que sofreram imunizações com *P.berghei* NK65 e desafiados com *P. berghei* ANKA (heterólogo). Em A e C, sensibilização das placas de ELISA com antígeno bruto de *P. berghei* ANKA. B e D, placas sensibilizadas com antígeno bruto de *P. berghei* NK65.

Controle = sem tratamento; NI = designa os grupos que foram somente desafiados pelas linhagens indicadas; 1 im= 1 imunização; 2 im= 2 imunizações; PbA= *Plasmodium berghei* ANKA; PbNK= *Plasmodium berghei* NK65.

Em relação a IgG1 e IgG2a, considerados citofílicos em modelo experimental, observam-se distintos padrões de reconhecimento antigênico. Da mesma forma como observado para IgG total, soro de animais imunizados com *P. berghei* ANKA quando expostos a antígeno homólogo ou heterólogo apresentam níveis positivos ($IR > 1$) para ambas as subclasses somente nos grupos experimentais que sofreram duas imunizações (Figura 2- A e B). Contudo, enquanto o antígeno ANKA é reconhecido por IgG1 e IgG2a de forma equivalente (Figura 2 – A; $p > 0,05$), o antígeno NK65 é reconhecido predominantemente por anticorpos da subclasse IgG2a (Figura 2 – B; $p < 0,05$). Por outro lado, animais imunizados com *P. berghei* NK65 são capazes de reconhecer o antígeno ANKA após primeiro ciclo de imunizações, não havendo diferença nos níveis de anticorpos IgG1 ou IgG2a (Figura 2 – C; $p > 0,05$). O antígeno homólogo (NK65), no entanto, é reconhecido predominantemente por anticorpos da subclasse IgG2a (Figura 2 – D; $p < 0,05$).

6.2 Análise de lesões em tecido cerebral e pulmonar em animais imunizados com parasitos vivos: análise histopatológica após desafio experimental com cepas homólogas ou heterólogas de *P. berghei*

Após análise da soroconversão em todos os grupos experimentais, foi investigado o efeito das imunizações no desenvolvimento da malária grave causada por *P. berghei* ANKA com base na ocorrência de lesões histopatológicas no cérebro e pulmões. Devido a alta mortalidade observada entre o 6º e o 7º dia em animais infectados com essa cepa de *Plasmodium*, sete camundongos, escolhidos aleatoriamente a partir de cada grupo experimental foram eutanasiados no 5º dia após desafio, sendo cérebro e pulmões processados para a confecção de cortes histológico. Os cortes, corados com Hematoxilina-Eosina, foram analisados no Laboratório de Patologia da Universidade Federal de Ouro Preto, usando-se microscópio óptico em aumento de 400x. Os resultados podem ser observados na Figura 3.

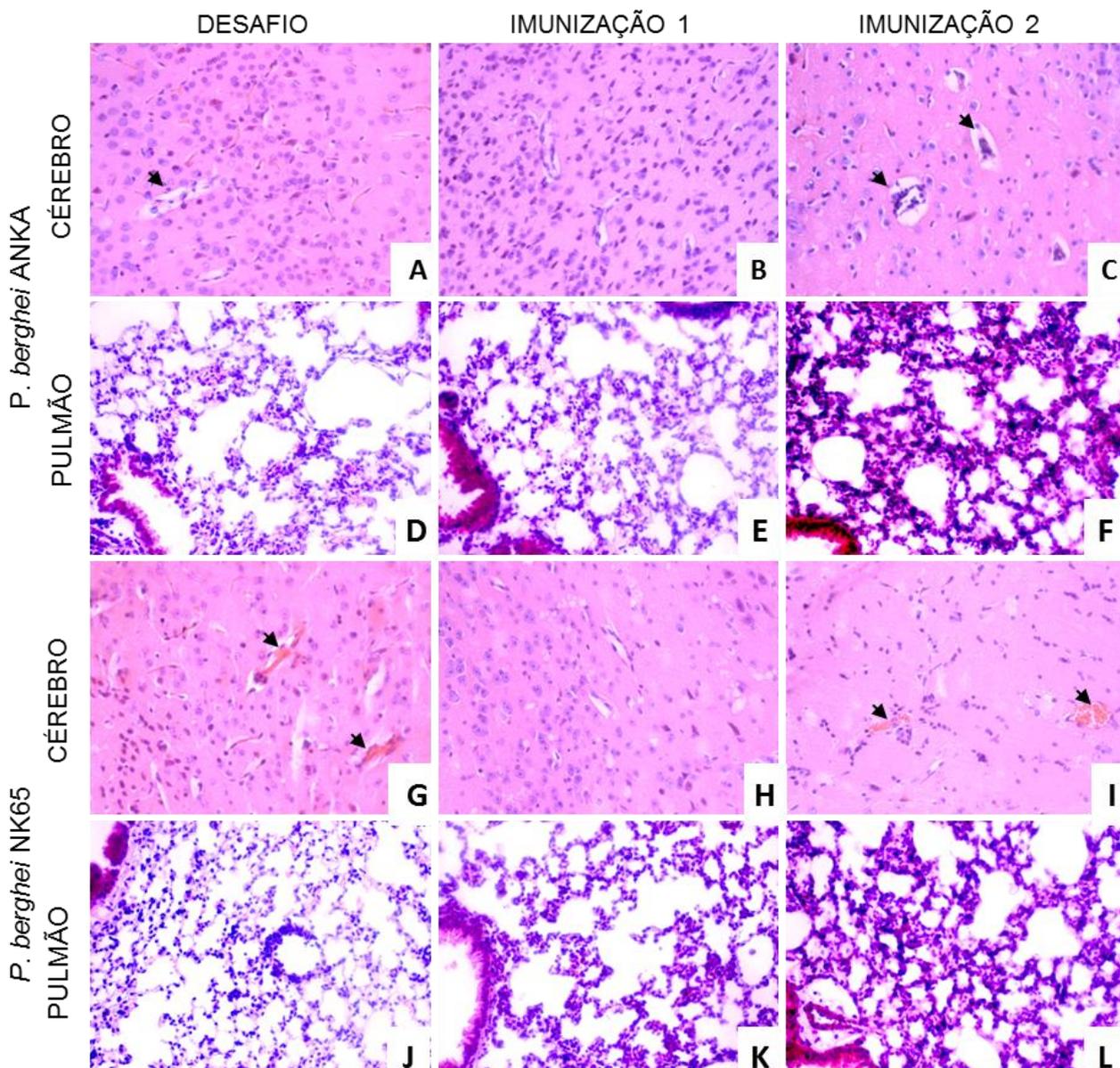


Figura 3 Fotomicrografias de seções do cérebro e pulmões.

Em A, B, C, G, H, I (Cérebro) e em D, E, F, J, K, L (Pulmões) de camundongos C57Bl/6 desafiados com 10^5 hemácias infectadas com *P. berghei* ANKA (A, B, C, D, E, F, H, I, K, L) ou *P. berghei* NK65 (G, J). Imunização homogênea em B, C, E, F e imunização heteróloga em H, I, K, L. Hematoxilina Eosina, 400x. As setas indicam áreas com acúmulo de eritrócitos.

De maneira geral, as principais alterações teciduais em animais expostos aos parasitos foram adesão de leucócitos/hemácias à parede do endotélio dos vasos sanguíneos cerebrais e a presença generalizada de infiltrado inflamatório com presença de neutrófilos nos pulmões. Especificamente, quando comparado aos animais controles (somente desafiado; Figura 3 - A) nota-se que o cérebro de animais imunizados uma vez (1x) com *P. berghei* ANKA e desafiados com parasito homogêneo (Figura 3 - B), não apresentam acúmulo de hemácias no interior dos vasos ou presença de células características de

infiltrado inflamatório. Por outro lado, uma segunda imunização parece não potencializar esse padrão; em contraste, animais imunizados duas vezes (2x) e desafiados com *P. berghei* ANKA apresentam mais vasos obstruídos no cérebro (Figura 3 - C) e hemorragia. Resultados semelhantes podem ser observados quando tecido cerebral proveniente de grupos imunizados uma ou duas vezes com *P. berghei* NK65 e desafiados com *P. berghei* ANKA são analisados (Figura 3 - H e I). Interessantemente, a análise realizada entre os grupos somente desafiados tanto com *P. berghei* ANKA quanto *P. berghei* NK65 (Figuras 3 – A e G, respectivamente) demonstrou que os animais somente desafiados com *P. berghei* NK65 apresentaram mais vaso obstruídos no cérebro que animais desafiados com *P. berghei* ANKA.

Semelhante ao observado no tecido cerebral, os pulmões de animais imunizados 1x e desafiados com *P. berghei* ANKA (Figura 3 - E) apresentam menos lesões (acúmulo de hemácia e infiltrado inflamatório) quando comparado aos pulmões de animais somente desafiados por esse parasito (Figura 3 - D). Contudo, mais uma vez, uma segunda exposição experimental aos parasitos, seguida de tratamento, não induz resposta imunológica capaz de proteger os animais contra a ocorrência de danos teciduais. Em contraste, nossos resultados sugerem que animais expostos à nova infecção apresentam maior chance de desenvolver danos pulmonares quando desafiados com cepa altamente virulenta (Figura 3 - F). Resultados similares são obtidos para animais imunizados com *P. berghei* NK65 e desafiados com *P. berghei* ANKA (Figura 3 - K e L).

6.3 Efeito das imunizações com parasitos vivos no desenvolvimento de parasitemia sanguínea

O quarto objetivo foi investigar o efeito das imunizações com parasitos vivos de *P. berghei* ANKA e *P. berghei* NK65 no controle do desenvolvimento de parasitemia sanguínea de *P. berghei* ANKA em camundongos C57BL/6. Para tal, esfregaços sanguíneos foram confeccionados no 5º dia da infecção com *P. berghei* ANKA, momento em que parte dos animais de cada grupo

experimental foi eutanasiada. Os resultados encontram-se ilustrados na Figura 4.

Observa-se que animais somente desafiados com *P. berghei* ANKA apresentaram maior parasitemia sanguínea quando comparados a animais imunizados e desafiados com mesma cepa de parasito ($p < 0,05$; Figura 4). Embora não tenha sido observada diferença significativa na frequência de parasitemia entre os grupos imunizados e desafiados com *P.berghei* ANKA, houve uma tendência na redução da parasitemia de acordo com o número de imunizações. Esses resultados, portanto, sugerem uma ação positiva das imunizações no controle da parasitemia sanguínea quando animais são imunizados e desafiados com mesma cepa de parasito.

Interessantemente, animais imunizados com *P. berghei* NK65 (1 e 2 vezes) e desafiados com *P. berghei* ANKA também apresentam níveis reduzidos de parasitos circulantes quando comparados a animais somente desafiados com *P. berghei* ANKA ($p < 0,05$). No entanto, não houve associação positiva entre redução de parasitemia e número de imunização.

Portanto, com base nos resultados oriundos do 5º dia de infecção pode-se sugerir que imunizações com parasitos vivos são capazes de controlar a parasitemia sanguínea após desafio com cepas homólogas ou heterólogas aquelas utilizadas na imunização (Figura 4).

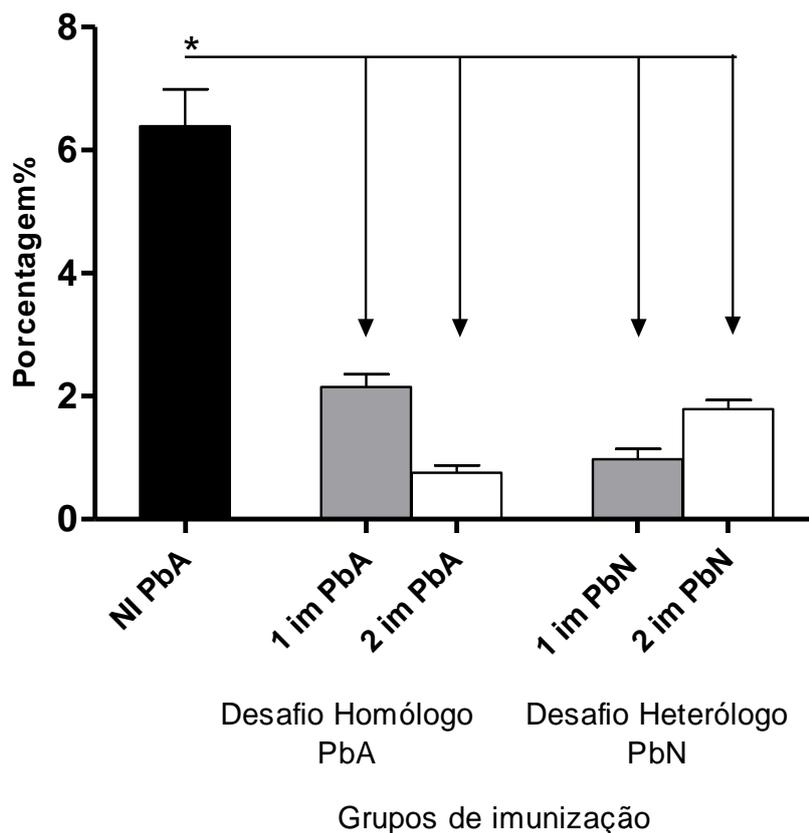


Figura 4 Frequência média das parasitemias observadas em animais imunizados com *P. berghei* ANKA e *P. berghei* NK65 e desafiados com *P. berghei* ANKA

Controle = sem tratamento; NI = designa os grupos que foram somente desafiados pelas linhagens indicadas; 1 im= 1 imunização; 2 im= 2 imunizações; PbA= *Plasmodium berghei* ANKA; PbN= *Plasmodium berghei* NK65; * - diferença significativa $p < 0,05$. (n=7 animais / grupo).

Para avaliar o efeito prolongado das imunizações no desenvolvimento da parasitemia sanguínea, quatro animais de cada grupo foram acompanhados diariamente até o 10º dia após o desafio com *P. berghei* ANKA, e então, a cada dois dias pelo menos até o 30º dia. A Figura 5 ilustra a frequência média da parasitemia observada em animais imunizados com cepa homóloga (*P. berghei* ANKA) e heteróloga (*P. berghei* NK65) àquela usada no desafio. Observa-se que animais desafiados com cepa homóloga, independentemente do número de imunizações, demonstraram frequência de parasitemia inferior ao grupo não imunizado. No entanto, somente animais que receberam duas imunizações apresentaram frequência de parasitemia significativamente inferior àquela verificada no grupo controle (somente desafiado) ($p < 0.05$).

Interessantemente, observa-se que imunizações com *P. berghei* NK65 são capazes de manter os níveis de parasitemia por *P. berghei* ANKA significativamente reduzidos quando comparados a animais somente desafiados ($p < 0,05$), independente do número de imunizações.

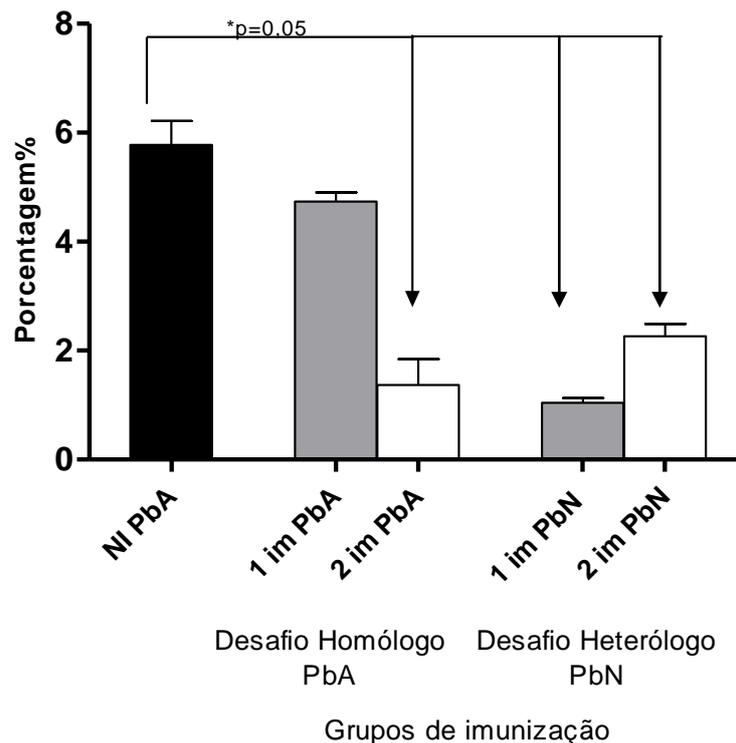


Figura 5 Frequência média das parasitemias observadas em animais imunizados com *P. berghei* ANKA ou *P. berghei* NK65 e desafiados com *P. berghei* ANKA.

Esfregaços foram confeccionados diariamente até o 10º dia após o desafio e então a cada 2 dias até o 30º dia decorrido do desafio experimental. Controle = sem tratamento; NI = designa os grupos que foram somente desafiados pelas linhagens indicadas; 1 im= 1 imunização; 2 im= 2 imunizações; PbA= *Plasmodium berghei* ANKA; PbN= *Plasmodium berghei* NK65. * $p=0,05$ (n=4 animais /grupo)

6.4 Mortalidade

O efeito das imunizações com cepas de *P.berghei* ANKA ou NK65 na sobrevivência dos animais desafiados com *P. berghei* ANKA foi mensurado através da observação diária dos animais não eutanasiados. Pelo exposto, observa-se que independente do decréscimo observado nos níveis de parasitos circulantes nos animais imunizados com *P. berghei* ANKA e desafiados com cepa homóloga, não houve diferença na sobrevivência desses animais quando comparados à animais somente desafiados ($p>0,05$) (Figura 6). Em síntese, todos os animais imunizados 1 ou 2x e desafiados com *P. berghei* ANKA sucumbiram ao óbito entre o 7º e o 9º dia após desafio experimental.

Em contraste, 100% e 75% dos animais imunizados uma ou duas vezes com *P. berghei* NK65 e desafiados com *P. berghei* ANKA ainda permaneciam vivos por volta do 23º e 25º dia após desafio experimental, respectivamente (Figura 6). Contudo, as imunizações não proporcionaram aos animais o controle total da infecção visto que todos morreram por volta do dia 30.

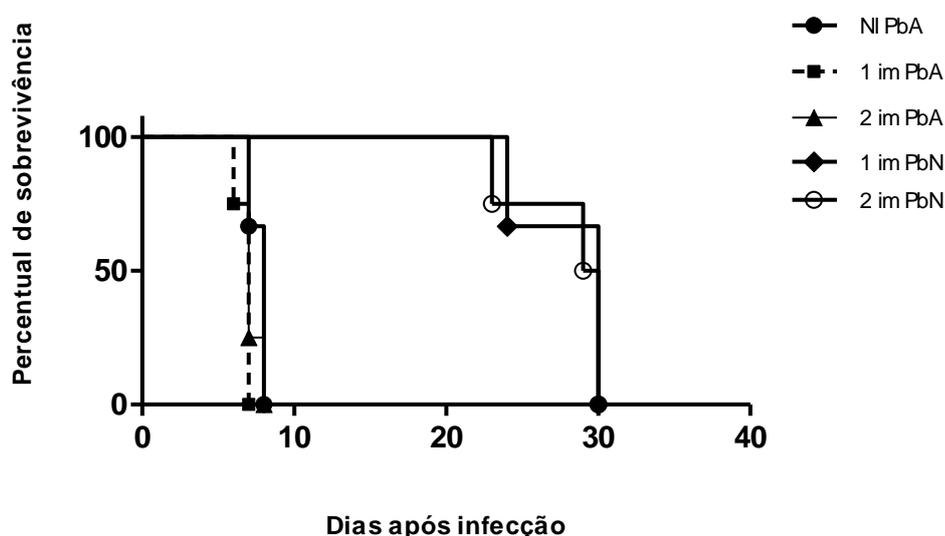


Figura 6 Efeito das imunizações com *P. berghei* ANKA ou *P. berghei* NK65 na sobrevivência dos animais desafiados com *P. berghei* ANKA

Controle = sem tratamento; NI = designa os grupos que foram somente desafiados pelas linhagens indicadas; 1 im= 1 imunização; 2 im= 2 imunizações; PbA= *Plasmodium berghei* ANKA; PbN= *Plasmodium berghei* NK65

6.5 Avaliação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IFN- γ) e anti-inflamatória (IL-10)

Partindo-se da observação de que animais imunizados e desafiados 1x com parasitos homólogos ou heterólogos àqueles utilizados nos desafios são mais protegidos contra lesões cerebrais e pulmonares quando comparados a animais somente desafiados com *P. berghei* (cepas ANKA ou NK65) ou imunizados 2x (Figura 3), e considerando-se ainda a reduzida taxa de parasitos circulantes (Figuras 4 e 5) e presença de anticorpos específicos em animais imunizados (Figura 2), objetivou-se investigar os níveis de citocinas anti e pró-inflamatórias no cérebro e pulmões provenientes de todos os grupos experimentais. Os níveis de citocinas *in loco* foram determinados a partir do homogenato dos órgãos utilizando-se a técnica de ELISA de captura. Os resultados encontram-se ilustrados na Figura 7.

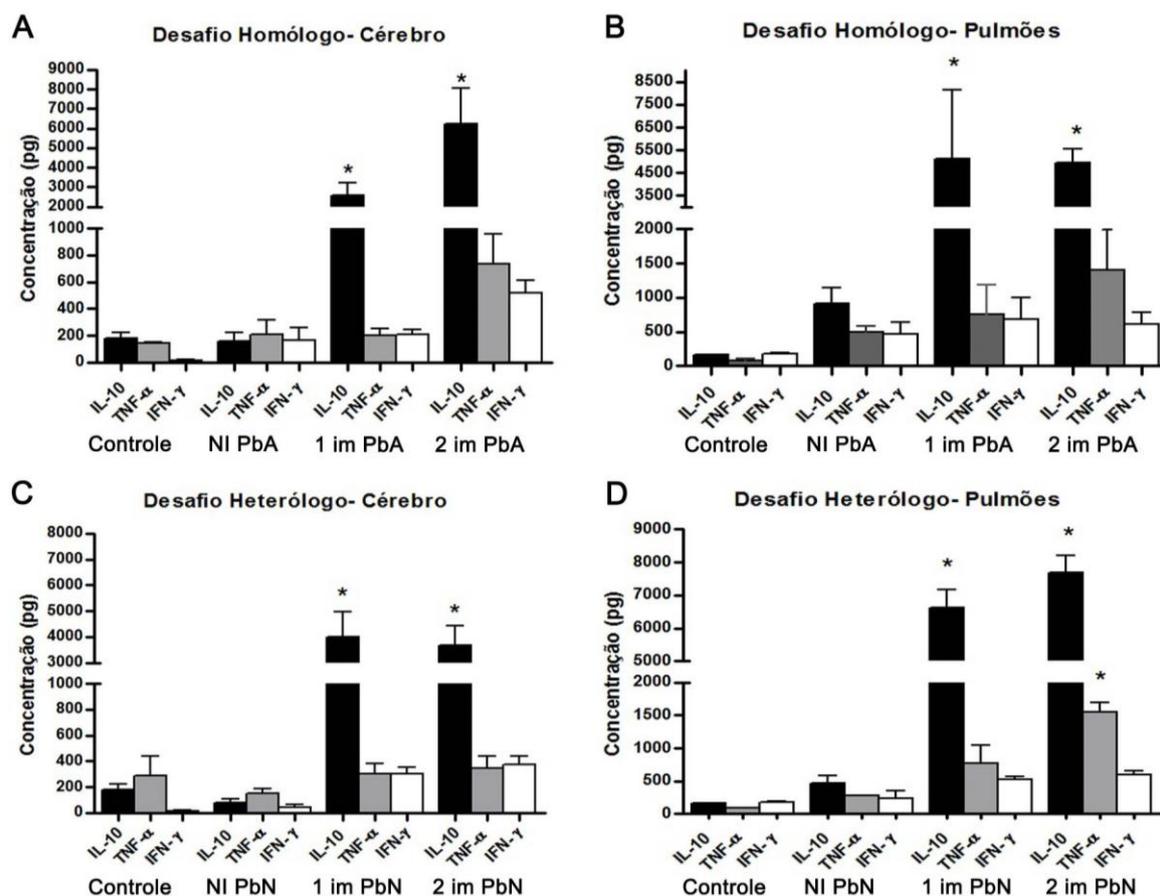


Figura 7 Níveis de citocinas anti-inflamatória e pró-inflamatórias determinadas no cérebro e pulmões de animais imunizados. Controle = sem tratamento; NI = designa os grupos que foram somente desafiados pelas linhagens indicadas; 1 im= 1 imunização; 2 im= 2 imunizações; PbA= *Plasmodium berghei* ANKA; PbN= *Plasmodium berghei* NK65.* $p < 0,05$. (n=4 animais/grupo).

Pelos dados obtidos, observa-se que no cérebro e pulmões de animais imunizados 1x com *P. berghei* ANKA e desafiados com a mesma cepa (Figura 7 - A e B), os níveis de TNF- α e IFN- γ se mantiveram idênticos entre si e similares aos observados em animais somente desafiados. Em contraste, observa-se uma tendência de elevação nos níveis de TNF- α em relação à IFN- γ , tanto no cérebro quanto nos pulmões, em animais imunizados 2x. Isso sugere uma possível tendência ao desequilíbrio no perfil dessas citocinas nos animais que foram expostos pela segunda vez aos parasitos. Níveis elevados de IL-10 são observados tanto no cérebro quanto nos pulmões de animais imunizados com *P. berghei* ANKA e desafiados com parasito homólogo, não havendo clara correlação entre número de imunizações e aumento nos níveis dessa citocina (Figura 7 - A e B).

Da mesma forma, ao analisar o cérebro de animais imunizados com *P. berghei* NK65 e desafiados com parasito heterólogo, observa-se que independente do número de imunizações (1 ou 2x), os níveis de TNF- α e IFN- γ mostram-se similares entre si dentro e entre os grupos experimentais (Figura 7 - C; $p>0.05$). Com relação a IL-10, são observados níveis bastante elevados em animais imunizados embora não haja correlação entre número de imunizações. Nos pulmões, por outro lado, observa-se que os níveis de TNF- α estão significativamente aumentados em relação ao IFN- γ (Figura 7 - D; $p<0,05$) em animais que receberam 2 imunizações. Embora diferença nos níveis dessas citocinas não seja observada nos pulmões de animais imunizados uma única vez ($p>0,05$), observa-se a tendência de desequilíbrio com elevação nos níveis de TNF- α . Os níveis de IL-10 mostram-se elevados em animais imunizados independentemente do número de exposição prévia aos parasitos.

6.6 Avaliação do peso do baço em relação ao número de imunizações

Visto que infecções maláricas repetidas geralmente levam ao aumento do baço, o efeito das imunizações com parasitos vivos no aumento desse órgão também foi investigado. Para tal, no momento da eutanásia, o baço foi retirado, limpo em relação a excesso de gordura, lavado em solução salina e pesado em balança de precisão. Os resultados obtidos para cada grupo experimental estão ilustrados na Figura 9. Observa-se que animais somente desafiados, independente do parasito, apresentam tamanho do baço semelhante ao dos animais controles ($p>0,05$). Por outro lado, imunizações com *P. berghei* ANKA induzem maior aumento do baço, refletido em seu peso, quando comparadas a imunizações com *P. berghei* NK65 ($p<0,05$). Contudo, animais imunizados 2x com *P. berghei* ANKA tendem a apresentar redução no tamanho desse órgão em relação àqueles imunizados uma única vez.

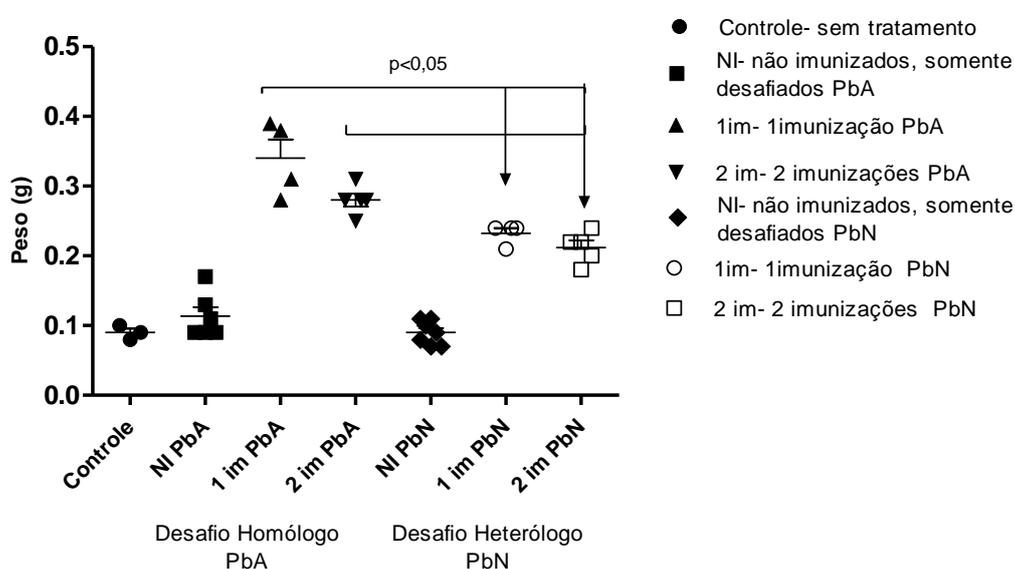


Figura 8 Peso médio do baço no momento da eutanásia em animais imunizados com *P. berghei* ANKA ou *P. berghei* NK65 e desafiados com *P. berghei* ANKA.

Controle = sem tratamento; NI = designa os grupos que foram somente desafiados pelas linhagens indicadas; 1 im= 1 imunização; 2 im= 2 imunizações; PbA= *Plasmodium berghei* ANKA; PbN= *Plasmodium berghei* NK65.* $p<0,05$.

7 DISCUSSÃO

No atual cenário mundial relativo a doenças parasitárias, a malária desponta como um dos maiores problemas de saúde pública do mundo. Assim, anualmente, milhões de dólares são investidos na manutenção e desenvolvimento de estratégias que visam o controle e a erradicação da doença. Entre tais estratégias, destacam-se os investimentos direcionados ao desenvolvimento de uma vacina efetiva contra os plasmódios e segura para uso em humanos. No entanto, graças a vários fatores que incluem a complexidade da resposta imune relacionada à malária, em parte atribuída ao complexo ciclo de vida dos parasitos, até o presente momento não dispomos de um modelo de vacina que seja satisfatoriamente eficiente contra a infecção. Apesar disso, uma série de propostas vacinais vem sendo consideradas promissoras para indução de proteção em humanos, incluindo o uso de parasitos vivos de fase sanguínea dos plasmódios (POMBO *et al.*, 2002; BELNOUE *et al.*, 2008; GERALD *et al.*, 2011; GOOD, 2011). Quando comparada com vacinas de subunidades ou recombinantes, o uso de parasitos vivos, ou mesmo extratos totais, pode ser um recurso vantajoso, uma vez que se hipotetiza sua habilidade de induzir resposta imune direcionada a múltiplos antígenos, sem qualquer necessidade em se identificar a fração protetora para produção em grande escala (PINZON-CHARRY e GOOD, 2008; GOOD, 2011). Assim, com base nas pesquisas até então realizadas, enfatizando o uso de parasitos vivos como modelo para vacinações, a seguir nós discutiremos os resultados obtidos em nosso estudo atual, o qual investigou, dentre outros fatores, o papel de imunizações com parasito de fase eritrocítica na prevenção do desenvolvimento de malária grave em modelo murino.

7.1 Imunizações com parasitos vivos de fase sanguínea dos plasmódios e indução de imunidade antimalárica em modelo murino

Há décadas, os anticorpos são considerados uma das principais linhas de defesa contra infecções maláricas (COHEN *et al.*, 1964; SABCHAREON *et*

al., 1991). Estudos com primatas não humanos, bem como diversos inquéritos soropidemiológicos conduzidos em regiões de elevada endemicidade, demonstraram que a proteção conferida pelas IgGs deve-se, sobretudo, às frações opsonizantes IgG1 e/ou IgG3 (GROUX *et al.*, 1990; GARROUD *et al.*, 1994; EGAN *et al.*, 1996; METZGER *et al.*, 2003). Aparentemente, respostas humorais são desencadeadas na presença de alta carga parasitária, enquanto respostas celulares são predominantemente induzidas por baixas quantidades de imunógenos (GOOD, 2011). Portanto, no presente estudo nós investigamos se baixas doses de parasitos vivos de estágio sanguíneo (10^3 /animal) das espécies *P. berghei* ANKA e *P. berghei* NK65, administradas via i.p. em camundongos, são capazes de induzir imunidade humoral refletida na detecção de anticorpos IgG e respectivas subclasses citofílicas, IgG1 e IgG2a. Nossos resultados demonstram que tais imunizações induzem altos níveis de anticorpos circulantes, o que diverge de um estudo recente realizado por Gerald *et al.* (2011) utilizando mesma carga parasitária e mesma espécie de parasito (*P. berghei* ANKA). Nesse estudo, baseando-se na detecção de IgG, os autores demonstraram que animais imunizados com 10^3 parasitos não desenvolveram resposta humoral enquanto animais imunizados com 10^7 parasitos são capazes de soroconverter apresentando níveis elevados de imunoglobulinas G (GERALD *et al.*, 2011). Duas outras observações relacionadas à indução de resposta imune humoral, entretanto, merecem consideração em nosso estudo: 1) soros de animais imunizados com *P. berghei* ANKA ou *P. berghei* NK 65 mostraram-se capazes de reconhecer antígenos homólogos e heterólogos, o que corrobora estudos prévios (PINZON-CHARRY *et al.*, 2010, INOUE *et al.*, 2012) inclusive em humanos (GUNEWARDENA *et al.*, 1994); 2)- enquanto altos níveis de anticorpos que reconhecem antígeno homólogo e heterólogo, são observados no soro de animais imunizados com *P. berghei* NK65 imediatamente após primeira imunização, animais imunizados com *P. berghei* ANKA parecem necessitar de um *booster* imunogênico para soroconverterem. Uma provável explicação para a observação 1 pode estar associada à ocorrência de antígenos conservados que exibem epitopos antigênicos semelhantes entre as duas espécies de parasitos usadas como estímulo imunogênico permitindo assim reatividade

cruzada observada. Mesma hipótese já foi previamente aventada para explicar a reatividade cruzada no reconhecimento de antígenos de *P. yoelii* por soro imune para *P. vinckei* e vice-versa (INOUE *et al.*, 2012). Por outro lado, a provável explicação para a observação 2 pode estar associada ao comportamento biológico de *P. berghei* ANKA. Assim como observado para *P. falciparum*, causador de malária grave em humanos (CLARK e GOLDEN, 2003; revisto por SCHOFIELD e GRAU, 2005), *P. berghei* ANKA exibe o comportamento conhecido como citoaderência ou, simplesmente, sequestro tanto de eritrócitos quanto de monócitos/leucócitos (LOU *et al.*, 2001; revisto por ENGWERDA *et al.*, 2005). Por meio desse mecanismo, eritrócitos parasitados e monócitos/leucócitos ligam-se a receptores específicos expressos em células endoteliais dos mais distintos órgãos, incluindo cérebro e pulmões, desenvolvendo a seguir uma série de eventos que culminam em paralisia, síndrome da insuficiência respiratória e coma, dentre outros (NEILL *et al.*, 1993; VAN DER HEIDE *et al.*, 2006). Considerando, no entanto, que a indução de respostas imunológicas baseadas em anticorpos depende da ativação e diferenciação de células B em células B plasmáticas, e que tais linfócitos são ativados em infecções primárias no momento em que as células B *naive* encontram o antígeno próximo a áreas de interface com células T nos tecidos linfóides secundários (CROTTY e AHMED, 2004; WRAMMERT *et al.*, 2009), o sequestro de eritrócitos parasitados pode contribuir positivamente para a evasão imune do parasito, uma vez que tal mecanismo dificulta a interação antígeno-célula B efetora. Por outro lado, nossos resultados sugerem que parasitos que não possuem a habilidade de se “esconderem” por meio de mecanismos evasivos, permitem o mais rápido estabelecimento da resposta imune humoral não havendo diferença nos níveis de anticorpos induzidos por uma ou mais imunizações.

Diante dos indícios de estabelecimento de imunidade humoral seguindo nosso protocolo de imunização, nós investigamos a seguir, o impacto dessas imunizações na proteção contra a malária grave. Para tal, avaliamos o desenvolvimento de lesões histopatológicas em tecido cerebral e pulmonar de animais previamente imunizados e eutanasiados no 5º dia após desafio com *P. berghei* ANKA. Interessantemente, seguindo um caráter qualitativo,

observamos que, animais imunizados 1x e que receberam desafio homólogo ou heterólogo apresentam menos lesões teciduais em cérebro e pulmões que animais imunizados 2x. Assim, nossos resultados sugerem que reexposições a parasitos de fase sanguínea, podem potencializar ou desencadear mecanismos que atuam mediando danos teciduais seguindo-se desafio com cepa altamente virulenta. Mais especificamente, essa observação torna-se relevante uma vez que sugere que a utilização de parasitos vivos como proposta vacinal pode refletir em um elevado risco de desenvolvimento de malária grave. Realmente, um estudo prévio realizado com crianças africanas demonstra que a maior incidência de malária cerebral é registrada após repetidas exposições aos parasitos (ERUNKULU *et al.*, 1992). O acúmulo de eritrócitos no interior dos vasos sanguíneos, bem como a presença de células características de infiltrado inflamatório foram os principais indicadores de complicações observadas em nosso estudo, corroborando estudos prévios (CLARK e COWDEN, 2003).

Quando avaliamos a parasitemia em animais imunizados e eutanasiados no 5º dia após o desafio observamos uma redução nas taxas de parasitos circulantes em relação aos animais somente desafiados com *P. berghei* ANKA, o que sugere que as imunizações podem ter mediado o controle do desenvolvimento parasitário após desafios homólogos e heterólogos assim como já observado previamente (CHEESMAN, RAZA e CARTER, 2006; PURCELL *et al.*, 2008). No entanto, apesar da redução nos níveis de parasitos circulantes observada no sangue de animais eutanasiados no 5º dia após desafio com *P. berghei* ANKA, nossos resultados demonstram que somente as imunizações com *P. berghei* NK65 foram capazes de prolongar a vida dos animais. Enquanto, todos os animais imunizados e desafiados com parasito homólogo sucumbiram ao óbito até o 10º dia após desafio com *P. berghei* ANKA, 75% dos animais imunizados com *P. berghei* NK65 (1 ou 2 imunizações) permaneceram vivos até o 25º dia após desafio com cepa causadora de malária grave. Esses dados divergem daqueles obtidos por Gerald e colaboradores (2011) e por Jennings e colaboradores (1998), que demonstraram que imunizações com parasitos de fase eritrocítica, vivos ou mortos, respectivamente, protegem os animais contra o desenvolvimento de

malária cerebral seguindo-se desafio homólogo. Interessantemente, em nosso estudo, os níveis médios de parasitemia sanguínea observada nos animais “protegidos” foram semelhantes àqueles verificados para aqueles desafiados com cepa homóloga e que sucumbiram ao óbito por volta do 10^o dia. Assim, a redução nos níveis de parasitos circulantes em animais imunizados não explicaria a maior sobrevivência observada naqueles que receberam desafio heterólogo. Semelhante a nossos resultados, outros estudos também demonstraram que a maior resistência ao desenvolvimento de quadro grave, por exemplo, malária cerebral, não necessariamente está associada à imunidade anti-parasito (CURFS *et al.*, 1992; GERALD *et al.*, 2011).

A evolução da infecção malárica para sua forma grave depende, dentre outros fatores, do equilíbrio entre citocinas que desempenham papel anti e pró-inflamatório (KOSSODO e GRAU, 1993). Assim, diante do fato de termos observado que apesar de animais imunizados 1x com *P. berghei* ANKA e NK65 terem apresentado menos lesões histopatológicas em cérebro e pulmões em relação aos controles e em relação a animais que sofreram 2 imunizações, somente aqueles imunizados com *P. berghei* NK65 tiveram sua sobrevivência prolongada após desafio e que as taxas de parasitemias sanguíneas não explicam a maior ou menor sobrevivência desses animais, nós investigamos a seguir os níveis de citocinas anti- e pró-inflamatória diretamente nos sítios das lesões. Nossos resultados demonstraram que as imunizações com parasitos vivos induzem o aumento na produção da citocina IL-10, que desempenha papel anti-inflamatório em infecções maláricas (KOSSODO *et al.*, 1997), tanto nos grupos de animais que sofreram imunizações homólogas quanto os que receberam imunização heteróloga ao desafio. Em relação às citocinas pró-inflamatórias, observamos que, em geral, animais imunizados 2x apresentam níveis mais elevados que animais imunizados 1x. Além disso, apesar de não estar totalmente clara, existiu no nos pulmões uma tendência de animais que receberam 2 imunizações com parasitos homólogos ou heterólogos ao utilizado no desafio apresentarem um desequilíbrio no perfil das citocinas TNF- α e IFN- γ , com elevação nos níveis de TNF- α . Esse desequilíbrio pode estar sendo desencadeado pela maior concentração de parasitos nos pulmões como demonstrado por Amante e colaboradores (2010) por meio de ensaios de

bioluminescência. Apesar das citocinas com papel pró-inflamatório, como TNF- α e IFN- γ , auxiliarem na diminuição da parasitemia, é consenso que sua produção exacerbada pode contribuir para a patogênese da malária grave (KOSSODO e GRAU, 1993; GERALD *et al.*, 2011). Contudo, no nosso estudo, essa relação causa-efeito não está clara, o que, pode ter sido influenciado pelo momento de sacrifício dos animais (5^o dia após desafio com *P. berghei* ANKA). Realmente, Jennings e colaboradores (1997) observaram que os níveis dessas citocinas tendem a aumentar no cérebro a partir do 5^o dia com os animais evoluindo para óbito por volta do 7^o dia. No entanto, sabe-se que outros mediadores inflamatórios também podem estar associados ao desenvolvimento de malária grave. No contexto clínico da infecção malárica em humanos, por exemplo, estudos envolvendo crianças demonstram que níveis reduzidos de prostaglandina (PGE₂), um mediador inflamatório produzido via ativação da enzima ciclo-oxigenase 2 (SEIBERT *et al.*, 1994), também se correlaciona positivamente com quadros graves da doença tais como malária cerebral e anemia grave (PERKINS *et al.*, 2001; PERKINS *et al.*, 2005). Da mesma forma, em modelos murinos, estudos demonstram que o bloqueio da produção de PGE₂ associa-se com mortalidade precoce e desenvolvimento de malária cerebral (XIAO *et al.*, 1999; BALL *et al.*, 2004). Como provável explicação para essas observações estão o fato de PGE₂ regular processos inflamatórios bastante relevantes para a fisiopatologia da malária incluindo produção de mediadores inflamatórios (tais como de TNF-alfa), permeabilidade vascular (VANE *et al.*, 1998) e a supressão da atividade leucocitária, tais como quimiotaxia, fagocitose e geração de espécies de oxigênio reativo (revisto por STEVENS *et al.*, 1995).

Portanto, diante de todo o exposto, alguns pontos ainda precisam ser esclarecidos como: 1) os resultados obtidos, especialmente em relação às análises histopatológicas e dosagens de citocinas, podem ter sido influenciados pelo momento da eutanásia? 2) qual o papel dos anticorpos induzidos por imunizações com parasitos vivos? 3) quais fatores permitiram que animais imunizados 1 ou 2x com *P. berghei* NK65 e desafiados com *P. berghei* ANKA fossem capazes de controlar a infecção retardando o agravamento do quadro clínico e, assim, sobrevivendo por até 30 dias decorridos da infecção? Apesar

de encontrarmos suporte na literatura (NEILL *et al.*, 1993; JENNINGS *et al.*, 1998), bem como em observações realizadas em nosso próprio laboratório, de que animais com malária grave morrem a partir do 6º dia da infecção, justificando assim a escolha do dia 5 para sacrifício dos animais, acreditamos que diferenças mais intensas na amplitude e número de áreas lesionadas no cérebro e nos pulmões poderiam ter sido observadas entre os grupos se a eutanásia tivesse sido realizada tardiamente, especificamente no momento do coma. Essa hipótese se deve ao fato de termos observado que apesar dos animais imunizados 1 ou 2 x com *P. berghei* ANKA terem apresentado áreas de lesão em quantidade compatível com a observada em animais imunizados 1 ou 2x com *P. berghei* NK65, respectivamente, somente esses últimos foram capazes de sobreviver a infecção por mais de 10 dias decorridos do desafio com cepa altamente virulenta. Se os anticorpos induzidos por meio de nosso protocolo de imunização são ou não protetores, essa permanece como uma questão a ser investigada já que animais com níveis semelhantes de imunoglobulinas demonstraram diferenças quanto sua capacidade de resistir à infecção. Realmente, os dados de literatura são controversos quanto ao papel indispensável dos anticorpos na proteção antimalárica: enquanto alguns estudos demonstram associações importantes entre proteção anti-parasito e anti-doença e anticorpos (COHEN *et al.*, 1961; VAN DER HEYDE *et al.*, 1994; BELNOUE *et al.*, 2008), outros sugerem que animais deficientes de células B podem, quando imunizados, se tornar resistentes a desafios homólogos e heterólogos (GRUN e WEINDANZ, 1983). Especialmente, sugere-se que células TCD4+ e células T $\gamma\delta$ podem estar associadas a essa proteção (ROBINSON-TAYLOR *et al.*, 1993; AMANTE e GOOD 1997; SEIXAS *et al.*, 1999, POMBO *et al.*, 2002). Portanto, explorar o entendimento quanto aos fatores possivelmente associados à proteção verificada em animais imunizados com *P. berghei* NK65 e desafiados com *P. berghei* ANKA torna-se de fundamental relevância. Nesse sentido, ensaios de transferência passiva de anticorpos para animais susceptíveis, assim como os realizados em humanos por Cohen e colaboradores (1961), poderiam ser de fundamental relevância.

De qualquer forma, independentemente dos pontos que permanecem por serem esclarecidos, nossos resultados sugerem que baixas cargas

parasitárias são capazes de induzir resposta imune humoral. Além disso, animais imunizados uma única vez com reduzida carga de parasitos de fase sanguínea podem ter sua sobrevivência prolongada seguindo-se desafio com cepa virulenta, o que diverge de estudos prévios onde a proteção esteve diretamente associada à carga do imunógeno e ao número de doses (BELNOUE *et al.* 2008; GERALD *et al.*, 2011). Considerando-se ainda, que em áreas endêmicas circulam diferentes espécies de parasitos com diferentes graus de virulência, a imunidade heteróloga observada em nosso estudo, a qual parece auxiliar em um maior controle na evolução da infecção para a forma grave, abre perspectivas para estudos futuros envolvendo imunizações com parasitos vivos.

7.2 Peso do baço em relação ao número de imunizações

O baço apresenta funções muito importantes na resposta imune, além de ser o principal local de eritropoiese e hematopoiese (Revisto por ENGWERDA *et al.*, 2005). Em infecções maláricas, o baço filtra eritrócitos infectados que sofrem deformações pela presença do parasito em seu interior, levando a diminuição da parasitemia (WEISS, 1989). A esplenomegalia encontrada em indivíduos acometidos pela malária sugere retenção dos eritrócitos infectados e dos parasitos no interior do baço, reafirmando, portanto, sua importância no controle da parasitemia (CHOTIVANICH *et al.*, 2002).

Ao avaliarmos o peso do baço, observamos que independentemente da cepa de parasito, animais imunizados apresentam baço aumentado em média 1-2x em relação aos animais somente desafiados. Essa observação está de acordo com o observado por GERALD e colaboradores (2011), que observaram o baço aumentado em 1,5 a 2 vezes em animais imunizados com 10^7 parasitos de fase sanguínea da espécie *P. berghei* ANKA. No entanto, em nossos estudos, observamos ainda que *P. berghei* ANKA induz significativamente maior aumento desse órgão quando comparado a *P. berghei*

NK65 e que a atividade esplênica, refletida no aumento do órgão, tende a reduzir de acordo com o número de imunizações.

8 CONCLUSÕES

Os resultados presentes neste estudo nos permite concluir que:

- Imunizações com parasitos vivos são capazes de induzir altos níveis de anticopos IgG e subclasses IgG1 e IgG2a;
- Anticorpos induzidos pela exposição a parasitos das espécies *P. berghei* ANKA e *P. berghei* NK65 são capazes de reconhecer antígenos homólogos e heterólogos, mas não está clara sua participação nos mecanismos que permitem prolongar a vida dos animais após desafio;
- Maior número de imunizações com parasitos vivos, independente da cepa utilizada, parece predispor os animais a maiores danos em tecidos cerebral e pulmonar. Contudo, em nosso estudo, imunizações com *P. berghei* NK65 parecem ter sido capazes de controlar o avanço da infecção permitindo uma maior sobrevida dos animais;
- De maneira geral, as imunizações com parasitos vivos (homóloga ou heteróloga) parecem atuar no controle da parasitemia sanguínea após desafio com *P. berghei* ANKA;
- Em contraste ao observado com imunizações homólogas, imunizações heterólogas mostraram-se capazes de prolongar a sobrevida dos animais em relação ao grupo controle (somente desafiado com *P. berghei* ANKA). Contudo, não se observou diferença na taxa de sobrevivência em relação ao número de imunizações;
- Imunizações com parasitos vivos induzem elevados níveis de IL-10 em animais imunizados com cepas homólogas ou heterólogas à do desafio, tanto no cérebro quanto nos pulmões, mas não está clara sua participação no controle de danos teciduais;
- Grupos de animais que receberam 2 imunizações homólogas ou heterólogas ao desafio e que apresentam mais lesões em tecido

cerebral e pulmonar em relação aqueles que receberam uma única imunização, tendem a apresentar desequilíbrio no perfil de citocinas TNF- α e IFN- γ , com elevação nos níveis de TNF- α ;

- Imunizações com *P. berghei* ANKA parecem induzir maior esplenomegalia quando comparados a imunizações com *P. berghei* NK65, denotando maior atividade esplênica;
- O 5º dia de infecção, escolhido para realização da eutanásia e consequentes estudos de histologia e perfil de citocinas, pode não espelhar o ponto chave para melhor compreensão dos parâmetros avaliados.

REFERÊNCIAS

ADAMS, S; BROWN, H; TURNER, G. 2002. Breaking down the blood–brain barrier: signaling a path to cerebral malaria?. **Trends in parasitology**, v. 18, n. 8, p. 360-366.

AMANTE, F.H.; GOOD, M.F. 1997. Prolonged Th1-like response generated by a *Plasmodium yoelii*-specific T cell clone allows complete clearance of infection in reconstituted mice. **Parasite Immunology**. **19**:111–26.

AMANTE, F.H.; HAQUE, A.; STANLEY, A.C. 2010. Immune-Mediated mechanisms of parasite tissue sequestration during experimental cerebral malaria. **Journal of Immunology**.**185**:3632-3642.

AMINO, R.; THIBERGE, S.; MARTIN B.; CELLI, S.; SHORTE, S.; FRISCHKNECHT, F.; MÉNARD, R. 2006. Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal, **Nature Medicine** **12**, 220 – 224.

ARTAVANIS-TSAKONAS, K.; RILEY, E. M. 2002. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*- infected erythrocytes. **Journal of Immunology** **169**:2956-2963.

ARTAVANIS-TSAKONAS, K.; TONGREN, J. E.; RILEY, E. M. 2003. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. **Clinical e Experimental Immunology**, **133(2)**, 145-152.

BALL, H. J. et al. Cyclooxygenase-2 in the pathogenesis of murine cerebral malaria. **Journal of Infectious Diseases**, v. **189**, n. 4, p. 751-758, 2004.

BARSOUM, R. S. 2000. Malarial acute renal failure. **Journal of the American Society of Nephrology**. **11(11)**, 2147-2154.

BARTOLONI, A.; e ZAMMARCHI, L. 2012. Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. **Mediterranean journal of hematology and infectious diseases**, **4(1)**.

BEJON, P.; WILLIAMS, T.N.; LILJANDER, A.; NOOR, A.M.; WAMBUA, J.; OGADA, E.; OLOTU, A.; OSIER, F.H.; HAY, S.I.; FÄRNERT ,A.; MARSH, K.. .2010. Stable and unstable malaria hotspots in longitudinal cohort studies in Kenya. **PLoS medicine**, v. 7, n. 7, p. 915.

BELNOUE, E.; COSTA, F.T.; FRANKENBERG, T.; VIGÁRIO, A.M.; VOZA, T.; LEROY, N.; RODRIGUES, M.M.; LANDAU, I.; SNOUNOU, G.; RÉNIA, L. 2004. Protective T cell immunity against malaria liver stage after vaccination with live sporozoites under chloroquine treatment. **The Journal of Immunology**, v. **172**, n. 4, p. 2487-2495.

BELNOUE, E.; VOZA, T.; COSTA, F. T.; GRÜNER, A. C.; MAUDUIT, M.; ROSA, D. S; RÉNIA, L. 2008. Vaccination with live *Plasmodium yoelii* blood stage parasites under chloroquine cover induces cross-stage immunity against malaria liver stage. **The Journal of Immunology**, **181(12)**, 8552-8558.

BERENDT, A. R.; TURNER, G. D. H.; NEWBOLD, C. I. 1994. Cerebral malaria: the sequestration hypothesis. **Parasitology today**, v. 10, p. 412-412.

BOUHAROUN-TAYOUN, H.; OEUVRAY, C.; LUNEL, F.; DRUILHE, P. 1995. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. **The Journal of experimental medicine**, **182(2)**, 409-418.

BOUSEMA, T.; DRAKELEY, C. 2011. Epidemiology and Infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* Gametocytes in Relation to Malaria Control and Elimination. **Journal of Clinical Microbiology**. Rev. 24:377-410

CALIS, J.C.; PHIRI, K.S.; FARAGHER, E.B.; BRABIN, B.J.; BATES, I.; CUEVAS, L.E.; DE HAAN, R.J.; PHIRI, A.I.; MALANGE, P.; KHOKA, M.; HULSHOF, P.J.; VAN LIESHOUT, L.; BELD, M.G.; TEO, Y.Y.; ROCKETT, K.A.; RICHARDSON, A.; KWIATKOWSKI, D.P.; MOLYNEUX, M.E.; VAN HENSBROEK, M.B. 2008. Severe anemia in Malawian children. **New England Journal of Medicine**, **358**:888-899.

CHANG, K; STEVENSON, M. M. 2004. Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. **International journal for parasitology**, v. 34, n. 13, p. 1501-1516.

CHEESMAN, S.; RAZA, A.; CARTER, R. 2006. Mixed strain infections and strain-specific protective immunity in the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi chabaudi* in mice. **Infection and Immunity**; **74**: 2996–3001.

CHOTIVANICH, K.; UDOMSANGPETCH, R.; MCGREADY, R.; PROUX, S.; NEWTON, P.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; LOOAREESUWAN, S.; WHITE, N.J. 2002. Central role of the spleen in malaria parasite clearance. **Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 10, p. 1538-1541.

CLARK, I. A.; COWDEN, W. B.; ROCKETT, K. A. 1994. The pathogenesis of human cerebral malaria. **Parasitology today** (Personal ed.), v. 10, n. 11, p. 417-418.

CLARK, I. A.; COWDEN, W. B. 2003. The pathophysiology of falciparum malaria. **Pharmacology e therapeutics**, 99(2), 221-260.

CLERICI, M. e SHEARER, G.M. 1994 The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. **Immunology Today** **15(12)**: 575-581.

COHEN, S.; MCGREGOR I. A.; CARRINGTON, S. 1961. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. **Nature**, **192**, 733-737.

COPPI, A.; PINZON-ORTIZ, C.; HUTTER, C.; SINNIS, P. 2005 The Plasmodium circumsporozoite protein is proteolytically processed during cell invasion. **Journal of Experimental Medicine**, **201**:27-33

COPPI, A.; TEWARI, R.; BISHOP, J.R.; BENNETT, B.L.; LAWRENCE, R.; ESKO J.D.; BILLKER O.; SINNIS P. 2007. Heparan sulfate proteoglycans provide a signal to Plasmodium sporozoites to stop migrating and productively invade host cells. **Cell Host e Microbe**, **v.2**, p.316327.

COWMAN, A. F. e CRABB, B. S. 2006. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell**, **124(4)**, 755-766.

COX, F.E.G. 2010. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors, **Parasites e Vectors**, **3:5**

CROTTY, S.; AHMED, R. 2004. Immunological memory in humans. **Seminars in Immunology**. **16**:197-203.

CULLETON R. L.; INOUE M.; REECE S. E.; CHEESMAN S.; CARTER R. 2011. Strain-specific immunity induced by immunization with pre-erythrocytic stages of *Plasmodium chabaudi*. **Parasite immunology**, **33(1)**, 73-78.

CURFS, J.H.; HERMSEN, C.C.; MEUWISSEN, J.H.; ELING, W.M. 1992. Immunization against cerebral pathology in *Plasmodium berghei*-infected mice. **Parasitology**. (Pt 1):7-14.

DA SILVA, H.B.; SALLES, E.M.; PANATIERI, R.H. 2013. IFN-gama-induced priming maintains long-term strain-transcending immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria. **The journal of immunology**, **191**:5160-5169.

DEANE, L.M. 1986. Malaria vector in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **Vol. 81**, Suppl. II: 5-14.

DONDORP, A. M.,; INCE C.; CHARUNWATTHANA, P.; HANSON, J.; VAN KUIJEN, A.; FAIZ, M. A.; DAY, N. P. J. 2008. Direct in vivo assessment of microcirculatory dysfunction in severe falciparum malaria. **Journal of Infectious Diseases**,**197(1)**, 79-84.

DOOLAN, D. L.; HOFFMAN, S. L. 2000. The complexity of protective immunity against liver-stage malaria. **The journal of immunology**, **165(3)**, 1453-1462.

DYER, M.; DAY, K. P. 2000. Commitment to gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. **Parasitology Today**,**16**:102-107.

ENGWERDA, C.; BELNOUE, E.; GRUNER, A.C. 2005. Experimental models of cerebral malaria. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, **297**:103-143.

EGAN, A.E.; MORRIS, J.; BARNISH, G.; ALLEN, S, GREENWOOD, B.M.; KASLOW, D.C.; HOLDER, A.; RILEY, E.M. 1996. Clinical immunity *Plasmodium 41 falciparum* malaria is associated with serum antibodies to the 19 kDa C-terminal fragment of the merozoite surface antigen PfMSP-1. **Journal of Infectious Diseases**, **173**:765-769.

EISEN, D. P.; SAUL, A.; FRYAUFF, D. J.; REEDER, J. C.; COPPEL, R. L. 2002. Alterations in *Plasmodium falciparum* genotypes during sequential infections suggest the presence of strain specific immunity. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **67(1)**, 8-16.

ELLIOTT, S. R.; KUNS, R. D.; GOOD, M. F. 2005. Heterologous immunity in the absence of variant-specific antibodies after exposure to subpatent infection with blood-stage malaria. **Infection and immunity**, **73(4)**, 2478-2485.

ERUNKULU, O. A.; HILL, A. V.; KWIATKOWSKI, D. P.; TODD, J. E.; IQBAL, J.; BERZINS, K.; RILEY, E.M.; GREENWOOD, B. M. 1992. Severe malaria in Gambian children is not due to lack of previous exposure to malaria. **Clinical e Experimental Immunology**, **89(2)**, 296-300.

FINNEY, C. A.; LU, Z.; HAWKES, M.; YEH W. C.; LILES, W. C.; KAIN, K. C. 2010. Divergent roles of IRAK4-mediated innate immune responses in two experimental models of severe malaria. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, **83(1)**, 69.

FRANCISCHETTI, I.; SEYDEL, K. B.; MONTEIRO R. Q. 2008. Blood coagulation, inflammation, and malaria. **Microcirculation****15(2)**, 81-107.

GERALD N. J.; MAJAM V.; MAHAJAN B.; KOZAKAI Y.; KUMAR S. 2011. Protection from experimental cerebral malaria with a single dose of radiation-attenuated, blood-stage *Plasmodium berghei* parasites. **PloS one**, **6(9)**, e24398.

GLUSHAKOVA, S.; YIN, D.; LI, T.; ZIMMERBERG, J. 2005. Membrane transformation during malaria parasite release from human red blood cells. **Current Biology**, **v.15**, p.1645-1650.

GOOD, M. F.; KASLOW, D. C.; MILLER, L. H. 1998. Pathways and strategies for developing a malaria blood-stage vaccine. **Annual review of immunology**, **v. 16**, n. 1, p. 57-87.

GOOD, M. F.; XU, H.; WYKES, M.; ENGWERDA, C.R. 2005. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. **Annual Review of Immunology**, **v. 23**, p. 69-99.

GOOD, M. 2011. A whole parasite vaccine to control the stages of *Plasmodium*-the case for lateral thinking. **Trends Parasitol**, **27**:335-340.

GREEN, T. J. e KREIER, J. P. 1978. Demonstration of the role of cytophilic antibody in resistance to malaria parasites (*Plasmodium berghei*) in rats. **Infection and immunity**, **19(1)**, 138-145.

GROUX,H.; GYSIN, J. 1990. Opsonization as an effectors mechanisms in human protection against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*: functional role of the IgG subclasses. **Journal of Immunology Research**, **141**:529-542.

GRUN, J. L. e WEIDANZ, W. P. 1983. Antibody-independent immunity to reinfection malaria in B-cell-deficient mice. **Infection and immunity**, **41(3)**, 1197-1204.

GUERRA, C. A.; SNOW, R. W.; HAY, S. I. 2006. Mapping the global extent of malaria in 2005. **Trends in parasitology**, **22(8)**, 353-358.

GUNewardena ,D.; CARTER, R.; MENDIS, K. 1994. Patterns of acquired anti-malarial immunity in Sri Lanka. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **89**: 63-68.

GUPTA,S.; e DAY, K.P. 1994. A strain theory of malaria transmission. **Parasitology Today**, **10(12)**: 476 – 48.

HEDRICK, P. W. 2011. Population genetics of malaria resistance in humans. **Heredity**, **107(4)**, 283-304.

HILL, D. L.; ERIKSSON, E. M.; SUEN, C. S. L. W.; CHIU C. Y.; RYG-CORNEJO, V.; ROBINSON, L. J.; SIBA, P.M.; MUELLER, I.; HANSEN, D.S.; SCHOFIELD, L. 2013. Oponising Antibodies to *P. falciparum* Merozoites Associated with Immunity to Clinical Malaria. **PloS one**, **8(9)**, e74627.

HOFFMAN, S. L.; ISENBARGER, D.; LONG, G. W.; SEDEGA,H M.; SZARFMAN, A.; WATERS, L.; BALLOU, W. R. 1989. Sporozoite vaccine induces genetically restricted T cell elimination of malaria from hepatocytes. **Science**, **244(4908)**, 1078-1081.

HOFFMAN, S. L; GOH, L. M.; LUKE, T. C.; SCHNEIDER ,I.; LE T. P.; DOOLAN, D. L.; SACCI, J.; DE LA VEGA, P.; DOWLER, M.; PAUL, C.; GORDON, D.M.; STOUTE, J.A.; CHURCH, L.W.; SEDEGAH, M.; HEPPNER, D.G.; BALLOU, W.R. 2002. Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. **Journal of Infectious Diseases**, v. **185**, n. 8, p. 1155-1164.

[http:// www.cdc.gov/malaria/about/biology/](http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/), acessado em novembro de 2013

INOUE, M.; TANG, J.; MIYAKODA, M.; KANEKO, O.; YUI, K.; CULLETON, R. 2012. The species specificity of immunity generated by live whole organism immunisation with erythrocytic and pre-erythrocytic stages of rodent malaria parasites and implications for vaccine development. **International journal for parasitology**, **42(9)**, 859-870.

JENNINGS, V.M.; LAL. A.A.; HUNTER, R.L. 1998.Evidence for multiple pathologic and protective mechanisms of murine cerebral malaria. **Infection and Immunity**, **66(12)**:5972-9.

JENNINGS, V.M.; LAL, A.A.; HUNTER, R.L. 1997. Cytokine profile suggesting that murine cerebral malaria is an encephalitis. **Infection and Immunity**, **65(11)**:4883-7.

KIRUNPETCHARAT, C.; FINKELMAN, F.; CLARK, I. A.; GOOD, M. F. 1999. Malaria parasite-specific th1-like T cells simultaneously reduce parasitemia and promote disease. **Parasite immunology**, **21**: 319-329.

KOSSODO, S.; MONSO, C.; JUILLARD, P.; VELU T.; GOLDMAN, M.; GRAU, G. E. 1997. Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria. **Immunology**, **91(4)**:536-40.

KOSSODO, S., e GRAU, G. E. 1993. Profiles of cytokine production in relation with susceptibility to cerebral malaria. **The Journal of Immunology**, **151(9)**, 4811-4820.

LOU, J.; LUCA, R.; GRAU, G. E. 2001. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. **Clinical microbiology reviews**, **14(4)**, 810-820.

LOVEGROVE, F. E.; GHARIB, S. A.; PEÑA-CASTILLO, L.; PATEL, S. N.; RUZINSKI, J. T.; HUGHES, T. R.; KAIN, K. C. 2008. Parasite burden and CD36-mediated sequestration are determinants of acute lung injury in an experimental malaria model. **PLoS pathogens**, **4(5)**, e1000068.

MACKINNON, M.J.; MWANGI, T.W.; SNOW, R.W.; MARSH, K.; WILLIAMS, T.N. 2005. Heritability of Malaria in Africa. **PLoS Med**, **2(12)**: e340. doi:10.1371/journal.pmed.0020340.

Malária no Brasil: epidemiologia e controle, Saúde Brasil 2009: Uma análise da situação da saúde e da agenda nacional e internacional de prioridades em saúde, 225-240

MAYXAY, M.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; NEWTON, P.N.; WHITE, N.J.; 2004. Mixed-species malaria infections in humans. **Trends in parasitology**, v. **20**, n. 5, p. 233-240.

MARTINELLI, A.; CHEESMAN, S.; HUNT, P.; CULLETON, R.; RAZA, A.; MACKINNON, M.; CARTER, R. 2005. A genetic approach to the de novo identification of targets of strain-specific immunity in malaria parasites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **102(3)**, 814-819.

METZGER, W.; OKENU ,D.M.N;.; CAVANAG, D.R.; ROBINSON, J.V.; BOJANG, K.; WEISS ,H.A.; MCBRIDE, J.S.; GREENWOOD, B.M.; CONWAY, D.J.2003. Serum IgG3 to the Plasmodium *falciparum* merozoite surface protein 2 is strongly associated with a reduced prospective risk of malaria. **Parasite Immunology**, **25**:307-312.

MILLER, L. H.; BARUCH, D. I.; MARSH, K.; DOUMBO, O. K. 2002. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, **415**(6872), 673-679.

Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2010. **Guia de vigilância epidemiológica: caderno 10 malária**. 7a ed. Brasília: Ministério da Saúde.

MIN-OO, G. e GROS, P. 2005. Erythrocyte variants and the nature of their malaria protective effect. **Cellular microbiology**, **7**(6), 753-763.

MITCHELL, G. H.; THOMAS, A. W.; MARGOS, G.; DLUZEWSKI, A. R.; BANNISTER, L. H. 2004. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. **Infection and immunity**, **72**(1), 154-158.

MOHAN, A.; SHARMA, S. K.; BOLLINENI, S. 2008. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in malaria. **Journal of Vector Borne Diseases**, **vol. 45**, no. 3, pp. 179–193.

MUELLER, A. K.; LABAIED, M.; KAPPE S. H.; MATUSCHEWSKI K. 2005. Genetically modified Plasmodium parasites as a protective experimental malaria vaccine. **Nature**, **433**(7022), 164-167.

MURHANDARWAT, I. E. E. H.; BLACK C. G.; WEISMAN S.; DE KONING-WARD T. F.; BAIRD J. K.; TJITRA E.; RICHIE T.L.; CRABB B.S.; COPPEL R. L. 2008. Acquisition of invasion-inhibitory antibodies specific for the 19-kDa fragment of merozoite surface protein 1 in a transmigrant population requires multiple infections. **Journal of Infectious Diseases**, **198**(8), 1212-1218.

NEILL, A.L.; CHAN-LING, T.; HUNT, N.H. 1993. Comparisons between microvascular changes in cerebral and non-cerebral malaria in mice, using the retinal whole-mount technique. **Parasitology**. ;**107** (Pt 5):477-87.

NUSSENZWEIG, R. S.; VANDERBERG, J.; MOST, H. e ORTON, C. 1967. Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. **Nature**, **216**: 160–162

OCAÑA-MORGNER C.; MOTA M. M.; RODRIGUEZ A. 2003. Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. **The Journal of experimental medicine**, **197(2)**, 143-151

OMER , F. M.; DE SOUZA, J.B.; RILEY, E.M. Differential induction of TGF- β regulates proinflammatory cytokine production and determines the outcome of lethal and nonlethal *Plasmodium yoelii* infections. **The Journal of Immunology**, v. **171**, n. 10, p. 5430-5436, 2003.

PATEL, S.N.; SERGHIDES L.; SMITH T.G.; FEBBRAIO M.; SILVERSTEIN R.L.; KURTZ T.W.; PRAVENEK M.; KAIN K.C. 2004. CD36 mediates the phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by rodent macrophages. **Journal of Infectious Diseases**,**189**:204–13.

PÉRIGNON, J. L. e DRUILHE, P.1994. Immune mechanisms underlying the premunition against *Plasmodium falciparum* malaria. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. **89**, p. 51-53.

PERKINS, D.J.; KREMSNER, P.G.; WEINBERG, J.B. 2001. Inverse relationship of plasma prostaglandin E2 and blood mononuclear cell cyclooxygenase-2 with disease severity in children with *Plasmodium falciparum* malaria. **Journal of Infectious Diseases**, **183**:113-118.

PERKINS, D.J.; HITTNER, J.B.; MWWAIKAMBO, E.D. 2005. Impaired systemic production of prostaglandin E2 in children with cerebral malaria. **Journal of Infectious Diseases**, **191**:1548-1557.

PETTY, M. A. ; LO, E. H. 2002. Junctional complexes of the bloodbrain barrier: permeability changes in neuroinflammation. **Progress in Neurobiology** , **68(5)**:311-323.

PINZON-CHARRY A.; GOOD M.F. 2008. Malaria vaccines: the case for a whole-organism approach. **Expert Opinion on Biological Therapy**, **8**: 441–448.

PINZON-CHARRY A.; MCPHUN V.; KIENZLE V.; HIRUNPETCHARAT C.; ENGWERDA C.; MCCARTHY J.; GOOD M. F. 2010. Low doses of killed

parasite in CpG elicit vigorous CD4+ T cell responses against blood-stage malaria in mice. **The Journal of clinical investigation**, **120(8)**, 2967.

PLEBANSKI, M. e HILL A. V. S. 2000. The immunology of malaria infection. **Current opinion in immunology**, **12**: 437-441.

POMBO, D. J.; LAWRENCE, G.; HIRUNPETCHARAT, C.; RZEPCZYK, C.; BRYDEN, M.; CLOONAN, N.; GOOD, M. F. 2002. Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. **The Lancet**, **360(9333)**, 610-617.

POUVELLE B.; GORMLEY J. A.; TARASCHI T. F. 1994. Characterization of trafficking pathways and membrane genesis in malaria-infected erythrocytes. **Molecular and biochemical parasitology**, v. **66**, n. 1, p. 83-96.

PURCELL, L.A.; WONG, K.A.; YANOW S.K. 2008. Chemically attenuated *Plasmodium* sporozoites induce specific immune responses, sterile immunity and cross-protection against heterologous challenge. **Vaccine**, **26**:4880-4884.

RÉNIA, L.; GRÜNER, A. C.; MAUDUIT, M.; SNOUNOU, G. 2006. Vaccination against malaria with live parasites. **Expert Review of Vaccines** **5**:473–481

RICHIE T. L. 2002. Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. **Journal of Infectious Diseases** .**185(8)**, 1155-1164

RILEY, E. M.; WAHL S.; PERKINS, D. J.; SCHOFIELD, L. 2006. Regulating immunity to malaria. **Parasite immunology**, **28(1-2)**, 35-49.

TAYLOR-ROBINSON, A.W.; PHILLIPS, R.S.; SEVERN, A.; MONCADA, S.; LIEW ,F.Y. L.1993. The role of TH1 and TH2 cells in a rodent malaria infection. **Science**, v. 260, n. 5116, p. 1931-1934.

SABCHAREON, A.; BURNOUF, T.; OUATTARA, D. 1991. Pasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **45**:297-308.

SACHS, J. e MALANEY, P. 2012. The economic and social impact of malaria. **Nature**, **415(6872)**, 680-685.

SCHERF, A.; POUVELLE, B.; BUFFET, P. A.; GYSIN, J. 2001. Molecular mechanisms of *Plasmodium falciparum* placental adhesion. **Cellular Microbiology**, **3**: 125–131.

SCHOFIELD, L. e GRAU, G.E. 2005. Immunological processes in malaria pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, **5**: 22-735.

SEDEGAH, M.; WEISS, W. W.; e HOFFMAN, S. L. 2007. Cross-protection between attenuated *Plasmodium berghei* and *P. yoelii* sporozoites. **Parasite immunology**, **29(11)**, 559-565.

SEDER, R. A.; CHANG, L. J.; ENAMA, M. E.; ZEPHIR, K. L.; SARWAR, U. N.; GORDON, I. J.; WILSON, B. 2013. Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. **Science**, **341(6152)**, 1359-1365.

SIBERT, K.; MASFERRER, J.L.1994. Role of inducible cyclooxygenase (COX-2) in inflammation. **Receptor** , **4**:17-23.

SHIN, S. C. J.; VANDERBERG, J. P.; e TERZAKIS, J. A. 1982. Direct Infection of Hepatocytes by Sporozoites of *Plasmodium berghei*1. **The Journal of protozoology**, **29(3)**, 448-454.

SIDDIQUI, A.A.; SINGH, N; SHARMA, Y D. 2007.Expression and purification of a *Plasmodium vivax* antigen–PvTARAg55 tryptophan-and alanine-rich antigen and its immunological responses in human subjects. **Vaccine**, v. **26**, n. 1, p. 96-107.

SOUZA, J. B. 2014 Protective immunity against malaria after vaccination. **Parasite immunology**, **36(3)**, 131-139.

STEVENSON ,M. M.; RILEY, E.M. 2004. Innate immunity to malaria. **Nature Reviews Immunology**. **4**: 169-180.

STURM, A.; AMINO, R.; VAN DE SAND, C.; REGEN, T.; RETZLAFF, S.; RENNENBERG, A.; KRUEGER, A.; POLOCK, J.M.; MENARD.; HEUSSLER, V. T. 2006. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, **313(5791)**, 1287-1290.

TAYLOR, L. H.; MACKINNON, M. J.; READ, A. F. 1998. Virulence of mixed-clone and single-clone infections of the rodent malaria *Plasmodium chabaudi*. **Evolution**, 583-591.

THOMPSON, J.; COOKE R.E.; MOORE, S.; ANDERSON, L.F.; JANSE, C.J.; WATERS, A.P. 2004. PTRAMP; a conserved Plasmodium thrombospondin-related apical merozoite protein. **Molecular and Biochemical Parasitology**. **134**, 225–23.

VAN DER HEYDE, H.C.; HUSZAR ,D.; WOODHOUSE, C.; MANNING, D.D.; WEIDANZ, W.P.1994. The resolution of acute malaria in a definitive model of B cell deficiency, the JHD mouse. **The Journal of Immunology**, v. 152, n. 9, p. 4557-4562, 1994.

VAN DER HEYDE, H.C; NOLAN, J.; COMBES ,V.; GRAMAGLIA, I.; GRAU, G.E..2006. A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 11, p. 503-508.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M. 1998. Cyclooxygenase 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. **38**, p.97-120

WRAMMERT,J.; MILLER, J.; AKONDY, R.; AHMED, R. 2009. Human immune memory to yellow fever and smallpox vaccination. **Journal of Clinical Immunology**. **29**:151-157.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B.; 2002. Genetic variability in response to infection: malaria and after. **Genes and immunity**, **3(6)**, 331-337.

WEISS, G. E; TRAORE, B.; KAYENTAO, K.; ONGOIBA ,A.; DOUMBO, S.; DOUMTABE, D.; KONE, Y.; DIA, S.; GUINDO, A.; TRAORE, A.; HUANG ,C.Y.; MIURA, K.; MIRCETIC, M.; LI, S.; BAUGHMAN, A.; NARUM, D.L.; MILLER, L.H.; DOUMBO, O.K.; PIERCE, S,K.,; CROMPTON,P.D. 2010.The *Plasmodium falciparum*-specific human memory B cell compartment expands gradually with repeated malaria infections. **PLoS Pathog**, v. **6**, n. 5, p. e1000912-e1000912.

WHO. 2011. Roll Back Malaria- Financiamento e Utilização de Recursos Para o Combate à Malaria: A Primeira Década do Programa.

WHO, **World malaria report** , WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2013.

World Health Organization. 2010. **Guidelines for the treatment of malaria**. Second Edition ed: World Health Organization.

XIAO, L.; PATTERSON, P.; YANG, C.; et al. 1999. Role of eicosinoids in the pathogenesis of murine cerebral malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** , **60**:668-673.