

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

**Bárbara Albuquerque Carpinter**

**INDUÇÃO DE IMUNIDADE COM EXTRATO PROTEICO DE  
*Plasmodium berghei* NK65 CONTRA O DESENVOLVIMENTO DE  
MALÁRIA CEREBRAL POR *Plasmodium berghei* ANKA EM  
MODELO MURINO**

Dissertação

Juiz de Fora

2018

**BÁRBARA ALBUQUERQUE CARPINTER**

**INDUÇÃO DE IMUNIDADE COM EXTRATO PROTEICO DE  
*Plasmodium berghei* NK65 CONTRA O DESENVOLVIMENTO DE  
MALÁRIA CEREBRAL POR *Plasmodium berghei* ANKA EM  
MODELO MURINO**

Dissertação de Mestrado do Curso de Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças-infecto-parasitárias.

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kézia Katiani Gorza Scopel**

Juiz de Fora

2018



BÁRBARA ALBUQUERQUE CARPINTER

INDUÇÃO DE IMUNIDADE COM EXTRATO PROTEICO DE *Plasmodium berghei*  
NK65 CONTRA O DESENVOLVIMENTO DE MALÁRIA CEREBRAL POR  
*Plasmodium berghei* ANKA EM MODELO MURINO

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.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kézia Katiani Gorza Scopel  
Orientadora  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Letusa Albrecht  
Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Jacy Gameiro  
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico este trabalho aos meus pais por nunca medirem esforços para o desenvolvimento dos meus estudos e minha felicidade. Muito obrigada por todo incentivo, amor e dedicação.

## AGRADECIMENTOS

Eu primeiramente agradeço a Deus pela sua graça e suas bênçãos que permitiram o desenvolver deste trabalho e a conclusão de mais uma etapa tão importante.

Agradeço a Universidade Federal de Juiz de Fora, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Imunologia e Doenças infecto-parasitárias), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por todo suporte financeiro para realização deste projeto.

A minha querida orientadora Dr.<sup>a</sup> Kézia Scopel pelo acolhimento, apoio, ensinamentos e confiança que recebi desde que entrei para seu grupo de pesquisa, além da amizade construída por todos esses anos. Ainda agradeço ao Thomás, que além de fazer parte do final dessa jornada, espera ansiosamente para nascer logo após a apresentação desta dissertação, assim como todos nós esperamos para finalmente conhecê-lo.

Ao professor Dr. Leonardo Carvalho, da Fundação Oswaldo Cruz, por auxiliar na análise das lâminas analisadas durante este trabalho.

Às professoras do Núcleo de Pesquisa em Parasitologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Dr.<sup>a</sup> Florence Mara, Dr.<sup>a</sup> Elaine Coimbra e Dr.<sup>a</sup> Clarice Abramo pela colaboração durante todos os anos de convivência.

Aos professores do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Dr.<sup>a</sup> Jacy Gameiro, e suas alunas Sara e Ana, e ao Dr. Gilson Macedo, por toda ajuda em todos os momentos necessários.

Aos amigos que o laboratório de Parasitologia me presenteou, Daniela, Fernanda, Ayla, Juliana, Juliane, Stephane, Patrícia, Ana Carolina, Luciana, Roberta, Jéssica, Tamires e Vinícius, pois sem a alegria e nossas crises diárias de riso/desespero durante toda a nossa rotina este trabalho não teria sido fácil, vocês tornaram essa jornada muito mais leve!

Às alunas de iniciação científica que fizeram parte fundamental no auxílio dos experimentos, Laís, Marina, Carol, Livia e Myllena.

Ao Sr. Jorge e a Lenir que sempre estiveram presentes, sempre prestativos e dispostos para auxiliar da maneira que fosse preciso.

Ao meu Trio da Fofoca, Dani e Alyssa. Eu não tenho palavras para agradecer a Daniela pela ajuda em absolutamente todos os momentos durante o desenvolver desse trabalho, e também pelos ensinamentos durante todos os anos juntas; é impossível descrever tamanha a minha gratidão por todo apoio durante a nossa jornada na pós-graduação e também na superação de todos os obstáculos que a vida nos impõe. À Alyssa por todo apoio, ensinamentos e paciência (pois sei que é algo que ela não possui), pelas nossas tardes de café e de aulas de natação e também por me fazer sonhar em alcançar objetivos cada vez maiores.

À Leonara e à Diquinha, minhas amadas amigas que durante todos esses anos me acolheram como irmã/filha em sua casa e pelos nossos inúmeros jantares deliciosos.

Aos meus amigos Marcus, Isabela, Sara, Diego, João Victor, Mariana, Helena, Laura, Julia, Thammi, Marcella e a família de cada um deles, pois são refúgio sempre que preciso e preciosos para toda vida.

Por último e mais importante, eu não tenho palavras pra escrever o quanto sou grata à minha família. Aos meus pais, Carlos Henrique e Eliana, pois sem o amor, apoio, incentivo, empenho e dedicação eu não teria concluído nenhuma etapa desse trabalho. Ao Daniel pela paciência em diversos momentos em que estive ausente e também por todo carinho e amor que possuímos por todos esses anos. A minha irmã, Mariana, minhas tias, Vânia, Diva, Quinha, a todos os meus tios, meus primos, por vibrarem a cada conquista, por todo incentivo e amor que recebi.

Agradeço imensamente a todos, pois cada um teve seu papel fundamental no desenvolvimento deste projeto, muito obrigada!

“A vida não é fácil para nenhum de nós. Temos que ter perseverança e acima de tudo confiança em nós mesmos. Devemos acreditar que nós somos agraciados por algo e que este algo deve ser alcançado”. (Marie Curie)



## RESUMO

Devido à ampla distribuição da malária entre os continentes e ao elevado número de casos clínicos e óbitos registrados anualmente, o desenvolvimento de uma vacina antimalárica segura e eficaz contra a doença ainda é de extrema importância. Dentre os vários modelos propostos até o momento, aquelas compostas por parasitos vivos ou por extrato proteico têm sido as mais promissoras no desenvolvimento de imunidade antimalárica. Entretanto, ainda não claro se imunizações com cepas com baixo potencial de virulência seriam capazes de prevenir ou amenizar os sintomas associados à malária grave. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar se camundongos imunizados com extrato proteico de *Plasmodium berghei* NK65, cepa de baixa virulência e não indutora de malária cerebral nesse modelo, são protegidos contra o desenvolvimento de malária cerebral induzida pela cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA). Para isto, foram realizados dois ciclos de imunização utilizando extrato proteico de *Plasmodium berghei* associado ao adjuvante CPG-ODN, com intervalo de 21 dias, em camundongos fêmeas C57BL/6, com idade entre 6 e 8 semanas. Após 30 dias da última imunização foi realizado o desafio experimental utilizando a cepa ANKA de *P. berghei* e iniciado o acompanhamento diário dos animais para avaliação do seu quadro clínico e da carga parasitária. Diante da presença de sinais neurológicos (escore clínico < 5), os animais foram pesados e eutanasiados para realização da coleta de sangue, baço e cérebro, enquanto animais sem esses sinais continuaram por ser acompanhados diariamente e, então, sacrificados a partir do 13º dia. A partir das amostras coletadas, foram determinados os níveis de anticorpos sorológicos, a frequência da população celular esplênica (células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, e linfócitos B), níveis de citocinas teciduais e análise histopatológica do tecido nervoso. Observou-se que 46% dos animais imunizados com extrato de PbN e 69% dos animais imunizados com extrato de PbA foram protegidos do desenvolvimento de malária cerebral e tiveram sua taxa de sobrevivência prolongada, entretanto, estes animais desenvolveram hiperparasitemia sanguínea, com níveis de até 38% de parasitos circulantes. Estes animais não apresentaram sinais clínicos neurológicos, o que foi confirmado macroscopicamente pela ausência de hemorragia e reduzida inflamação no cérebro em relação aos animais que evoluíram para malária cerebral. Histopatologicamente, os animais com hiperparasitemia apresentaram poucos leucócitos aderidos ao endotélio vascular e ausência de vasos obstruídos. Em relação aos níveis de citocinas (IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) e número de linfócitos esplênicos (T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, e linfócitos B), estes estiveram significativamente reduzidos nos animais que desenvolveram hiperparasitemia em relação aos que desenvolveram malária cerebral. Interessantemente, os animais imunizados foram capazes de reconhecer tanto antígenos homólogos quanto heterólogos ao utilizado durante o processo de imunização, porém, esses anticorpos pareceram não influenciar o padrão clínico apresentado pelos animais. Portanto, nosso estudo demonstra que imunizações com parasitos de baixa virulência podem induzir imunidade capaz de proteger contra cepas altamente virulentas, mas os fatores que medeiam essa proteção ainda precisam ser melhor investigados.

Palavras-chave: Malária cerebral. Hiperparasitemia. Imunização. Extrato proteico. *Plasmodium berghei*.

## ABSTRACT

The broad distribution of malaria around of the globe and the large number of clinical cases/deaths attributed to this disease turns the discovery of a safe and effective malaria vaccine an essential tool to halt the spread of the disease. Vaccines focused on the use of live parasites and crude parasites antigens have shown good results on the induction of antimalarial immunity, although it is still not clear if immunizations with low virulent strains are capable to prevent the development of symptoms of cerebral malaria. This research aim to investigate if immunizations with crude antigen of *Plasmodium berghei* NK65 (PbN), a low virulence strain non-inductive of cerebral malaria in C57BL/6 mice, are able to protect the animals against the development of cerebral malaria after challenge with *Plasmodium berghei* ANKA (PbA). Mice were immunized twice with crude antigen associated to CPG-ODN adjuvant. Thirty days after the second immunization animals were challenged with  $10^5$  red blood cells infected with *P. berghei* ANKA. Animals were daily monitored to evaluate the clinical score and parasitaemia levels. If the presence of neurological signs (score < 5) were detected, animals were euthanized and blood samples, spleen and brain were collected; animals without neurological commitment were followed daily until the 14 day post-infection. Antibodies and cytokines levels, splenic cellular population (T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> and B lymphocytes) and histopathological analysis were performed. The results showed that 46% of the animals immunized with crude antigen of PbN and 69% of the animals immunized with crude antigen of PbA were protected from the development of cerebral malaria and had their survival rate prolonged, however, these animals developed hyperparasitaemia, with levels up to 38% of circulating parasites. These animals did not present neurological signs which were confirmed macroscopically by the absence of hemorrhage and reduce brain inflammation in relation to the animals that evolved to cerebral malaria. Histopathologically, the animals with hyperparasitaemia presented few adhered leukocytes in the vascular endothelium and absence of obstructed vessels. In relation to cytokine levels and number of splenic lymphocytes, these were significantly reduced in animals that developed hyperparasitism in comparison with those who developed cerebral malaria. Interestingly, the immunized animals were able to recognize both homologous and heterologous antigens used during the immunization process, however, these antibodies did not appear to influence at the clinical condition presented by the animals. Therefore, our study demonstrates that immunizations with low virulence parasites may induce immunity capable of protecting against highly virulent strains, but the factors that mediate this protection still need to be better investigated.

Keywords: cerebral malaria, hyperparasitaemia, immunizations, crude antigen, *Plasmodium berghei*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Áreas endêmicas para malária no mundo. Adaptado de World Malaria Report, 2016.....22
- Figura 2: Regiões endêmicas para malária no Brasil. Áreas em verde escuro representam maior risco de infecção. Destacam-se as áreas no sudeste do país onde existe baixo risco de transmissão da doença. Fonte: Sistema de Vigilância em Saúde, 2015.....24
- Figura 3: Ciclo biológico de espécies de parasitos do gênero *Plasmodium*. Representação dos estágios pré-eritrocítico e eritrocítico dos parasitos. Adaptado de Mueller et al, 2009.....27
- Figura 4: Mecanismos de atuação dos anticorpos contra a infecção malárica: (A): opsonização das células parasitadas e reconhecimento da porção Fc dos anticorpos por meio receptor Fc das células fagocíticas. (B): opsonização de merozoítos pelos anticorpos medeia à fixação de componentes do sistema complemento. (C): processo de inibição celular dependente de anticorpos, com liberação de citocinas tais como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . (D): aglutinação de merozoítos. (E): opsonização dos merozoítos e bloqueio da entrada destes parasitos nas hemácias. (F): neutralização de toxinas derivadas do parasito. (G): bloqueio da liberação de parasitos das células após o processo de replicação parasitária. (H): impedir o crescimento do parasito. (I) inibição da formação de rosetas. (J): inibição do processo de adesão das células parasitadas ao endotélio vascular. Adaptado de TEO et al, 2016.....35
- Figura 5: Estratégia vacinal e de acompanhamento clínico dos animais após desafio experimental com  $10^5$  hemácias parasitadas por *P. berghei* ANKA. \*animais com escore clínico  $\leq 5$  foram eutanasiados para coleta de dados relativos a parasitemia, baço, cérebro, anticorpo e citocinas. \*\*animais com escore  $\leq 8$  foram utilizados somente para testes com azul de Evans.....49
- Figura 6: Estratégia de análise dos eritrócitos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA por meio de citometria de fluxo. A população 1 (P1) determina a população total de eritrócitos. Desta população foi determinada a população 2 (P2), que é composta por células que apresentam fluorescência verde derivada da proteína GFP

pelos parasitos. A porcentagem de parasitemia foi determinada pela porcentagem de células expressando essa proteína.....52

Figura 7: Estratégia de análise utilizada para fenotipagem das células marcadas com anticorpos anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8. As células T foram selecionadas a partir das células CD3<sup>+</sup> e, em seguida, foram identificadas as populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Da mesma forma foi realizada a seleção das células B, CD19<sup>+</sup>, que determina a porcentagem de células B no baço dos animais dos grupos experimentais.....57

Figura 8: Avaliação clínica dos animais após desafio experimental. A: Grupo de animais apenas desafiados. (n=13) B: grupo imunizado com adjuvante e desafiado com PbA (n=12). C: grupo imunizado com CpG-ODN associado a extrato proteico de PbN e desafiado com PbA (n=13). D: grupo imunizado com CPG-ODN associado a antígeno de PbA e desafiado com PbA (n=13). E: gráfico composto por todos os grupos experimentais. O desenvolvimento do quadro de malária cerebral ocorreu entre o período do dia 6 ao dia 10<sup>o</sup> dia pós-infecção com *P. berghei* ANKA.....61

Figura 9: Taxa de sobrevivência dos animais após desafio experimental. PbA: grupo apenas desafiado com *Plasmodium berghei* ANKA (n=13). CpG-ODN: grupo imunizado duas vezes com adjuvante e desafiado com PbA (n=12). CPG-ODN PbN: grupo imunizado duas vezes com extrato proteico de *Plasmodium berghei* NK65 associado ao adjuvante CPG-ODN e desafiado com PbA (n=13). CPG-ODN PbA: grupo imunizado duas vezes com extrato proteico de PbA associado ao adjuvante CPG-ODN e desafiado com PbA (n=13). Em vermelho está representado o período para desenvolvimento de malária cerebral em camundongos C57BL/6 em infecções por PbA. ....62

Figura 10: Níveis de parasitemia apresentados pelos animais após desafio experimental. PbA: grupo apenas desafiado com *Plasmodium berghei* ANKA. CpG-ODN: grupo imunizado duas vezes com adjuvante e desafiado com PbA. CPG-ODN PbN: grupo imunizado duas vezes com extrato proteico de PbN associado ao adjuvante CPG-ODN e desafiado com PbA. CPG-ODN PbA: grupo imunizado duas vezes com extrato proteico de PbA associado ao adjuvante CPG-ODN e desafiado com PbA. Em vermelho está representado o período para desenvolvimento de malária cerebral em camundongos C57BL/6 em infecções por PbA. ....64

Figura 11: Fotografias macroscópicas do cérebro dos animais que desenvolveram quadro de malária cerebral e hiperparasitemia. A, D e G: foto da calota craniana dos animais controle, animais com malária cerebral e hiperparasitemia respectivamente. As fotos B, E e H demonstram a calota craniana após o processo de marcação com azul de Evans dos animais controle, animais com malária cerebral e hiperparasitemia respectivamente. C, J, I: cérebro dos animais controle, com malária cerebral e hiperparasitemia após remoção da calota craniana. ....67

Figura 12: Histopatologia do cérebro de animais controle (A e B), animais que desenvolveram quadro de malária cerebral (C e D) e de animais que desenvolveram hiperparasitemia (E e F). Nas imagens A e B: camundongos controle, vasos desobstruídos. C e D: camundongos com MC, C: região de hemorragia no tecido cerebral com presença de diversas hemácias; D: vaso sanguíneo na região da meninge obstruído por hemácias e leucócitos. E e F: cérebro de camundongos com HP: E: vaso sanguíneo da meninge cerebral com dois leucócitos aderidos e duas hemácias. F: vaso sanguíneo com adesão de leucócito. \*: vaso sanguíneo; seta branca: hemácias; cabeça de seta branca: hemácia parasitada por *P. berghei* ANKA; seta preta: leucócito com hemozoína; cabeça de seta preta: leucócitos. Barra: 10 µm, aumento de 100x.....68

Figura 13: Concentração de citocinas detectadas por ELISA a partir de homogenato de cérebro. IFN-γ: interferon gama; TNF-α: fator de necrose tumoral alfa; IL-10: interleucina 10. MC: animais que desenvolveram quadro clínico de malária cerebral. HP: animais que desenvolveram quadro de hiperparasitemia após desafio experimental. MC: malária cerebral; HP: hiperparasitemia. ....70

Figura 14: (A) Peso dos animais antes e depois do desafio experimental e (B) índice esplênico apresentado pelos grupos após o desafio. Controle: animais não imunizados e não desafiados. PbA: grupo apenas desafiado com *Plasmodium berghei* ANKA. CpG-ODN: grupo imunizado duas vezes com adjuvante e desafiado com PbA. CPG-ODN PbN: grupo imunizado duas vezes com extrato proteico de *Plasmodium berghei* NK65 associado ao adjuvante CPG-ODN e desafiado com PbA. CPG-ODN PbA: grupo imunizado duas vezes com extrato proteico de PbA associado ao adjuvante CPG-ODN e desafiado com PbA MC: animais que desenvolveram quadro de malária cerebral. HP: animais que desenvolveram quadro de hiperparasitemia sanguínea. \*\* $p=0,001$ ; \*\*\* $p=0,0001$  .....72

Figura 15: número de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup> e linfócitos B presentes no baço dos animais após desafio experimental. Controle: animais não imunizados e não desafiados. MC: animais com quadro clínico de malária cerebral. HP: animais com quadro clínico de hiperparasitemia. \* $p < 0,05$  .....74

Figura 16: Níveis de anticorpos IgG detectados no soro dos animais experimentais. A: índice de reatividade (IR) apresentado pelos anticorpos IgG no reconhecimento de antígenos de *P. berghei* NK65. B: IR apresentado pelos anticorpos IgG presentes no soro dos animais que desenvolveram MC e HP nos grupos CpG-ODN PbN e CpG-ODN PbA no reconhecimento de antígenos de PbN. C: IR apresentado pelos anticorpos IgG no reconhecimento de antígenos de *P. berghei* ANKA. D: IR apresentado pelos anticorpos IgG presentes no soro dos animais que desenvolveram MC e HP nos grupos CpG-ODN PbN e CpG-ODN PbA no reconhecimento de antígenos de PbA. ....76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Esquematização dos grupos experimentais .....	48
Tabela 2: Escala rápida de avaliação do coma e comportamento murino. Adaptada de Carroll et al, 2010 .....	103

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
a. C	Antes de Cristo
ADCI	Inibição celular dependente de anticorpo
AMA-1	Antígeno de membrana apical-1
CD36	<i>Cluster of differentiation 36</i>
Células NK	Células natural killer
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CSP	Proteína circunsporozoíta
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DP	Desvio Padrão
g	Gramma
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> – proteína verde fluorescente
GPI	Glicofosfatidilinositol
HP	Hiperparasitemia
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IFN-γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IR	Índice de reatividade
L	Litro
M	Molar
MC	Malária cerebral
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MSP-1	Proteína de superfície de merozoítos 1
MSP-2	Proteína de superfície de merozoítos 2
N	Normal
nm	Nanômetro



PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PbA	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA
PbN	<i>Plasmodium berghei</i> NK65
PfEMP1	Proteína 1 de membrana do eritrócito de <i>Plasmodium falciparum</i>
pg	Picograma
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
QSP	Quantidade suficiente para
RHs	Proteínas homólogas ligantes de reticulócitos
RMCBS	<i>Rapid murine coma and behaviour scale</i> - Escala rápida de coma e comportamento murino
RPM	Rotações por minuto
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral
TRAP	Proteína adesiva relacionada à trombospondina
VCAM-1	Molécula de adesão vascular 1

## SUMÁRIO

1	Introdução .....	21
1.1	A malária .....	21
1.2	Ciclo biológico dos plasmódios humanos.....	25
1.3	Sintomatologia da infecção: malária não complicada e complicada .....	28
1.4	Imunidade antimalária .....	31
1.4.1	Imunidade inata .....	31
1.4.2	Imunidade Humoral .....	33
1.5	Vacinas antimaláricas: passado e presente .....	36
1.5.1	Vacinas contra estágio pré-eritrocítico dos plasmódios.....	36
1.5.2	Vacinas contra plasmódios de estágio sanguíneo.....	39
1.5.3	Vacinas que utilizam proteínas recombinantes como antígenos .....	40
2	Justificativa.....	42
3	Objetivo .....	44
3.1	Objetivo Geral .....	44
3.2	Objetivos Específicos .....	44
4	Metodologia.....	45
4.1	Animais .....	45
4.2	Produção de extrato bruto.....	45
4.3	Desenho experimental .....	47
4.3.1	Grupos experimentais.....	47
4.3.2	Imunização dos animais .....	49
4.4	Avaliação clínica dos animais após desafio experimental e delineamento da curva de sobrevivência dos animais .....	50
4.5	Avaliação da carga parasitária dos animais imunizados .....	51
4.6	Análise macroscópica de áreas de hemorragia no cérebro e da permeabilidade vascular dos animais experimentais.....	52
4.7	Processamento tecidual e confecção de lâminas histológicas.....	53

4.8	Extração de citocinas do cérebro.....	54
4.9	ELISA de citocinas.....	54
4.10	Determinação do índice esplênico.....	56
4.11	Marcação fenotípica de linfócitos presentes no baço dos animais eutanasiados.....	56
4.12	Determinação dos níveis de anticorpo sorológicos em animais imunizados por meio da técnica de ELISA.....	58
4.13	Testes estatísticos.....	59
5	Resultados.....	60
5.1	Análise da eficácia da vacinação com extrato bruto de PbN contra o desenvolvimento de malária cerebral em animais C57BL/6 desafiados com PbA.....	60
5.2	Determinação dos níveis de parasitos circulantes em animais imunizados com antígeno proteico de PbN e desafiados experimentalmente com PbA.....	63
5.3	Avaliação macroscópica e histopatológica do cérebro de animais imunizados apresentando malária cerebral e hiperparasitemia.....	65
5.4	Análise dos níveis de citocinas anti-inflamatórias (IL-10) e pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ ) no cérebro dos camundongos segundo padrão clínico apresentado.....	69
5.5	Impacto das imunizações na perda de peso e na atividade esplênica dos animais imunizados com antígeno proteico de PbN e PbA associado ao adjuvante CPG-ODN.....	71
5.6	Análise da população celular presente no baço dos animais.....	73
5.7	Avaliação da ocorrência de imunidade humoral transcendente a cepa em animais imunizados com antígeno proteico de PbN e PbA associado ao adjuvante CPG-ODN.....	75
6	Discussão.....	77
6.1	Imunização com extrato proteico de PbN é capaz de induzir proteção contra desenvolvimento de malária cerebral em modelo murino.....	78
6.2	Índice esplênico e sua relação com imunidade antimalárica.....	81

6.3	Análise da população esplênica e dos níveis de anticorpos sorológicos e sua relação com a imunidade antimalárica .....	83
7	Conclusões .....	86
8	Referências Bibliográficas.....	87
	ANEXOS .....	101
	ANEXO I .....	102
	ANEXO II .....	103

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A malária

Malária, paludismo e doença dos pântanos são algumas das diversas denominações atribuídas à doença parasitária causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, a qual ainda hoje assume grande importância na saúde pública mundial (WHO, 2016).

A existência da malária ameaçando populações humanas é muito antiga. Menção a doença é encontrada desde em tábuas originadas da Mesopotâmia até papiros egípcios e documentos chineses que datam de até 2700 a.C.; estes descrevem sintomas clássicos que ocorrem durante a doença (COX, 2010). No ano de 2010, um estudo publicado na revista *Journal of the American Association* sugere, baseado em evidências moleculares, que a morte do faraó Tutancâmon teria ocorrido graças à infecção malárica já que o DNA do parasito pôde ser detectado no material mumificado (HAWASS, 2010).

Historicamente, a malária foi inicialmente descrita como miasmas que afetavam habitantes de áreas pantanosas. Entretanto, as descobertas microbiológicas realizadas por Pasteur e Koch no final do século XIX permitiram o início da busca pelo agente causador da malária. Alphonse Laveran, analisando o sangue fresco de pacientes sintomáticos, pôde observar “pigmentos” presentes em leucócitos e em eritrócitos, que não estavam presentes no sangue de pacientes saudáveis. Assim, Laveran conseguiu descrever que a doença que afligia a população era causada por um protozoário e não por bactérias como se acreditava até então. Além disso, Laveran também descreveu as formas eritrocíticas do parasito. Essas descobertas permitiram a Laveran ser laureado com o Prêmio Nobel de Medicina em 1907 (COX, 2010).

Atualmente, segundo a Organização Mundial da Saúde, a malária é a doença parasitária de maior incidência mundial (WHO, 2016). Altamente debilitante, especialmente para crianças com menos de 5 anos e gestantes. A malária está presente nas regiões tropicais e subtropicais do globo, onde as condições ambientais e de moradia favorecem sua propagação. Atualmente a doença é

endêmica em 93 países, sendo os mais elevados índices de mortalidade e morbidade notificados nos países localizados nos continentes africano e asiático (Figura 1) (GUERRA; SNOW; HAY, 2006). Em 2016 foram relatados aproximadamente 216 milhões de casos clínicos de malária no mundo e cerca de 400 mil óbitos; 90% desses óbitos foram atribuídos a *P. falciparum* e ocorreram nos países endêmicos da África subsaariana (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Cinco espécies de *Plasmodium* são capazes de causar malária em humanos: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. knowlesi*, *P. ovale* e *P. malariae*. As infecções por *P. vivax* ocorrem principalmente no sudeste do continente Asiático e nas Américas. Por outro lado, *P. falciparum* predomina no continente africano estando ainda associado ao maior índice de casos graves associados à doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

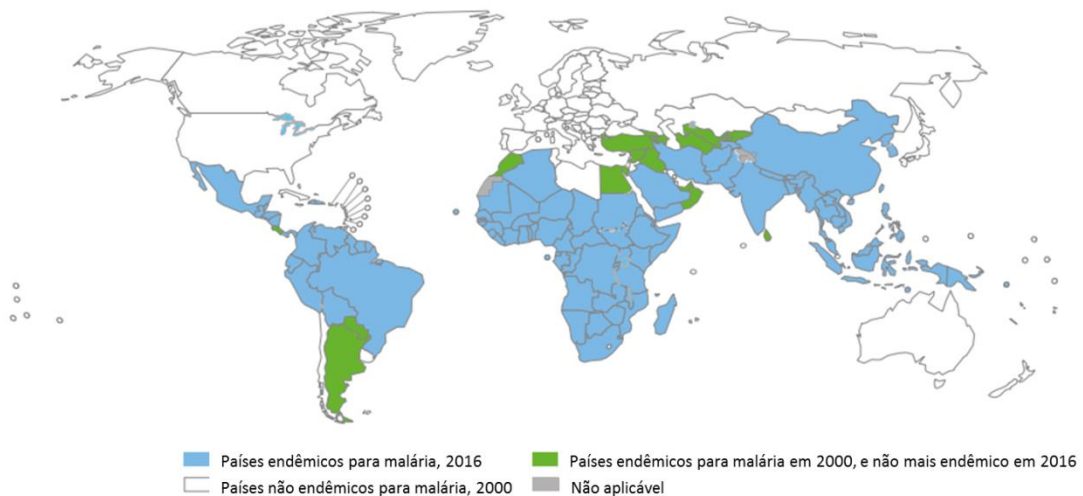


Figura 1: Áreas endêmicas para malária no mundo. Adaptado de World Malaria Report, 2016.

No Brasil, desde o século XX, a malária constitui um preocupante problema de saúde pública. Dentre os mais marcantes episódios na história da malária no país está a introdução do mosquito *Anopheles arabiensis* (inicialmente identificado como *Anopheles gambiae*), trazido por navios do Senegal, na região nordeste do Brasil em 1930. Essa espécie foi responsável por um dos maiores surtos da doença já registrados no país: em somente 8 meses foram registrados 150 mil casos clínicos e cerca de 14 mil mortes atribuídos a malária (FERREIRA; CASTRO, 2016). Já na região amazônica, as ondas migratórias proporcionaram a ocorrência de milhares de novos casos da doença. Uma dessas ondas migratórias foi ocasionada pela construção da Estrada de Ferro Madeira Mamoré, que tinha o intuito de ligar a Bolívia a Porto Velho com o objetivo de escoar a borracha produzida na região. Durante o período de construção dessa estrada, milhares de trabalhadores sucumbiram ao óbito graças às más condições de moradia, invasão descontrolada da floresta, falta de infraestrutura para a organização da população (KATSURAGAWA et al., 2008).

Aqui, a doença é causada por três espécies plasmódios: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*. A transmissão de *P. vivax* é a mais predominante estando associada a 88% dos casos registrados anualmente na região da Amazônia Legal. A Amazônia Legal é uma divisão política formada pelos estados do Amazonas, Pará, Acre, Rondônia, Amapá, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão. Juntas, estes estados são responsáveis por 99% dos casos de malária registrados no Brasil (Figura 2). Fora da região Amazônica a maioria dos casos de malária não é autóctone sendo, portanto, importados de áreas endêmicas. Contudo, esporadicamente, casos autóctones têm sido registrados em regiões de Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro e Espírito Santo (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016; SVS/MS, 2015).

Sobre a situação epidemiológica da malária no Brasil, em 2015 foram registrados 131.749 casos clínicos da doença, sendo a maior parte deles oriundos dos estados do Amazonas e do Acre. Em contraste ao alto número de casos ocorridos em 2015, apenas 35 óbitos foram registrados, 31% deles fora da região amazônica (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016; SVS/MS, 2015). Apesar da existência de campanhas de controle da doença baseadas no diagnóstico e tratamento rápido dos casos e no combate ao inseto vetor, no ano de 2017 foi

registrado um aumento do número de casos em 25% (175.855) comparados aos dados de 2015.

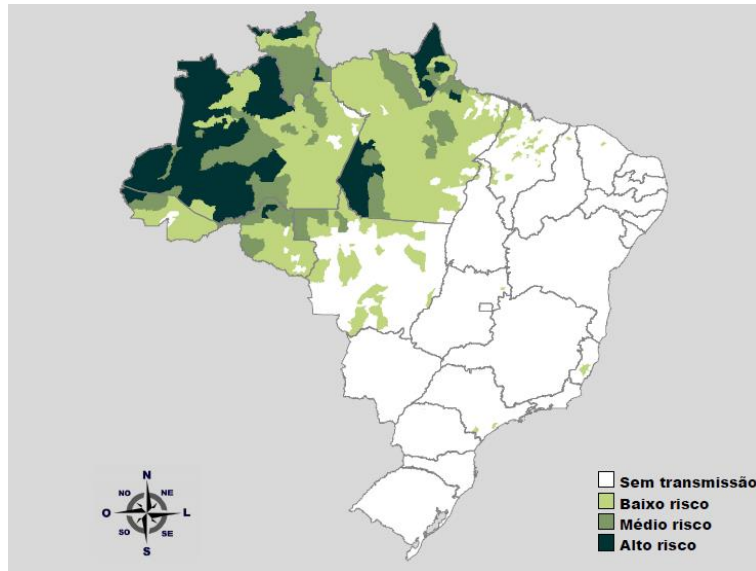


Figura 2: Regiões endêmicas para malária no Brasil. Áreas em verde escuro representam maior risco de infecção. Destacam-se as áreas no sudeste do país onde existe baixo risco de transmissão da doença. Fonte: Sistema de Vigilância em Saúde, 2015.



## 1.2 Ciclo biológico dos plasmódios humanos

A malária é uma doença parasitária ocasionada por protozoários unicelulares pertencentes ao gênero *Plasmodium*. O gênero é pertencente ao filo de protozoários Apicomplexa, no qual todos os seus representantes são parasitos intracelulares obrigatórios.

Os plasmódios são parasitos heteroxênicos, necessitando de dois hospedeiros para completar seu ciclo biológico (Figura 3). O hospedeiro invertebrado, mosquitos fêmea do gênero *Anopheles*, carregam as formas esporozoítas do parasito atuando, portanto, como vetor da doença. Durante a realização do repasto sanguíneo os esporozoítos são injetados pelos mosquitos na derme do hospedeiro vertebrado, juntamente com substâncias vasodilatadoras e anticoagulantes presentes na saliva do mosquito anofelino. Essas substâncias presentes na saliva do inseto facilitam tanto a ingestão de sangue e como a passagem dos esporozoítos para os capilares sanguíneos, dando continuidade ao ciclo do parasito (RIBEIRO, 1987).

Uma vez injetados na derme do hospedeiro, os esporozoítos podem seguir pelo menos três destinos: 1) podem ficar retidos na derme após exaustão celular e serem posteriormente degradados; 2) podem adentrar os vasos do sistema linfático, onde estas formas do parasito serão drenadas até o linfonodo mais próximo onde serão degradados (AMINO et al., 2006); 3) podem alcançar a corrente sanguínea por meio de movimentos tipo “*gliding*” proporcionada principalmente pela proteína adesiva relacionada a trombospondina (TRAP) (TROTTEIN; TRIGLIA; COWMAN, 1995) presente na superfície celular dos parasitos, juntamente com a proteína circusporozoíta (CS), que permite a movimentação dos mesmos até a entrada nos capilares locais (COWMAN et al., 2016; SOLDATI; FOTH; COWMAN, 2004).

Quando os esporozoítos alcançam a corrente sanguínea, chegam rapidamente aos capilares dos sinusoides do fígado, onde invadirão os hepatócitos. O processo migratório entre a derme e a chegada aos sinusoides hepáticos ocorre entre uma e três horas após a inoculação dos esporozoítos (YAMAUCHI et al., 2007). Devido ao curto tempo entre a entrada no hospedeiro e a invasão celular, os esporozoítos conseguem evadir o sistema imunológico do hospedeiro. Entretanto,

em indivíduos imunes, os anticorpos parecem ser capazes de opsonizar os esporozoítos impedindo sua invasão celular (EPSTEIN et al., 2017; MORDMÜLLER et al., 2016).

Os esporozoítos de *Plasmodium* são capazes de migrar por entre diversos tipos celulares, entretanto, a infecção e desenvolvimento inicial no hospedeiro vertebrado ocorrerão a partir da invasão de hepatócitos, os quais expressam altos níveis de moléculas de heparan-sulfato (COPPI et al., 2007; COWMAN et al., 2016). Ao alcançar o fígado, os esporozoítos entram ativamente nos hepatócitos sendo essa passagem proporcionada pela interação entre proteínas adesivas de membrana celular e receptores específicos expressos pelas células hepáticas (PRUDÊNCIO; RODRIGUEZ; MOTA, 2006). Durante o processo de reconhecimento e invasão celular, os parasitos utilizam distintas proteínas presentes nas organelas do complexo apical, tais como roptrías, micronemas, e anel polar apical (MORRISSETTE; SIBLEY, 2002).

Uma vez dentro dos hepatócitos, inicia-se o processo de reprodução assexuada dos parasitos denominada esquizogonia tecidual. Por meio desse processo, serão originados milhares de merozoítos hepáticos, os quais serão liberados na corrente sanguínea envoltos em vesículas denominadas merossomas. Na corrente sanguínea, os merossomas liberam, por meio de mecanismos ainda não elucidados, milhares de merozoítos permitindo o início do ciclo eritrocítico do parasito (STURM et al., 2006).

A invasão eritrocítica ocorre rapidamente, impedindo que o sistema imunológico seja capaz de impedir completamente a interação entre receptores celulares e ligantes expressos na superfície celular dos parasitos (COWMAN; CRABB, 2006). Proteínas como a Proteína 1 de Superfície de Merozoítos (MSP-1), proteínas homólogas ligantes de reticulócitos (RHs), assim como as proteínas derivadas do complexo apical (AMA1- Antígeno 1 de Membrana Apical), são essenciais no processo de reconhecimento e invasão celular dos eritrócitos (COWMAN; CRABB, 2006). Após invadirem as hemácias, os parasitos iniciam um novo ciclo de reprodução assexuada, passando pelos estágios de trofozoítos jovens, trofozoítos maduros e posteriormente esquizontes multinucleados. Cada esquizonte é responsável pela formação de milhares de merozoítos sanguíneos que romperão a membrana celular e darão início a um novo ciclo de invasão eritrocítica.

Durante o ciclo eritrocítico pode haver a formação de gametócitos, que são as formas evolutivas do parasito capazes de continuar seu desenvolvimento em mosquitos anofelinos, por meio de reprodução sexuada, dando origem a oocistos e posteriormente a esporozoítos.

Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale* parte dos esporozoítos que invadem os hepatócitos entram em estado de latência, sendo chamados de hipnozoítos. Estes, quando ativados (após 3 meses da infecção), levam ao desenvolvimento da doença clínica (World Health Organization, 2015).

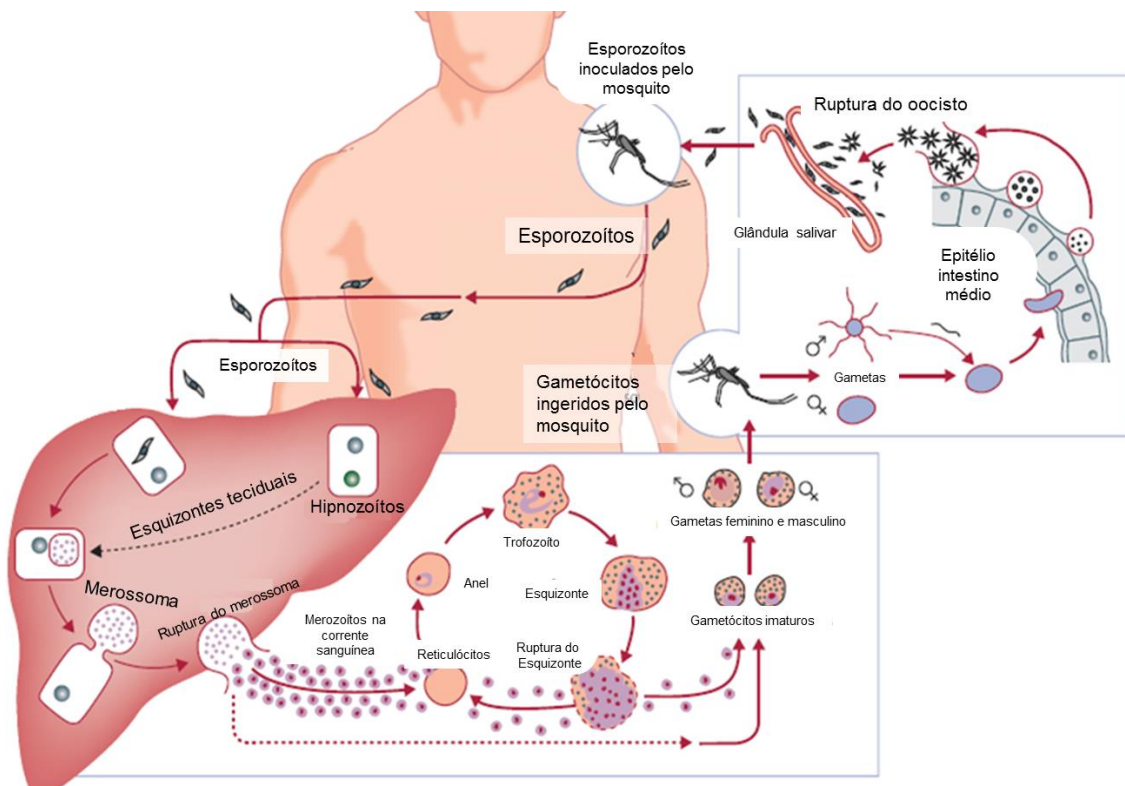


Figura 3: Ciclo biológico de espécies de parasitos do gênero *Plasmodium*. Representação dos estágios pré-eritrocítico e eritrocítico dos parasitos. Adaptado de Mueller et al, 2009

### 1.3 Sintomatologia da infecção: malária não complicada e complicada

Independentemente da espécie de plasmódio infectante, os sintomas clássicos da malária humana, tais como calafrios, febre e dor de cabeça, dentre outros, são decorrentes exclusivamente do ciclo eritrocítico do parasito. Especificamente, com o rompimento das hemácias, proteínas e produtos oriundos do metabolismo do parasito, tais como, glicofosfatidilinositol (GPI) (CAMPOS et al., 2001; TACHADO et al., 1995) e a hemozoína (DOSTERT et al., 2009; PARROCHE et al., 2007), são liberados para a circulação sanguínea estimulando, assim, o aparecimento dos ciclos febris característicos da doença. A doença, quando representada somente pelos sintomas clássicos é denominada malária não complicada.

A infecção, no entanto, pode se agravar se não for tratada eficientemente. Normalmente, os casos graves são atribuídos a infecções por *P. falciparum* e mais raramente a *P. vivax* e ocorrem em indivíduos não expostos previamente ao parasito, e em indivíduos imunossuprimidos. A malária grave ou complicada pode ser definida com base em diversos quadros clínicos denominados malária cerebral, anemia grave, síndrome da angústia respiratória, acidose metabólica, falência renal aguda, hipoglicemia, e malária placentária (GOMES et al., 2011; WASSMER; GRAU, 2016). Enquanto alguns desses quadros clínicos ocorrem predominantemente em infecções causadas por *P. falciparum*, outros são mais facilmente observados em infecções por *P. vivax* (ANSTEY et al., 2009).

A malária cerebral é caracterizada pela adesão de eritrócitos infectados por trofozoítos maduros e esquizontes de *P. falciparum*, bem como de leucócitos, à microvasculatura cerebral causando danos teciduais (BERENDT; TUMER; NEWBOLD, 1994; CLARK; ROCKETT, 1994; Revisto por GOOD et al., 2005). A adesão dos parasitos ao epitélio vascular dos capilares ocorre de maneira sistêmica sendo considerado um mecanismo de escape do parasito uma vez que tal processo dificulta que o mesmo seja eliminado pelo baço (Revisto por ENGWERDA; BEATTIE; AMANTE, 2005).

O processo de adesão endotelial ocorre pela interação entre proteínas expressas pelos parasitos (especialmente a PfEMP-1) e receptores expressos pelo

hospedeiro (EX: ICAM-1, VCAM-1, CD36, trombospondina, E-selectina, CSA). A adesão de hemácias infectadas no endotélio ocasiona a obstrução dos capilares cerebrais por meio de distintos processos como a formação de rosetas e aglomerados celulares. As rosetas são caracterizadas por serem conjuntos de hemácias infectadas e não infectadas aderidas ao endotélio por meio de receptores CD36, P-selectina e outros receptores (PAIN et al., 2001; WASSMER; GRAU, 2016; WASSMER; TAYLOR; ALEXANDER, 2008). Os eritrócitos se aderem entre si por meio da ligação cruzada entre carboidratos expressos na membrana celular do hospedeiro e a PfEMP-1 expressa na superfície de hemácias infectadas (STEVENSON et al., 2015). Já os aglomerados celulares caracterizam-se pela presença de plaquetas aderidas à hemácias e às células endoteliais (PAIN et al., 2001; WASSMER; TAYLOR; ALEXANDER, 2008).

A inflamação local tecidual proporciona um aumento da expressão de integrinas de adesão endotelial e levam ao acúmulo de leucócitos no local, que, por sua vez, produzem quimiocinas tais como CXCL10, CCL5, CCL2, capazes de recrutar para o local neutrófilos, macrófagos, células T, células NK, as quais darão continuidade ao processo inflamatório. Os aglomerados celulares e as rosetas contribuem para o bloqueio da passagem do fluxo sanguíneo, levando a hipóxia tecidual e a resposta inflamatória exacerbada, aquela, por sua vez, leva a danos teciduais intensos e conseqüentemente aos sintomas graves da doença como, por exemplo, hemorragias cerebrais, danos neurológicos permanentes, coma e a morte do paciente (Revisto por SCHOFIELD; GRAU, 2005).

A anemia grave, por sua vez, pode ocorrer em infecções causadas *P. vivax* e por *P. falciparum*, embora seja muito mais notável nas infecções por *P. vivax* (Revisto por ANSTEY et al., 2009). Primeiramente, durante a infecção malárica, há um aumento da destruição de hemácias, dentre elas, estão inclusas hemácias infectadas e não infectadas. Essa destruição se deve à externalização de fosfatidilserina e/ou proteínas do parasito em hemácias infectadas e à diminuição na deformabilidade destas células provocadas pelos parasitos. Essas alterações levam a fagocitose e destruição dos eritrócitos por macrófagos residentes no baço (ABDALLA, 1988). Por outro lado, a destruição de hemácias sadias está associada à adsorção de antígenos do parasito (ex: hemozoína) na superfície dessas células. Estudos já demonstraram que para cada hemácia parasitada por *P. vivax* 32 sadias são destruídas pelo baço, enquanto em infecções por *P. falciparum*, para cada

hemácia parasitada outras 8 não parasitadas são destruídas. Dessa forma é notável que a anemia não possui qualquer relação com a taxa de parasitos circulantes (Revisto por ANSTEY et al., 2009). Outro fator fundamental para o estabelecimento do quadro de anemia nas infecções maláricas é a supressão da atividade eritropoiética da medula. Isso se deve ao aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  que impedem a resposta de precursores eritrocíticos à eritropoietina (RUDIN et al., 1997; WICKRAMASINGHE et al., 1989).

Outras síndromes associadas à malária grave são relacionadas à acidose metabólica. Esse quadro engloba a síndrome pulmonar aguda e a acidose láctica, sendo a primeira associada ao bloqueio mecânico de capilares alveolares que impedem a passagem de células carregando moléculas de oxigênio, e também devido a mecanismos pró-inflamatórios que destroem o tecido levando a injúria tecidual. Já a acidose láctica ocorre principalmente pelo acúmulo de ácido láctico nos tecidos e graças à falta de oxigenação tecidual, hipoglicemia e produção de citocinas pró-inflamatórias que contribuem pra formação do lactato, entre outras causas (AGBENYEGA et al., 2000).

Outro quadro importante, derivado do agravamento das infecções maláricas, é o desenvolvimento de malária placentária. Esta é caracterizada pelo acúmulo de eritrócitos infectados nos espaços intervilosos da placenta, além da infiltração de monócitos e demais leucócitos. As proteínas *PFEMP-1* expressas na superfície dos eritrócitos infectados se ligam em receptores sulfatados de condroitina A presentes na superfície dos capilares placentários, locais com menor resposta imunológica (FRIED; DUFFY, 1996). Consequências geradas pela malária placentária incluem risco de parto prematuro com nascimento de crianças com baixo peso e morte dos recém-nascidos e da gestante. Interessantemente, durante o desenvolvimento do quadro de malária placentária, as gestantes não apresentam sintomas da infecção aguda estando todo dano voltado para a placenta (SCHOFIELD; GRAU, 2005).

## 1.4 Imunidade antimalária

Até os dias atuais o entendimento dos fatores que levam ao desenvolvimento de uma resposta imunológica robusta e eficiente durante a infecção malárica ainda constitui um grande desafio para a comunidade científica. A ampla variedade de elementos que podem influenciar nesse processo variam desde a idade e o estado imunológico do hospedeiro até o complexo ciclo de vida e os mecanismos de escape apresentados pelos parasitos.

De qualquer forma, sabe-se que tanto a imunidade inata quanto a adquirida são importantes no controle da infecção. Essas serão discutidas a seguir.

### 1.4.1 Imunidade inata

A resposta imune é crucial para o controle de qualquer infecção até que a imunidade adquirida se estabeleça. Em relação a malária, em indivíduos primoinfectados, a resposta imune inata torna-se essencial para o controle da parasitemia sanguínea até que a resposta imune adaptativa seja alcançada (ARTAVANIS-TSAKONAS; RILEY, 2002; BACCARELLA et al., 2013; COHEN, S; MCGREGOR, I. A.; CARRINGTON, 1961; Revisto por DOOLAN; DOBAÑO; BAIRD, 2009; Revisto por STEVENSON; RILEY, 2004). Durante a resposta inata, a fagocitose de produtos derivados de eritrócitos e células infectadas faz com que macrófagos sejam ativados e produzam citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-6, IL-1, IL-18 e IFN- $\gamma$  que auxiliarão na ativação de células NK, macrófagos e células T, levando a ativação da resposta imune adquirida. Essas células ou mediadores inflamatórios produzidos por elas podem atuar contribuindo para o controle da parasitemia (Revisto por ARTAVANIS-TSAKONAS; TONGREN; RILEY, 2003).

Dentre as células do sistema imune inato, as células NK (*Natural Killer*), importantes produtoras de IFN- $\gamma$ , têm sido consideradas de fundamental relevância para o controle da parasitemia sanguínea, como demonstrado em infecções murinas por *Plasmodium chabaudi chabaudi* (MOHAN; MOULIN; STEVENSON, 1997). No entanto, essas células não são capazes de promover a completa eliminação dos parasitos (STEVENSON; RILEY, 2004). Ativadas pelas citocinas IL-12 e IL-18

produzidas por células apresentadoras de antígenos, essas células passam a produzir IFN- $\gamma$ , essencial para a ativação de linfócitos e macrófagos (Revisto por ARTAVANIS-TSAKONAS; RILEY, 2002).

Os macrófagos atuam como células apresentadoras de antígenos e tem papel importante na fagocitose de células parasitadas. Entretanto, o seu papel é essencial durante a mediação de inibição celular dependente de anticorpos, e também quando produz óxido nítrico e IFN- $\gamma$  para ativação de células TCD4<sup>+</sup> (RILEY; STEWART, 2013; STEVENSON; RILEY, 2004).

As células T $\gamma\delta$  são responsáveis pelo reconhecimento de antígenos de origem lipídica e, durante a infecção malárica, não parecem ser relacionadas ao controle da parasitemia, entretanto tem papel importante no desenvolvimento de malária cerebral, uma vez que em sua ausência não há ocorrência de doença cerebral grave (Revisto por SCHOFIELD; GRAU, 2005; STEVENSON; RILEY, 2004; YANEZ et al., 1999). A ativação desse tipo celular ocorre de forma secundária, por meio de estímulos de citocinas devido à necessidade de sinalização através da cadeia  $\gamma$  (ELLOSO et al., 1996).

Os linfócitos TCD8<sup>+</sup> atuam principalmente contra as formas exo-eritrocíticas dos parasitos (MALIK et al., 1991). A resposta imunológica baseada nesse tipo celular geralmente consiste na produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , granzimas e perforinas, as quais atuam de forma a impedir o desenvolvimento do parasito dentro do hepatócito (MONTES DE OCA et al., 2016; SEGUIN et al., 1994). Essas células são estimuladas nos linfonodos via IL-2 produzidas por células TCD4<sup>+</sup> ativadas (AMANTE et al., 2010).

Diversos estudos já demonstraram o importante papel desempenhado pelas células T CD4<sup>+</sup> durante a proteção contra a infecção malárica (HIRUNPETCHARAT et al., 1999; PINZON-CHARRY et al., 2010; STANISIC; GOOD, 2015). Estas células, ativadas por IL-12 produzidas por células dendríticas (AMANTE et al., 2010), possuem papel crítico na coordenação da resposta imunológica por meio de liberação de citocinas e substâncias que medeiam lise celular em todas as fases do ciclo do parasito. Essas células também auxiliam linfócitos B na resposta antigênica, permitindo a troca de classe de anticorpos, levando a produção de anticorpos de alta afinidade e também participam na ativação e expansão de células T CD8<sup>+</sup> e macrófagos durante a resposta imunológica por meio da produção de IFN- $\gamma$ . As células auxiliares T CD4<sup>+</sup>, juntamente com a ação do



IFN- $\gamma$ , realizam um importante papel no controle do crescimento da parasitemia sanguínea, possivelmente levando a um controle da infecção (AMANTE et al., 2010). Por outro lado, a presença de células T CD4<sup>+</sup>, assim como as células T CD8<sup>+</sup>, parece ser crítica durante o desenvolvimento da patologia da malária grave, uma vez que podem estimular inflamação tecidual e conseqüentemente um aumento das lesões, além de contribuir para o aumento da adesão de células ao endotélio tecidual (AMANTE et al., 2010; HERMSEN et al., 1997).

#### **1.4.2 Imunidade Humoral**

Dentre os diversos mecanismos envolvidos na proteção à malária, destaca-se o papel dos anticorpos durante a infecção. O importante papel dos anticorpos durante a infecção malárica é observado há anos e suas funções sempre foram alvos de investigação. Cohen e colaboradores em 1961 observaram que a transferência passiva de anticorpos de indivíduos imunes expostos à malária para indivíduos infectados amenizou os sintomas apresentados por estes durante a infecção; assim, os anticorpos teriam um papel na proteção anti-doença mediada pelo controle do crescimento parasitário (COHEN, S; MCGREGOR, I. A.; CARRINGTON, 1961). Corroborando tais observações, sabe-se que crianças recém-nascidas possuem menores chances de desenvolver sintomas relacionados à malária nos seis primeiros meses de vida, uma vez que a transferência de anticorpos da mãe imune para o filho durante a gestação permite que haja proteção contra o desenvolvimento da doença (Revisto por RILEY et al., 2001).

Dentre os mecanismos pelos quais os anticorpos atuam no combate ao desenvolvimento do parasito está o bloqueio da entrada dos parasitos às células hospedeiras; os anticorpos podem impedir o início da infecção quando opsonizam os parasitos, bloqueando a interação entre proteínas expressas pelos esporozoítos e merozoítos a receptores celulares expressos em células específicas do hospedeiro. Esse bloqueio impede, portanto, que haja a interação entre receptor-ligante e conseqüentemente a entrada do parasito em hepatócitos (BOUHAROUN-TAYOUN et al., 1990) e eritrócitos (REILING et al., 2010).

Os anticorpos podem opsonizar merozoítos e ligar a sua porção Fc aos componentes do sistema complemento, ativando-o pela via clássica, o que desencadeia processos de lise dos parasitos, auxiliando na diminuição da carga parasitária sanguínea (BOYLE et al., 2015). Entretanto já foram descritos que os parasitos possuem vias alternativas que possibilitam a evasão da resposta pelo sistema complemento (KENNEDY et al., 2016).

Os anticorpos opsonizantes também podem atuar pela ligação da sua porção Fc a receptores presentes nas células fagocíticas (receptores (FcγRI, FcγRIIa/b, FcγRIII)), assim, ativando essas células a iniciarem mecanismos capazes de destruir tanto a parasitos livres na circulação quanto aqueles que já invadiram suas células hospedeiras (HILL; SCHOFIELD; WILSON, 2017)

O processo de opsonização dos merozoítos e das células infectadas pelos parasitos desencadeiam o mecanismo conhecido como inibição celular dependente de anticorpos (ACDI). Este processo consiste na interação de monócitos com anticorpos opsonizantes. Nesse caso, os anticorpos medeiam a ação entre a célula fagocítica e a célula parasitada, juntamente a fatores solúveis ainda não identificados (BOUHAROUN-TAYOUN et al., 1995). O mecanismo de morte dos parasitos durante o processo de ACDI ainda não foi bem elucidado mas, alguns estudos têm proposto que TNF- $\alpha$  seja um dos fatores solúveis envolvido na interação anticorpo-receptor Fc das células fagocíticas (HILL; SCHOFIELD; WILSON, 2017).

Quando opsonizados por IgGs os merozoítos podem ainda ser fagocitados por neutrófilos, que estão presentes em grande número compondo as células periféricas do sistema imunológico. Estas células tem capacidade de matar os merozoítos por meio da produção de espécies reativas do oxigênio e óxido nítrico, promovendo o chamado *burst* respiratório (JOOS et al., 2010). Este processo leva a remoção dos merozoítos da corrente sanguínea e impede, em parte, que estes deem continuidade ao ciclo sintomático da doença (GREVE et al., 1999)

Os anticorpos opsonizantes ainda são capazes de opsonizar eritrócitos infectados pelos plasmódios e esse processo impede a formação de rosetas entre as células infectadas e não infectadas, impede também que haja adesão destas células ao endotélio capilar, além de bloquear o rompimento destas células e a liberação de novos parasitos na corrente sanguínea (RAJ et al., 2014).

Dada a grande importância dos anticorpos na imunidade antimalárica, a maior parte dos estudos que visam a produção de vacinas são, ainda hoje, focados em estratégias que estimulam a produção a resposta imune humoral.

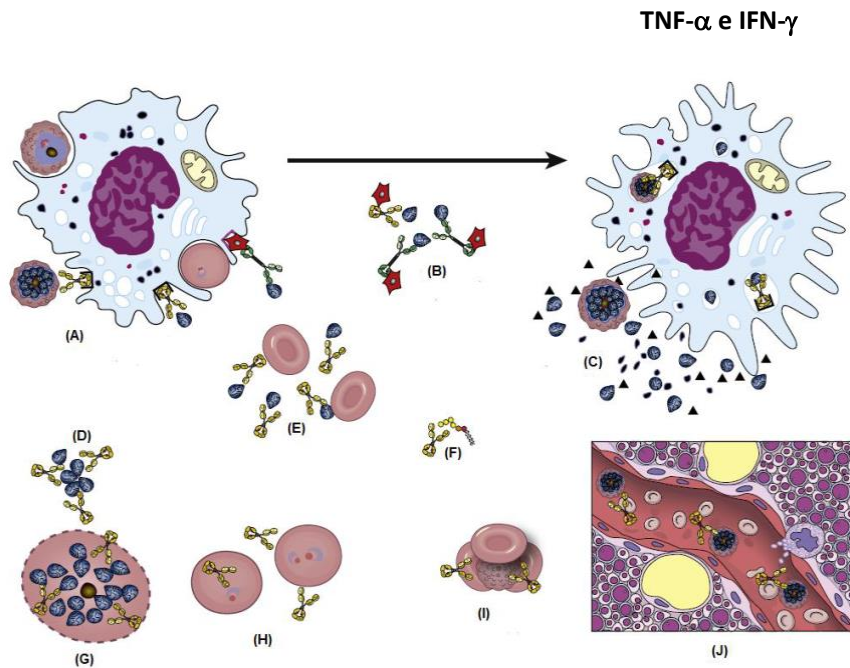


Figura 4: Mecanismos de atuação dos anticorpos contra a infecção malárica: (A): opsonização das células parasitadas e reconhecimento da porção Fc dos anticorpos por meio receptor Fc das células fagocíticas. (B): opsonização de merozoítos pelos anticorpos medeia à fixação de componentes do sistema complemento. (C): processo de inibição celular dependente de anticorpos, com liberação de citocinas tais como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . (D): aglutinação de merozoítos. (E): opsonização dos merozoítos e bloqueio da entrada destes parasitos nas hemácias. (F): neutralização de toxinas derivadas do parasito. (G): bloqueio da liberação de parasitos das células após o processo de replicação parasitária. (H): impedir o crescimento do parasito. (I) inibição da formação de rosetas. (J): inibição do processo de adesão das células parasitadas ao endotélio vascular. Adaptado de TEO et al, 2016.

## **1.5 Vacinas antimaláricas: passado e presente**

O surgimento e disseminação de parasitos resistentes às drogas antimaláricas (Revisto por O'BRIEN et al., 2011) bem como dos anofelinos a inseticidas (RANSON et al., 2011) têm elevado cada vez mais a necessidade do desenvolvimento de um método alternativo e efetivo para controle da doença. Nesse contexto destaca-se o desenvolvimento de vacinas antimaláricas.

A necessidade de se obter uma vacina antimalárica, segura e eficaz, para uso em humanos têm, há longos anos, motivando muitos estudos ao redor do mundo. No entanto, vários fatores, incluindo a complexidade biológica dos parasitos, têm contribuído para o insucesso dos protótipos testados até o momento. Especificamente, ao longo do seu ciclo evolutivo, os plasmódios passam por distintos estágios, cada qual apresentando características biológicas, bioquímicas e moleculares variáveis (COWMAN et al., 2016; ROBERTS et al., 1992) o que contribui para o insucesso dos ensaios de vacinação.

Mesmo frente a essas dificuldades, a vacinação ainda é considerada uma estratégia com excelente custo-benefício, já que possibilitaria uma mais rápida redução no número de casos clínicos e de óbitos, e até mesmo a eliminação da doença das áreas endêmicas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Assim, anualmente, milhões de dólares são investidos em estudos que visam produzir uma vacina que seja eficaz para combater a transmissão da malária (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017)

A seguir algumas estratégias sugeridas para o desenvolvimento de uma vacina antimalárica serão apresentadas.

### **1.5.1 Vacinas contra estágio pré-eritrocítico dos plasmódios**

As vacinas pré-eritrocíticas tem como objetivo induzir imunidade contra o estágio de esporozoíto do parasito impedindo assim que a infecção malárica seja estabelecida. É, portanto, designada como vacina bloqueadora da infecção.

Com tal propósito, diversos protótipos direcionados para a fase hepática já foram e continuam sendo testados na atualidade (MOORTHY et al., 2013; WHO,

2014). O primeiro estudo relacionado à indução de imunidade antimalárica contra o estágio hepático dos plasmódios foi realizado em modelo murino sendo a vacina baseada no uso de esporozoítos atenuados por irradiação (NUSSENZWEIG et al., 1967). Interessantemente, esse estudo demonstrou que animais imunizados eram protegidos contra o desafio experimental e que essa proteção era dependente do número de parasitos utilizados no processo de imunização (NUSSENZWEIG et al., 1967; HOFFMAN et al., 2002). Na década seguinte, esses estudos foram repetidos tanto em primatas não humanos quanto humanos sendo os resultados obtidos compatíveis com aqueles observados em roedores (NUSSENZWEIG et al., 1970; CLYDE et al., 1973). No entanto, a viabilidade dessa estratégia foi descartada devido à alta susceptibilidade dos indivíduos imunizados seis meses após vacinação e a necessidade de grande número de esporozoítos para indução de proteção. De qualquer forma, a partir desses estudos, várias outras estratégias de imunização utilizando parasitos inteiros foram testadas, como, por exemplo, o uso de quimioatenuação e atenuação genética (BELNOUE et al., 2004a; GERALD et al., 2011; ROESTENBERG et al., 2009).

As imunizações com esporozoítos vivos seguida de tratamento com drogas antimaláricas (quimioatenuação) (BELNOUE et al., 2004a; RAJA et al., 2016; RAJA; STANISIC; GOOD, 2017) têm sido mais eficientes na indução de imunidade do que o uso de esporozoítos atenuados por irradiação (LYKE et al., 2017; MORDMÜLLER et al., 2017). Assim, especula-se que a quimioatenuação permite uma maior proliferação dos esporozoítos em esquizontes teciduais, liberação de maiores quantidades de antígenos na corrente sanguínea e, conseqüentemente, maior ativação do sistema imunológico em relação ao que se verifica quando se utiliza esporozoítos atenuados por radiação. Recentemente foi demonstrado que humanos imunizados com esporozoítos de *P. falciparum* e tratados quimioprolificamente desenvolvem imunidade capaz de protegê-los contra novo desafio por até 10 semanas após a 3ª dose da vacina (MORDMÜLLER et al., 2017). Contudo, esse tempo reduzido de proteção não justifica sua extrapolação para uso em humanos em grande escala.

Deve-se destacar que, apesar do grau de proteção induzido com uso de esporozoítos atenuados seja animador (em torno de 100%), as limitações ao seu uso se baseiam: 1) no fato do grau de proteção diminuir com o tempo; 2) na dificuldade de obtenção de grande número de formas esporozoítas do parasito.

Normalmente, o número de esporozoítos necessários para induzir imunidade é da ordem de  $5,12 \times 10^4$  (MORDMÜLLER et al., 2017) a  $9 \times 10^5$  esporozoítos (LYKE et al., 2017); 3) não é possível obter esporozoítos por meio de cultivo como ocorre para formas sanguíneas de *P. falciparum*. O uso de parasitos quimioatenuados leva, ainda, a outros obstáculos como necessidade de administração por via intravenosa, tornando o processo doloroso e muitas vezes efusivo para os pacientes. Além disso, não deve ser descartada a possibilidade de reversão da quimioatenuação, o que permitiria o desenvolvimento da infecção nos indivíduos imunizados.

Sabendo que é possível induzir imunidade antimalárica de forma mais eficiente utilizando parasitos inteiros atenuados quimicamente ou por irradiação e considerando as limitações de ambos os métodos, outras estratégias de atenuação tem sido desenvolvidas. Nesse caso, destaca-se a atenuação genética, no qual genes específicos do parasito envolvidos no seu processo de desenvolvimento são deletados do genoma (KREUTZFELD; MÜLLER; MATUSCHEWSKI, 2017). Por exemplo, Mueller e colaboradores (2005), demonstraram que o silenciamento dos genes *UIS3* e *UIS4*, expressos na membrana do vacúolo parasitóforo de esporozoítos e/ou sua completa deleção impediram o desenvolvimento do parasito dentro dos hepatócitos, tanto em *P. berghei* quanto em *P. yoelii*, porém, induziram o desenvolvimento de proteção a longo prazo em camundongos (MUELLER et al., 2005). Entretanto, os parasitos geneticamente modificados ainda podem escapar da atenuação genética podendo levar ao desenvolvimento do ciclo sanguíneo do parasito (KUMAR et al., 2016). Nesse sentido, dois estudos clínicos que chegaram a ser iniciados com uso de parasitos geneticamente modificados tiveram que ser suspensos, o que aconteceu graças ao surgimento de formas sanguíneas do parasito após os processos de imunização (Revisto por VAUGHAN; KAPPE, 2017). Em outro estudo pré-clínico, a atenuação dos esporozoítos de *P. falciparum* foi realizada com base na deleção de três genes (*p36*<sup>-</sup>/*p52*<sup>-</sup>/*sap1*<sup>-</sup>) e esse modelo ficou conhecido como PfGAP3KO (MIKOLAJCZAK et al., 2014). Essa tripla atenuação inibiu o desenvolvimento dos parasitos durante a fase hepática, sendo considerado um modelo seguro para uso em humanos (KUBLIN et al., 2017).

### 1.5.2 Vacinas contra plasmódios de estágio sanguíneo

Vacinas com alvo na fase sanguínea do ciclo do parasito utilizam formas sanguíneas assexuadas ou proteínas expressas pelos parasitos durante essa fase do ciclo. Também são conhecidas como vacinas anti-doença, pois seu objetivo é impedir ou amenizar os sintomas clínicos exibidos pelos pacientes durante o desenvolvimento da infecção e o desenvolvimento das formas graves da doença.

Uma das estratégias utilizadas para indução de imunidade antimalárica é o uso de parasitos inteiros de fase sanguínea (vivos ou mortos) ou extrato proteico derivado da lise dos mesmos (ELLIOTT; KUNS; GOOD, 2005; PINZON-CHARRY et al., 2010; POMBO et al., 2002). Considerando-se as dificuldades no uso de parasitos inteiros vivos para indução de imunidade, como a possibilidade de escape da atenuação e o desenvolvimento da doença após as imunizações, o uso de parasitos inteiros, porém mortos por descongelamento e congelamento rápido ou ruptura de membrana também tem sido avaliado em ensaios de imunização antimalárica (GIDDAM et al., 2016; LU et al., 2016; PINZON-CHARRY et al., 2010; ZHU et al., 2016). Essa estratégia tem como principal vantagem a ampla exposição de diversos alvos antigênicos do parasito ao sistema imunológico do hospedeiro, fazendo que haja um maior estímulo de resposta imune àquele parasito (PINZON-CHARRY et al., 2010). Nesse sentido, tem sido demonstrado que uso de extrato proteico de parasitos de fase sanguínea quando associado a adjuvante tem sido eficaz na ativação de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (LU et al., 2016) mesmo quando utilizado em baixas doses (PINZON-CHARRY et al., 2010). Esses estudos ainda demonstram que além da imunidade celular, o uso de antígeno total também é capaz de estimular linfócitos B a produzirem anticorpos específicos que também contribuem para o controle da infecção (LU et al., 2016).

O uso de adjuvantes na composição de protótipos vacinais é de grande importância visto que muitas vezes as partículas antigênicas que compõe a vacina são pouco imunogênicas, gerando respostas imunológicas rápidas, porém, pouco duradouras (BODE et al., 2011). Dentre os adjuvantes utilizados com a finalidade de potencializar a resposta imune induzida por vacinas está o CpG-ODN. Esse adjuvante é composto por sequências bacterianas de CpG não metilados com oligodeoxinucleotídeos sintéticos (ODN). Essas sequências de DNA não metilado são raras no DNA eucarioto, assim, são reconhecidas pelo sistema imunológico

como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) do sistema imune inato. Com esse reconhecimento pelos PRRs tipo Toll-9 (TLR-9) células dendríticas convencionais e células B são ativadas (KRIEG et al., 1995) e indiretamente ativam monócitos, macrófagos e células T e células NK. Estas células passam, então, a secretar citocinas (IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ ) e anticorpos que medeiam a resposta imune celular e humoral. O estímulo à resposta humoral via CpG-ODN já foi observada em estudos clínicos de fase I em pacientes imunizados com o protótipo vacinal composto pelo antígeno recombinante *PfAMA-1*; nesse caso, a resposta de anticorpos IgG verificada nos indivíduos imunizados foi cinco vezes maior após a utilização do adjuvante (MULLEN et al., 2008).

Atualmente, alguns estudos já visam à necessidade do desenvolvimento de novos meios de entrega do extrato do parasito ao sistema imunológico, como o uso de vesículas lipossomais que são tão eficazes quanto o uso de adjuvantes (GIDDAM et al., 2016). Esse sistema de entrega, o qual é formado por uma membrana composta por uma camada dupla de lipídeos, permite que o processo de imunização ocorra sem interferência de antígenos oriundos de hemácias. Essa estratégia evita a possibilidade de ocorrência de resposta contra antígenos próprios do hospedeiro sendo ainda, considerado um sistema ideal para estimulação de células T (GIDDAM et al, 2016).

### **1.5.3 Vacinas que utilizam proteínas recombinantes como antígenos**

Apesar dos animadores níveis de proteção alcançados com uso de parasitos inteiros de fase hepática ou sanguínea, as dificuldades na obtenção dos parasitos e/ou o risco de desenvolvimento da doença durante o processo de imunização limitam o uso em humanos. Assim, a utilização de proteínas recombinantes derivadas das fases eritrocíticas e pré-eritrocíticas do parasito tem sido investigada como potenciais alvos vacinais.

Até o momento, somente uma vacina com alvo em parasitos de fase hepática alcançou a fase 4 triagem clínica (RTSS CLINICAL TRIALS PARTNERSHIP, 2015). Denominada RTS,S/AS01, essa vacina é composta por uma



proteína recombinante da proteína circunsporozoíta associada ao antígeno de superfície de vírus da hepatite B (HBV-ag) e ao adjuvante AS01. Apesar de ter sido aprovada para estudos clínicos de fase 4, os quais se iniciarão em 2018 na África, os níveis de proteção induzidos por essa vacina em sua fase 3 ainda são considerados baixos. Especificamente, 18 meses após administração de três doses da RTS,S, o número de casos graves da doença em crianças com os sintomas clínicos foi reduzido em 35-47% em crianças com idade de 5-17 meses e em 15-38% em crianças com idade de 6-12 semanas (RTSS Clinical Trials Partnership, 2015). Portanto, ainda há espaço para busca de vacinas que possuam índices mais elevados de proteção.

Outras proteínas consideradas importantes candidatas a compor uma vacina antimalárica são: AMA-1 (antígeno apical de membrana 1), MSP-1 (proteína de superfície de merozoíto-1) e MSP-2 (proteína de superfície de merozoíto-2). Essas proteínas, expressas nos parasitos durante o ciclo eritrocítico tem sido implicadas como importantes indutoras de resposta imune humoral em estudos soropidemiológicos. Com base nessa alta divergência nos alelos existentes nas populações das diversas cepas de parasitos, atualmente objetiva-se investigar possíveis alvos vacinais baseados em encontrar os epítomos mais imunogênicos e mais conservados entre as espécies. Para isso, a análise *in silico* dessas moléculas é de extrema importância. Cerca de 5000 genes são estimados como possíveis candidatos a alvos antigênicos e a avaliação para determinar quais desses alvos seriam os melhores para o desenvolvimento de uma vacina é realizada de forma lenta e trabalhosa (Revisto por DOOLAN, 2011).

## 2 JUSTIFICATIVA

Apesar das dificuldades encontradas no desenvolvimento de uma vacina antimalárica capaz de induzir proteção de longa vida 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 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 jovens contra as formas graves da doença.

Vacinas compostas por parasitos inteiros, atenuados por irradiação, por modificações genéticas ou por extrato total antigênico vêm sendo testadas contra estágios sanguíneos e pré-eritrocíticos dos plasmódios. Dentre as vantagens dessas vacinas em relação às recombinantes e de subunidades está a indução de imunidade contra múltiplos antígenos dos parasitos. 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 pulmão. 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 (malária cerebral e injúria respiratória). Em sua grande maioria, os estudos são realizados com cepas de parasitos não indutores de malária cerebral (*P. yoelii*, *P. chabaudi*) sendo a proteção investigada somente em relação à inibição do desenvolvimento do parasito no sangue circulante.

No contexto do desenvolvimento natural ou de indução de imunidade, deve-se considerar que em áreas endêmicas geralmente circulam diferentes espécies e cepas de parasitos com distintos graus de virulência e que com a globalização a introdução de uma nova espécie/cepa pode alterar em médio prazo o perfil de virulência das cepas preexistentes. Assim, uma vacina que induza proteção

simultânea contra variados estágios evolutivos dos parasitos e contra cepas heterólogas, com diferentes graus de virulência, torna-se fundamental.

Considerando-se a possibilidade de indução de imunidade por meio de injeção intraperitoneal de extrato proteico de parasitos de fase sanguínea (PINZON-CHARRY et al., 2010), este trabalho visa avaliar o desenvolvimento de imunidade transcendente a cepa considerando-se, sobretudo, a proteção contra o desenvolvimento de malária cerebral. Nesse contexto, o uso de modelo murino roedores é fundamental visto os impedimentos éticos desse tipo de estudo em humanos. Apesar dos eventos associados a malária cerebral em modelo murino não refletirem exatamente aqueles observados em humanos, o modelo murino de infecção por *P. berghei* ANKA ainda é o mais aceito para estudos que visam explorar melhor eventos associados ao desencadeamento de malária cerebral.

Para atingir nossos objetivos, ciclos repetidos de imunização com *P. berghei* cepa NK65 serão realizados seguindo-se posterior desafio com a cepa ANKA de *P. berghei*.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar o desenvolvimento da malária cerebral causada por *Plasmodium berghei* ANKA em camundongos C57BL/6 imunizados previamente com extrato bruto proteico de *P. berghei* NK65.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência das imunizações com extrato proteico de *P. berghei* NK65 associado ao adjuvante CPG-ODN na evolução clínica dos animais após o desafio experimental com *P. berghei* ANKA;
- Delinear a curva de sobrevivência e de parasitemia dos animais imunizados com extrato proteico de *P. berghei* NK65 associado ao adjuvante CPG-ODN e posteriormente desafiados com *P. berghei* ANKA ;
- Determinar a ocorrência de lesões cerebrais causadas por *P. berghei* ANKA em animais imunizados com extrato proteico de *P. berghei* NK65 associado ao adjuvante CPG-ODN.
- Determinar os níveis de citocinas IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  presentes em homogenato de cérebro dos animais imunizados;
- Avaliar o índice esplênico dos animais envolvidos no estudo;
- Verificar o perfil fenotípico da população de células T auxiliares e T citotóxicas (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>), além das células B (CD19<sup>+</sup>) nos baços dos animais imunizados;
- Determinar os níveis de anticorpos IgG presentes no soro dos animais após as imunizações;

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Animais

Os animais utilizados no presente estudo foram obtidos com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Protocolo número: 32/2016) da Universidade Federal de Juiz de Fora, e foram fornecidos pelo Centro de Biologia da Reprodução presente na mesma instituição. Utilizaram-se camundongos C57BL/6, fêmeas com idade entre 6 a 8 semanas, durante todo o experimento os animais foram acondicionados em cabines ventiladas com controle de temperatura, exposição à luz durante 12h, com água e ração *ad libitum* (Nuvital Nutrientes S/A).

### 4.2 Produção de extrato bruto

Para obtenção do extrato bruto proteico de *P. berghei*, camundongos repique foram inoculados (via intraperitoneal; i.p) com 200  $\mu$ L de células sanguíneas infectadas ( $5 \times 10^7$  parasitos/mL) com as cepas de *P. berghei* ANKA (PbA) ou NK65 (PbN) previamente criopreservadas em nitrogênio líquido. Após a infecção, a parasitemia sanguínea foi monitorada por meio de esfregaços confeccionados a partir de sangue obtido da veia caudal. Assim, quando a carga parasitária atingiu 5% em infecções causadas por PbA e 10% em infecções por PbN, os animais foram anestesiados com uma solução de cloreto de sódio contendo 10% Quetamina e 2% Xilasina seguindo-se a coleta de sangue a partir da veia braquial. Os animais foram eutanasiados por exsanguinação seguida de deslocamento de cervical.

O sangue obtido foi, então, utilizado para a infecção dos animais a serem utilizados para produção de extrato bruto de *P. berghei*. Para tal, o número total de hemácias foi determinado a partir da contagem em câmara de Neubauer para ajuste da concentração de células de modo que houvesse  $10^5$  células parasitadas a cada 200 $\mu$ L de solução (volume inoculado via i.p./camundongo). Quando a parasitemia atingiu 4-6% em animais infectados com PbA e >20% em animais infectados com

PbN esses foram anestesiados e o sangue coletado da mesma forma descrita anteriormente.

Para a obtenção do extrato bruto proteico de *P. berghei* o sangue obtido foi misturado a 10 mL de tampão fosfato salino (PBS 1X) e centrifugado a 300 g, durante 10 minutos, a 25 °C. O sobrenadante foi desprezado, adicionou-se ao sedimento de hemácias 10 mL de PBS 1X contendo 60 µL de saponina a 1% para cada microlitro de sedimento. O sangue foi então incubado a 37 °C durante 15 minutos ou até todas as hemácias estarem totalmente lisadas. Após a lise das células, a solução foi centrifugada a 300 g, durante 10 minutos, a 4 °C e o sobrenadante novamente descartado. Esse processo foi repetido até o sobrenadante estar límpido, sem vestígios de restos celulares. Então, o volume de sedimento foi determinado, adicionando-se a seguir 2 volumes da solução tampão TEM-Triton X-100 (1 mL Tris Base (1M), 0,39 M NaCl, 2 mL Triton X-100 e 0,01 M EDTA) contendo inibidores de protease (iodoacetamida, tosyl-chloromethyl ketone-TLCK, phenylmethylsulfonyl fluorid-PMSF e aprotinina, Sigma Aldrich). Após 15 minutos de incubação no gelo o tubo contendo a solução foi centrifugado a 300 xg, durante 10 minutos, a 4 °C. Então, o sobrenadante contendo o extrato antigênico dos parasitos foi armazenado em ultra freezer a -80 °C até o momento do uso.

A concentração antigênica foi determinada pelo método de dosagem de proteínas descrito por Lowry, em 1951 (LOWRY et al., 1951).

### 4.3 Desenho experimental

#### 4.3.1 Grupos experimentais

Os animais utilizados no estudo foram separados em 4 grupos experimentais como descritos a seguir (Tabela 1).

- Controle: animais sem imunização e sem desafio experimental
- PbA: grupo composto por 5 animais não imunizados, porém desafiados com  $10^5$  hemácias infectadas por *P. berghei* ANKA.
- CpG-ODN: grupo composto por 12 animais imunizados com CpG-ODN nos dois ciclos de imunização e desafiados com  $10^5$  hemácias parasitadas com *P. berghei* ANKA.
- CpG-ODN PbN: grupo composto por 12 animais imunizados com CpG-ODN e 50 µg de extrato proteico de *P. berghei* NK65 nos dois ciclos de imunização e desafiados com  $10^5$  hemácias parasitadas com *P. berghei* ANKA, caracterizando então um grupo de imunização heteróloga.
- CpG-ODN PbA: grupo composto por 12 animais imunizados com CpG-ODN e 50 µg de extrato proteico de *P. berghei* ANKA nos dois ciclos de imunização e desafiados com  $10^5$  hemácias parasitadas com *P. berghei* ANKA, caracterizando então um grupo de imunização homóloga.

**Tabela 1:** Esquematização dos grupos experimentais

Grupo	1ª imunização Via subcutânea	2ª Imunização Via intraperitoneal	Desafio
Controle	-	-	-
PbA	-	-	10 <sup>5</sup> hemácias parasitadas com <i>P. berghei</i> ANKA
CpG-ODN	3 µg CpG-ODN	3 µg CpG-ODN	10 <sup>5</sup> hemácias parasitadas com <i>P. berghei</i> ANKA
CpG-ODN PbN	3 µg CpG-ODN + 50 µg extrato bruto PbN	3 µg CpG-ODN + 50 µg extrato bruto PbN	10 <sup>5</sup> hemácias parasitadas com <i>P. berghei</i> ANKA
CpG-ODN PbA	3 µg CpG-ODN + 50 µg extrato bruto PbA	3 µg CpG-ODN + 50 µg extrato bruto PbA	10 <sup>5</sup> hemácias parasitadas com <i>P. berghei</i> ANKA

PbN: *Plasmodium berghei* NK65; PbA: *Plasmodium berghei* ANKA





#### 4.4 Avaliação clínica dos animais após desafio experimental e delineamento da curva de sobrevivência dos animais

O momento para realização da eutanásia foi definido a partir da determinação diária do escore clínico apresentado por cada animal. Por meio desse método foi possível identificar os animais que evoluíram ou não para quadros compatíveis de malária cerebral.

A avaliação clínica foi realizada por meio da análise de parâmetros comportamentais e neurológicos apresentados pelos camundongos tendo-se como base em um esquema de pontuação que define o seu bem estar. O escore “Escala rápida de coma e comportamento murino” (RMCBS - *Rapid murine coma and behaviour scale*) foi padronizado por Carroll e colaboradores em 2010 (CARROLL et al., 2010) para otimização dos protocolos de avaliação de coma em camundongos. O RMCBS permite a avaliação rápida de alterações e nos permitindo inferir sobre o risco ou não de óbito do animal infectado.

Dez parâmetros foram avaliados (Anexo II) por meio de observação de um operador e pontuados de 0 a 2, no qual 2 indica a normalidade do parâmetro analisado apresentado pelo animal, e 0 a disfuncionalidade total do mesmo. O somatório final apresentado por um animal saudável equivale a 20 pontos; a análise foi realizada em intervalos definidos que dependem da pontuação que os animais apresentavam no momento da primeira avaliação diária. Se os animais apresentassem escore 20 a avaliação era refeita em 24h, se estivessem com pontuação entre 19 e 16 pontos era refeita a cada 12h, de 15 a 11 pontos a cada 4h e de 10 a 6 pontos a cada 2h. Quando os animais infectados por *P. berghei* ANKA apresentavam escore  $\leq 5$  os mesmos foram eutanasiados com a utilização de solução anestésica (Cloroeto de sódio 0,9%, 10% Quetamina e 2% Xilasina), o sangue foi coletado por punção cardíaca para obtenção do soro para determinação dos níveis de anticorpos, seguindo-se perfusão cardíaca.

Após a realização da perfusão cardíaca, o baço e o cérebro foram coletados. O baço foi acondicionado em 5 mL de meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 5% de soro fetal bovino (Gibco) e acondicionado em gelo até o momento do processamento para obtenção dos esplenócitos e marcação fenotípica da população celular. Já o cérebro foi coletado e seccionado em seu eixo coronal e

a parte anterior foi destinada para realização do processamento histológico enquanto a parte posterior do órgão foi destinada ao processamento para obtenção de homogenato para dosagem de citocinas presente neste tecido.

A curva de sobrevivência foi determinada com base na avaliação clínica dos animais. Nesse caso, camundongos com escore clínico  $\leq 5$ , portanto, com sinais claros de acometimento neurológico (incluindo coma) foram eutanasiados evitando-se prolongamento de sofrimento animal. Animais com escore  $> 5$  continuaram a ser avaliados diariamente.

#### **4.5 Avaliação da carga parasitária dos animais imunizados**

Com o objetivo de se avaliar o efeito das imunizações no controle da infecção e no prolongamento da vida dos animais experimentais, o desenvolvimento da parasitemia e a taxa de sobrevivência foram acompanhadas diariamente após três dias decorridos do desafio experimental com *P. berghei* ANKA.

Para acompanhamento da parasitemia, esfregaços sanguíneos foram confeccionados a partir do sangue obtido da veia caudal dos camundongos desafiados. Para tal, uma gota de sangue foi espalhada na superfície de uma lâmina de vidro, e então fixadas com metanol e coradas com solução de Giemsa a 10%. Após serem secados naturalmente, os esfregaços foram analisados em microscópio óptico (lente objetiva 100 x; Olympus, modelo CX41). A frequência de células parasitadas foi determinada por meio de contagem do número de células parasitadas em universo total de mil hemácias.

A determinação da parasitemia sanguínea também foi realizada por meio de citometria de fluxo, visto que a cepa de *P. berghei* ANKA utilizada possui o gene para a proteína fluorescente verde (GFP – *green fluorescent protein*). Assim, a quantidade de parasitos circulantes pode ser determinada com base na fluorescência desta proteína. Para isso, utilizou-se 2  $\mu\text{L}$  de sangue obtido da veia caudal dos animais diluído em 300  $\mu\text{L}$  de tampão de citometria (PBS 1x, 5% de soro fetal bovino (Gibco), 0,1% de azida de sódio (Vetec)). As leituras foram realizadas em um citômetro de fluxo BD FACS Canto II.

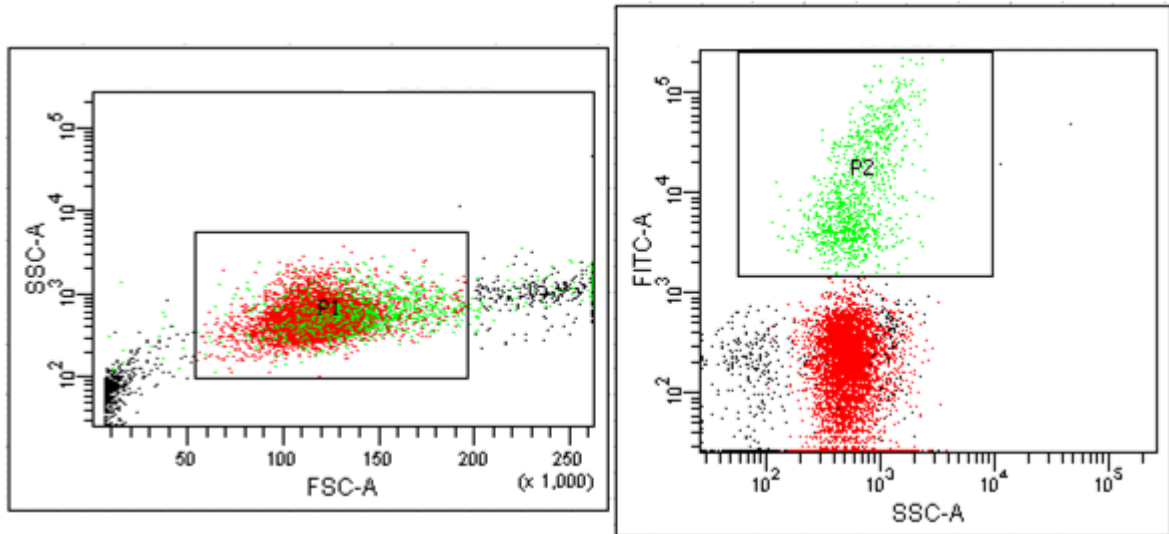


Figura 6: Estratégia de análise dos eritrócitos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA por meio de citometria de fluxo. A população 1 (P1) determina a população total de eritrócitos. Desta população foi determinada a população 2 (P2), que é composta por células que apresentam fluorescência verde derivada da proteína GFP pelos parasitos. A porcentagem de parasitemia foi determinada pela porcentagem de células expressando essa proteína.

#### 4.6 Análise macroscópica de áreas de hemorragia no cérebro e da permeabilidade vascular dos animais experimentais

Após eutanásia, o crânio de todos os animais foi fotografado com o objetivo de registrar danos cerebrais macroscópicos. Para tal foi utilizada uma câmera fotográfica digital semiprofissional (Sony). Antes, porém, a pele da parte superior da cabeça foi totalmente removida deixando a calota cranial exposta.

Para demonstrar alteração na permeabilidade vascular e possível rompimento da barreira hematoencefálica animais que desenvolveram quadro clínico sugestivo de malária cerebral foram inoculados com de Azul de Evans, segundo o protocolo proposto por Thumwood e colaboradores (1988), com adaptações (THUMWOOD et al., 1988). Para essa análise foram selecionados aleatoriamente 3 animais de cada grupo quando estes pontuavam escore  $\leq 8$ . Então os animais foram anestesiados (solução contendo cloreto de sódio a 0,9%, 10% de Quetamina e 2% de Xilasina) seguindo-se inoculação intravenosa (i.v) de 100  $\mu$ L da solução de Azul de Evans (Sigma-Aldrich) a 1%. Após 1 hora estes animais foram eutanasiados com solução anestésica seguindo-se perfusão cardíaca com 10 mL de PBS 1x. Então, a

pele da parte superior da cabeça do animal foi totalmente removida para exposição total da calota craniana. Procedeu-se, então, com o registro fotográfico.

#### **4.7 Processamento tecidual e confecção de lâminas histológicas**

O processamento dos órgãos foi iniciado imediatamente após a coleta dos mesmos, primeiramente, fixando-os em solução tampão contendo paraformaldeído (Synth) a 4%. Vinte e quatro horas após a fixação do tecido seccionado, a solução de fixação foi descartada e adicionou-se etanol 70% para início da desidratação tecidual. Novamente, após permanecer 24h em etanol a 70%, o tecido foi imerso por 30 minutos em concentrações crescentes de etanol (80%, 95%, 100%, 100%). Após a desidratação tecidual, realizou-se a diafanização, por meio de imersão em Xilol P.A. (Synth) durante 20 minutos; este processo foi repetido 3 vezes. Finalmente foi realizada a imersão em parafina durante 30 minutos para posterior inclusão e formação dos blocos sólidos.

Uma vez prontos, o tecido cerebral foi seccionado obtendo-se cortes com 5 µm de espessura. Os cortes foram dispostos em lâminas de vidro para coloração tecidual com hematoxilina-eosina.

A coloração com hematoxilina-eosina foi realizada seguindo o protocolo descrito: as lâminas contendo os cortes foram submetidas a 15 minutos de desparafinização em estufa a 60°C para remoção do excesso de parafina presente no interior do tecido. Após esse processo inicial, as lâminas foram submersas em uma bateria de xilol PA para remoção da parafina residual ainda presente nos tecidos (um ciclo de imersão em xilol por 10 min e outros dois ciclos por 5 minutos). Sequencialmente, foram imersas em diversas concentrações decrescentes de álcool etílico (100%, 95%, 80%, 70%) para realização do processo de hidratação do tecido. Então as lâminas foram imersas em água durante 5 minutos e posteriormente em hematoxilina (2 minutos). Logo após, foram lavadas novamente durante 5 minutos em água corrente para nova imersão no corante basofílico eosina (30 segundos e 2 minutos). As lâminas foram imersas em água corrente durante 1 minuto e sequencialmente em uma nova bateria de álcool (70%, 80%, 95%, 100%) para

desidratação tecidual e novamente em xilol P.A. Ao final das baterias de imersão, adicionaram-se lamínulas de vidro para montagem final da lâmina.

A análise da histopatologia do cérebro dos animais dos grupos experimentais foi realizada por meio de visualização microscópica em lentes de aumento de 40x e 100x (AX10, Zeiss). Foram observados 20 campos microscópicos/amostra para caracterização do tecido (presença de pontos hemorrágicos, vasos obstruídos por hemácias ou leucócitos, dentre outros).

#### **4.8 Extração de citocinas do cérebro.**

Para dosagem de citocinas IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  no cérebro dos animais imunizados, parte do órgão coletado previamente durante a eutanásia foi mantido em soro fetal bovino e criopreservado a -80°C.

Para a extração de citocinas, o tecido foi macerado juntamente a solução de extração composta por: 0,4 M de NaCl, 0,05% de Tween-20, 0,5% de albumina de soro bovino (BSA), 0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA, 0,02% de aprotinina. Para cada 100 mg de tecido utilizou-se 1 mL de solução de extração para maceração.

Após macerado, o conteúdo foi disposto em microtubos cônicos para centrifugação a 2000 g por 10 minutos, a 4 °C. Então, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C até o momento do uso.

#### **4.9 ELISA de citocinas**

A dosagem *in loco* das citocinas foi realizada de acordo com recomendações do fabricante do kit de ELISA utilizado (Becton e Dickson - BD). Placas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpo de captura nas seguintes proporções: para dosagem de IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  utilizou-se diluição de 1:250 de anticorpo de captura. Os anticorpos de captura para IL-10 e TNF- $\alpha$  foram diluídos em tampão fosfato de sódio 0,2 M (0,087 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,12 M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, qsp 1 L, pH 6,5) enquanto os anticorpos de captura para IFN- $\gamma$  foram diluídos em tampão

carbonato de sódio 0,1 M (0,084 M de  $\text{NaHCO}_3$ , 0,018 M de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , qsp 1 L, pH 9,5). A placa, após sensibilização, foi incubada a 4°C por no mínimo 16 horas. A seguir, foram realizadas três lavagens dos poços com PBS-Tween 0,05% e o bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado adicionando-se a cada poço 200 µl de solução diluente (PBS 1x acrescido de soro fetal bovino). Seguiu-se, então incubação a 4 °C por 16 horas.

A diluição da curva padrão utilizada para determinação da concentração das citocinas presentes no homogenato foi realizada de forma seriada, partindo-se de 4000 pg/mL até o ponto mínimo de 31,25 pg/mL. Assim como o padrão, as amostras foram adicionadas a cada poço (50 µL/poço), seguindo-se incubação a 4°C por 16 horas. Após este período, as placas foram novamente lavadas e adicionando 50 µL de solução diluente contendo anticorpo de detecção na seguinte proporção: IL-10 1:250, TNF- $\alpha$  1:500, IFN- $\gamma$  1:250. As placas foram incubadas a temperatura ambiente durante 1 hora. A seguir, as placas foram lavadas com PBS-Tween 0,05% e posteriormente foi adicionado a cada poço 50 µL de enzima avidina-peroxidase diluída em solução diluente e incubadas por 30 minutos. As placas foram novamente lavadas (7 vezes as placas de TNF- $\alpha$  e IL-10 e 10 vezes as placas de IFN- $\gamma$ , respectivamente) com PBS-Tween 0,05% e adicionou-se 50 µL de substrato (TMB) por 15 minutos a temperatura ambiente. A reação da enzima com o substrato foi interrompida utilizando 50 µL/poço de ácido sulfúrico a 2 N. A densidade ótica foi determinada em espectrofotômetro a 450 nm. A concentração de citocinas presentes em cada amostra foi determinada a partir da equação de regressão linear, obtida pelos valores das absorbâncias referentes à curva padrão de cada citocina. A partir desta curva padrão, foi delineado um gráfico de pontos os quais foi possível traçar uma reta de regressão linear com sua respectiva equação. Os valores a e b da equação foram utilizados para o cálculo da concentração de citocinas presentes em cada amostra, juntamente com o valor de suas respectivas absorbâncias. Assim, o valor b apresentado na equação de regressão linear foi subtraído do valor da absorbância da amostra, e posteriormente, o valor obtido foi dividido pelo valor encontrado em a.

#### **4.10 Determinação do índice esplênico**

Para determinar a atividade do baço dos animais imunizados foi utilizado o índice esplênico. Este consiste na razão do peso do baço (em gramas) do animal pelo seu peso corporal (em gramas) como descrito por Lopes e colaboradores (2015).

#### **4.11 Marcação fenotípica de linfócitos presentes no baço dos animais eutanasiados**

Após a eutanásia dos animais, os baços foram coletados e armazenados em 5 mL de meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 5% de soro fetal bovino (Gibco). Os órgãos foram mantidos a 4°C até o momento do seu processamento.

Para obtenção dos esplenócitos, cada baço foi macerado em peneiras de malhas com poros de 70 µm (Falcon, BD), utilizando-se 8 mL de meio RPMI1640. A suspensão celular foi, então, centrifugada a 300 g, por 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e as hemácias presentes no sedimento celular foram lisadas com solução ACK 1x (0,15 M de cloreto de amônio, 0,01 M de bicarbonato de potássio, 0,012 mM de EDTA, qsp. 1L) por 5 minutos, a 37°C. O tampão ACK foi neutralizado com a adição de meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino e a solução foi, então, centrifugada a 300 g, por 5 minutos, a 4°C.

As células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer com o auxílio do Azul de Tripán (Sigma) (diluição 1:100) e ajustadas para a concentração de  $10^6$  células (200µL/poço). Estas foram distribuídas em placas com fundo U, centrifugadas para remoção do meio e incubadas com 25 µL do coquetel de anticorpos por 45 minutos, a 4°C para marcação. Foram utilizados 2 coquetéis compostos pelos anticorpos: anti-CD19 (PercP, Biolegend), anti-CD3 (PercP, Biolegend), anti-CD4 (FITC, Biolegend), anti-CD8 (PE, Biolegend). O primeiro painel, composto por anticorpo anti-CD19, corresponde a marcação das células B no baço dos animais (CD19<sup>+</sup>), já o segundo painel, composto por anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 correspondem aos linfócitos T auxiliares (T CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>) e aos linfócitos T citotóxicos (T CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>)



Após marcação, as células foram ressuspensas em 175  $\mu$ L de meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino e centrifugadas a 300 g, a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos, centrifugadas e ressuspensas em tampão de citometria (PBS 1x, 5% de soro fetal bovino (Gibco) e 0,1% de azida de sódio (Vetec)). A leitura das amostras foi realizada no dia seguinte ao processamento, no citômetro de fluxo FACSCanto II™ e as análises por meio do software FlowJo versão 10. As estratégias de análise utilizadas são demonstradas na figura 7.

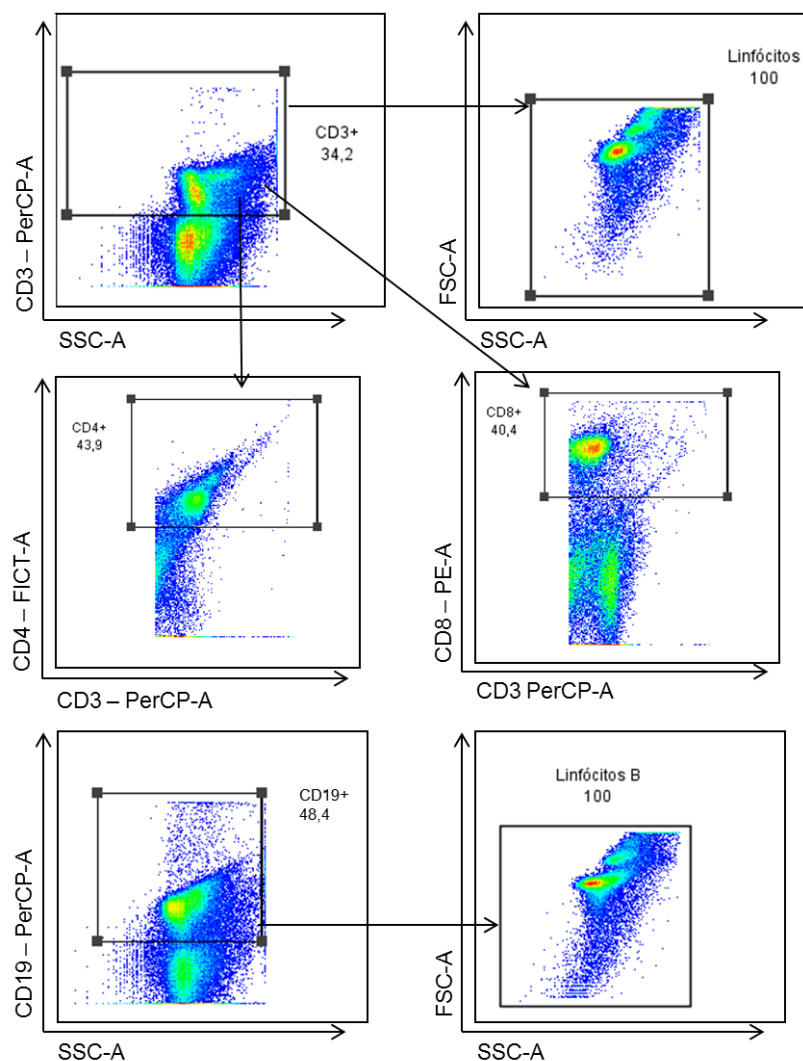


Figura 7: Estratégia de análise utilizada para fenotipagem das células marcadas com anticorpos anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8. As células T foram selecionadas a partir das células CD3<sup>+</sup> e, em seguida, foram identificadas as populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Da mesma forma foi realizada a seleção das células B, CD19<sup>+</sup>, que determina a porcentagem de células B no baço dos animais dos grupos experimentais.

#### 4.12 Determinação dos níveis de anticorpo sorológicos em animais imunizados por meio da técnica de ELISA

Os níveis de IgG total foram dosados por meio da técnica de ELISA seguindo-se padronização prévia. Para tal, as placas foram recobertas com 1 µg/poço do antígeno total extraídos de *P. berghei* ANKA ou NK65, preparado como descrito anteriormente (item 4.2). Para a sensibilização das placas, os antígenos foram diluídos em tampão carbonato (0,018 M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,034 M de NaHCO<sub>3</sub>, 0,002 M de NaN<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O qsp 1 L) e distribuídos a 50µL/poço, seguindo-se incubação das placas a 4 °C, por no mínimo 16 horas. As placas foram, então, lavadas com tampão fosfato contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-Tween 0,05%) seguindo-se adição de 150 µL/poço de solução bloqueadora (5% de caseína derivada de leite (Molico, Nestlé) diluída em PBS-Tween 0,05%). As placas foram, então, incubadas por 2h a 37°C sendo novamente lavadas quatro vezes com PBS-Tween 0,05%.

As amostras de soro foram adicionadas às placas (50 µL/poço) depois de serem diluídas (1:100) em PBS-Tween 0,05% contendo 5% de caseína. As amostras foram incubadas por 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente sendo a seguir lavadas 4x com PBS-Tween 0,05%. Então, o anticorpo monoclonal anti-IgG conjugado à enzima peroxidase (KLP) foi adicionado a cada poço (volume de 50 µL) na diluição 1:2500. Após incubação por 1 hora a 37°C as placas receberam a adição de substrato (TMB, Beckton Dickinson) sendo incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. A reação foi, então, interrompida com ácido sulfúrico (1:20) (30 µL/poço) e a densidade ótica mensurada a partir de um espectrofotômetro ao comprimento de onda de 450 nm.

Para determinar o índice de reatividade (IR) a média da absorbância obtida das duplicatas foi dividida pelo valor de *cutoff* (valor obtido somando-se a média das absorbâncias provenientes do soro de 6 animais sadios com 3 desvios padrões (DP)).

#### 4.13 Testes estatísticos

Para análise estatística dos dados obtidos durante o desenvolvimento do presente trabalho foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk ( $n < 30$  amostras) e quando a distribuição dos dados apresentou normalidade foi utilizado posteriormente o teste de análise de variância por One Way-ANOVA, com pós-teste para comparação múltipla de Tukey. Quando as análises não apresentaram distribuição Normal, foi utilizado o teste de Mann-Whitney ou teste t-Student. Para todos os testes foi estabelecido nível de significância de 5% ( $*p < 0,05$ ). As análises foram realizadas por meio do software GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad Inc., EUA).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise da eficácia da vacinação com extrato bruto de PbN contra o desenvolvimento de malária cerebral em animais C57BL/6 desafiados com PbA

Para investigarmos a eficácia da imunização com extrato proteico de *P. berghei* NK65 ou *P. berghei* ANKA contra o desenvolvimento de malária cerebral em modelo murino, os animais imunizados foram desafiados com *P. berghei* ANKA e, então, acompanhados diariamente para a determinação das suas condições físico/clínica (Figura 8) e da curva de mortalidade (Figura 9).

Como esperado, animais pertencentes aos grupos controle (somente desafiados com PbA ou previamente imunizados com CPG-ODN), demonstraram alterações clínicas progressivas a partir do 6º dia da infecção com PbA evoluindo para óbito entre o 7º e o 10º dia (Figura 8 A e B e Figura 9). Todos os animais pertencentes a esses grupos morreram de malária cerebral (escore clínico  $\leq 5$ ) como demonstrado pela técnica de Azul de Evans (Figura 11 E e F). Essa técnica possibilita a visualização macroscópica do rompimento da barreira hematoencefálica.

Por outro lado, animais imunizados com extrato proteico de PbN associado ao adjuvante CPG-ODN, bem como aqueles imunizados com PbA associado ao mesmo adjuvante, apresentaram padrão variado de alteração clínica ao longo do tempo de avaliação (Figura 8 C e D). Em ambos os grupos, os animais que demonstram sinais de acometimento neurológico, vieram a óbito entre o 6º e o 7º dia após desafio experimental, apresentando escore clínico  $\leq 5$ . Interessantemente, 46% (6/13) dos animais imunizados com PbN e desafiados com PbA e 69% (9/13) dos quais foram imunizados com PbA e desafiados com parasito homólogo mostraram-se protegidos contra danos neurológicos (Figura 8 C e D). Esses animais (n=15) foram então eutanasiados a partir do 12º dia para avaliação de parâmetros histopatológicos e imunológicos (Figura 9). No momento da eutanásia, 73,3% dos animais eutanasiados apresentavam escore clínico  $\geq 8$  (Figura 8 C e D). A figura 8 E ilustra os dados compilados de avaliação clínica obtido para cada grupo experimental.

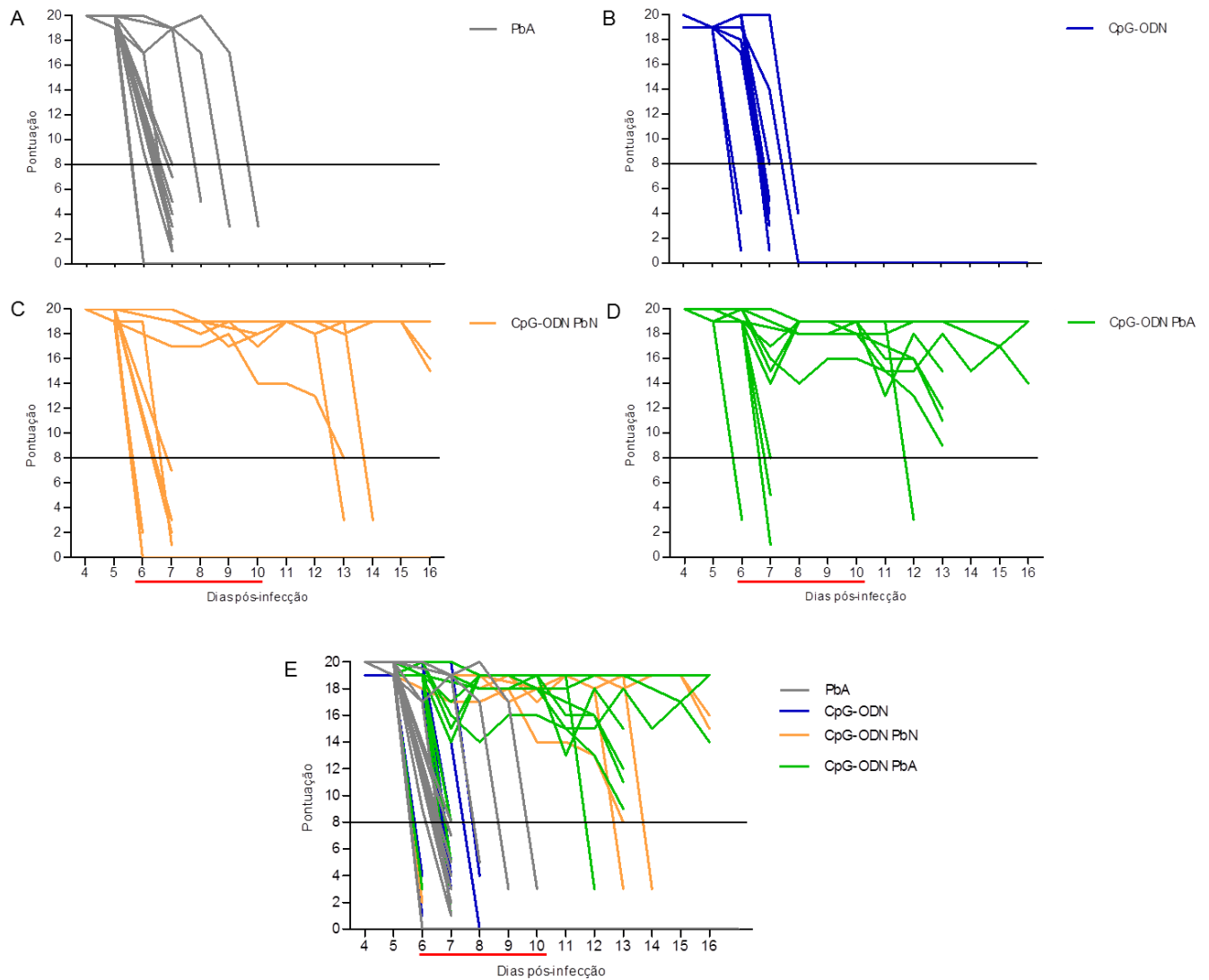


Figura 8: Avaliação clínica dos animais após desafio experimental. A: Grupo de animais apenas desafiados. (n=13) B: grupo imunizado com adjuvante e desafiado com PbA (n=12). C: grupo imunizado com CpG-ODN associado a extrato proteico de PbN e desafiado com PbA (n=13). D: grupo imunizado com CPG-ODN associado a antígeno de PbA e desafiado com PbA (n=13). E: gráfico composto por todos os grupos experimentais. O desenvolvimento do quadro de malária cerebral ocorreu entre o período do dia 6 ao dia 10º dia pós-infecção com *P. berghei* ANKA.

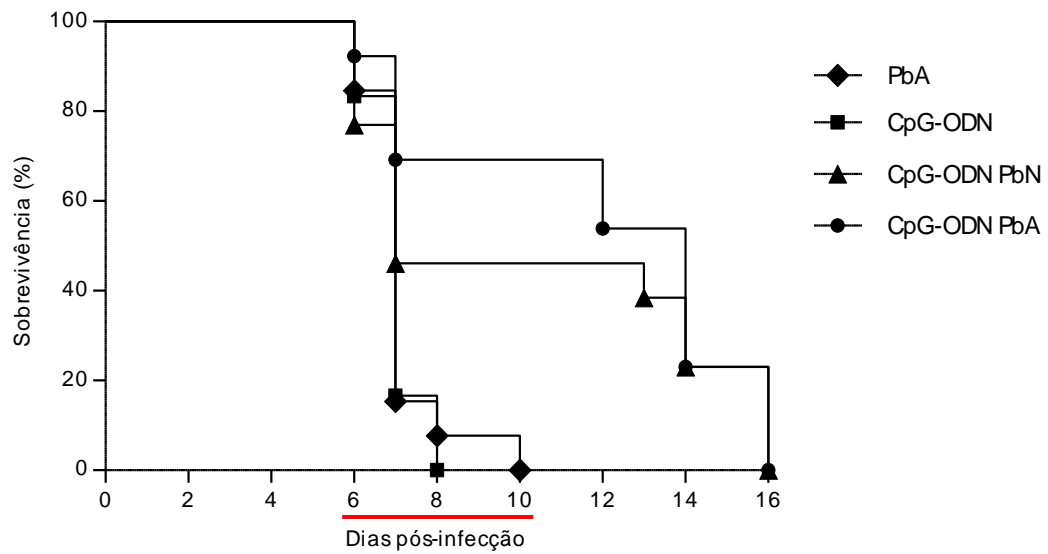


Figura 9: Taxa de sobrevivência dos animais após desafio experimental. PbA: grupo apenas desafiado com *Plasmodium berghei* ANKA (n=13). CpG-ODN: grupo imunizado duas vezes com adjuvante e desafiado com PbA (n=12). CPG-ODN PbN: grupo imunizado duas vezes com extrato proteico de *Plasmodium berghei* NK65 associado ao adjuvante CPG-ODN e desafiado com PbA (n=13). CPG-ODN PbA: grupo imunizado duas vezes com extrato proteico de PbA associado ao adjuvante CPG-ODN e desafiado com PbA (n=13). Em vermelho está representado o período para desenvolvimento de malária cerebral em camundongos C57BL/6 em infecções por PbA.

## 5.2 Determinação dos níveis de parasitos circulantes em animais imunizados com antígeno proteico de PbN e desafiados experimentalmente com PbA

O desenvolvimento da parasitemia foi avaliado diariamente para verificarmos se a estratégia de imunização com antígeno proteico de *P. berghei* NK65 seria capaz de controlar o desenvolvimento da infecção por *P. berghei* ANKA, espécie causadora de malária grave em camundongos C57BL/6. Para tal, os níveis de parasitemia foram determinados por citometria de fluxo, sendo 20% das amostras também avaliadas por meio da análise microscópica de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa. A variação de apenas 1-2% nos níveis de parasitos verificados por ambas as técnicas nos permitiu validar a citometria de fluxo para uso em nossos experimentos.

Os dados de parasitemia obtidos diariamente para os grupos avaliados encontram-se descritos na Figura 10. Observa-se que para o grupo de animais somente desafiados com PbA e para aqueles previamente imunizados com CPG-ODN, os níveis de parasitos circulantes foi inferior a 9%, sugerindo morte por acometimento neurológico como evidenciado pela análise físico/clínica dos animais. Por outro lado, 46% e 69% dos animais imunizados com extrato proteico de PbN e PbA associado ao CPG-ODN, respectivamente, os quais não desenvolveram malária cerebral, apresentaram parasitemia crescente a partir do 9º dia após infecção atingindo picos médios de 31% (n=4) e 38% (n=7), respectivamente, no 15º dia após desafio experimental. Essas parasitemias definiram, junto com a análise clínica dos animais, o estabelecimento de um quadro de hiperparasitemia.

Para certificarmos de que os animais que evoluem para óbito por malária cerebral apresentam carga parasitária inferior àqueles que evoluem para óbito por hiperparasitemia, a parasitemias médias foram comparadas para os grupos imunizados com PbN e PbA. Em relação aos animais imunizados com PbN, aqueles que morreram por hiperparasitemia apresentaram frequência média de parasitos circulantes significativamente superior àqueles que morreram de malária cerebral (parasitemia média: 24 *versus* 3.3%, respectivamente; Teste de Mann-Whitney;  $p=0.01$ ). Dados similares foram observados para animais imunizados com PbA

(parasitemia média 27 *versus* 3.1% para animais que morreram por hiperparasitemia e malária cerebral, respectivamente; Teste de Mann-Whitney;  $p=0.03$ ).

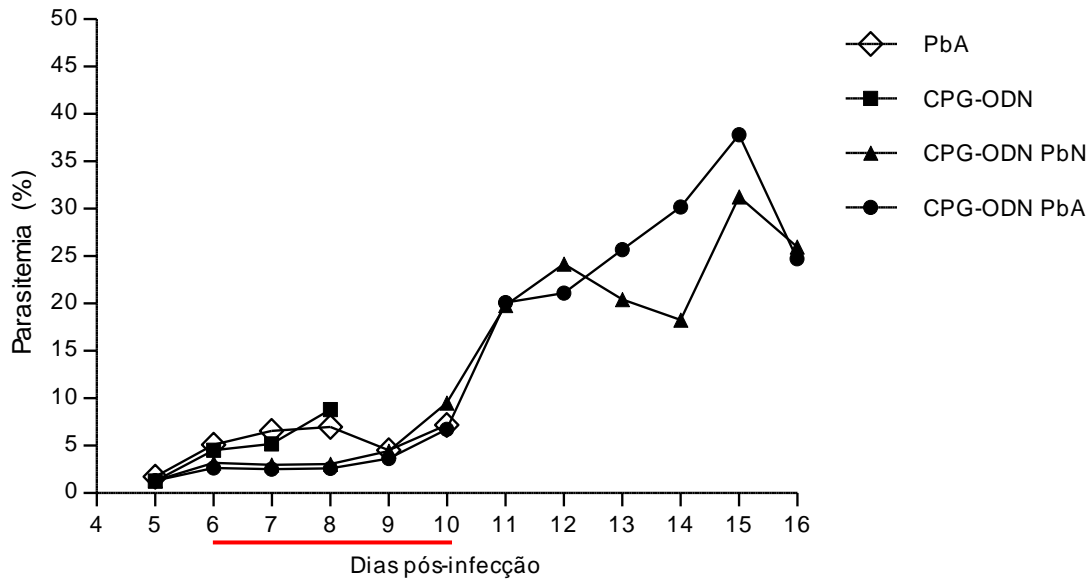


Figura 10: Níveis de parasitemia apresentados pelos animais após desafio experimental. PbA: grupo apenas desafiado com *Plasmodium berghei* ANKA. CpG-ODN: grupo imunizado duas vezes com adjuvante e desafiado com PbA. CPG-ODN PbN: grupo imunizado duas vezes com extrato proteico de PbN associado ao adjuvante CPG-ODN e desafiado com PbA. CPG-ODN PbA: grupo imunizado duas vezes com extrato proteico de PbA associado ao adjuvante CPG-ODN e desafiado com PbA. Em vermelho está representado o período para desenvolvimento de malária cerebral em camundongos C57BL/6 em infecções por PbA.



### **5.3 Avaliação macroscópica e histopatológica do cérebro de animais imunizados apresentando malária cerebral e hiperparasitemia.**

Após eutanásia, os camundongos C57BL/6 foram, em sua maioria, decapitados para verificação da presença ou não áreas de hemorragias no cérebro. Para tal, procedeu-se a retirada da pele/pelo da parte superior da calota craniana. Independente do grupo avaliado, animais que desenvolveram sintomas neurológicos compatíveis de malária cerebral apresentaram nítidas áreas de hemorragia no tecido nervoso (Figura 11 D). Por outro lado, os animais que desenvolveram hiperparasitemia apresentaram aspecto tecidual normal, ou seja, idêntico ao dos animais controle (Figura 11 G e A, respectivamente), corroborando que a hiperparasitemia ocorreu independentemente de acometimentos neurológicos.

Para avaliarmos o comprometimento da barreira hematoencefálica animais apresentando ou não sintomas neurológicos foram inoculados (via i.v.) com o corante azul de Evans, o qual se liga a albumina plasmática. Assim, o rompimento da barreira hematoencefálica pode ser visualizado pelo aspecto azulado de todo o tecido nervoso. Animais que desenvolveram sinais compatíveis de malária cerebral apresentaram intensa concentração de corante no cérebro e, conseqüentemente, intensa inflamação tecidual (Figura 11 E). Por outro lado, a menor intensidade de corante observado no cérebro de animais hiperparasitêmicos sugere menores danos teciduais (Figura 11 H).

Para confirmarmos a ocorrência de alterações teciduais no cérebro observadas macroscopicamente, o tecido nervoso foi, então, avaliado histopatologicamente. Pela análise microscópica do tecido foi possível observar que, independentemente do grupo avaliado, animais que desenvolveram quadro compatível com malária cerebral apresentaram áreas de hemorragia no parênquima, vasos sanguíneos parcialmente ou completamente obstruídos por leucócitos e hemácias parasitadas/sadias. Em alguns casos, ainda foi possível observar a presença de hemozoína, pigmento derivado do metabolismo dos parasitos, dentro de leucócitos (Figura 12 D). Já em relação aos animais que apresentaram quadro de hiperparasitemia sanguínea, independente do grupo experimental avaliado, a presença de leucócitos aderidos ao endotélio vascular, bem como a presença de vasos obstruídos por hemácias aderidas aos vasos foi nitidamente inferior ao

observado em animais que desenvolveram malária cerebral, novamente sugerindo que nesses animais o nível de inflamação tecidual é inferior a observada em animais com acometimento neurológico (Figura 12 E e F).

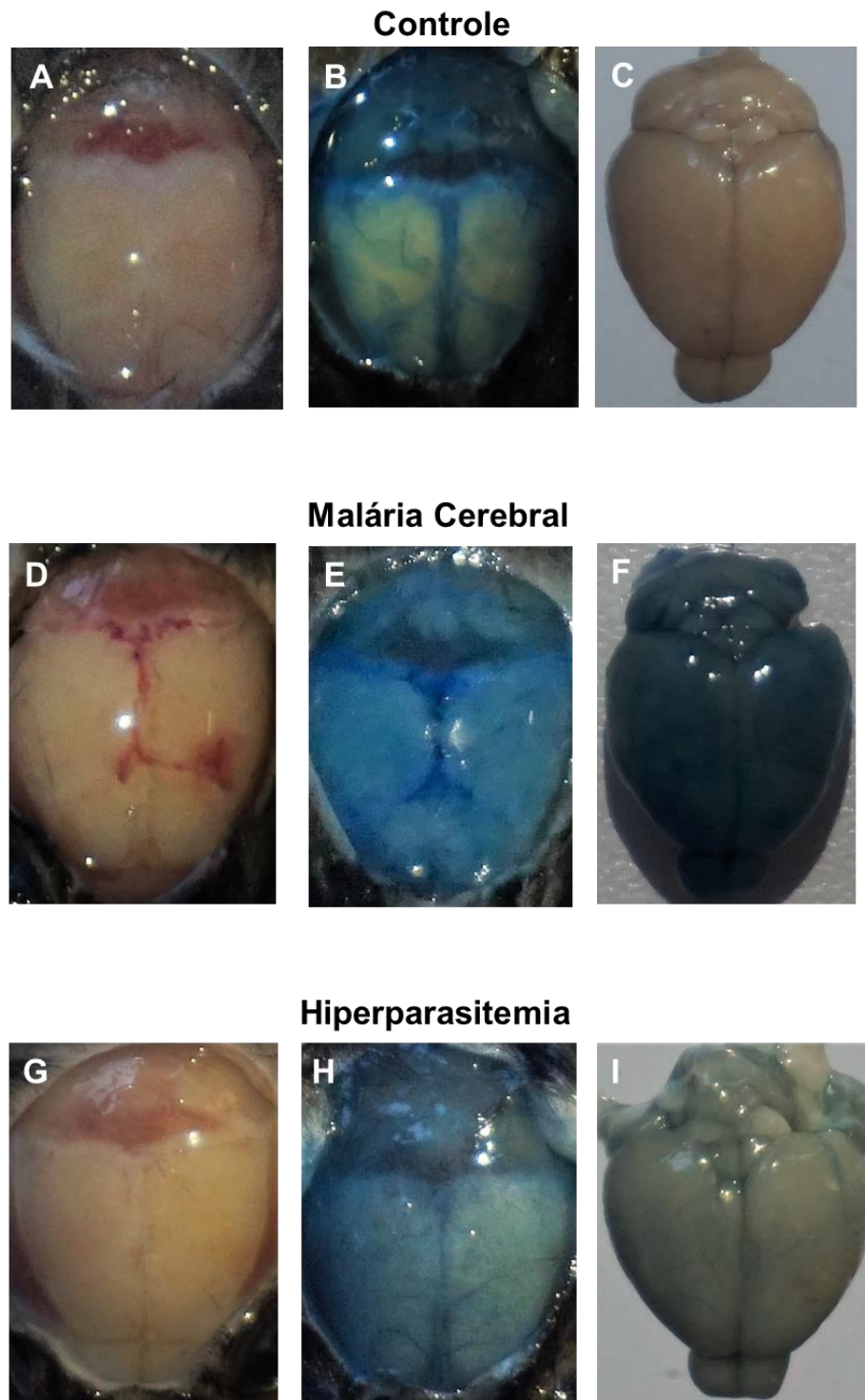


Figura 11: Fotografias macroscópicas do cérebro dos animais que desenvolveram quadro de malária cerebral e hiperparasitemia. A, D e G: foto da calota craniana dos animais controle, animais com malária cerebral e hiperparasitemia respectivamente. As fotos B, E e H demonstram a calota craniana após o processo de marcação com azul de Evans dos animais controle, animais com malária cerebral e hiperparasitemia respectivamente. C, J, I: cérebro dos animais controle, com malária cerebral e hiperparasitemia após remoção da calota craniana.

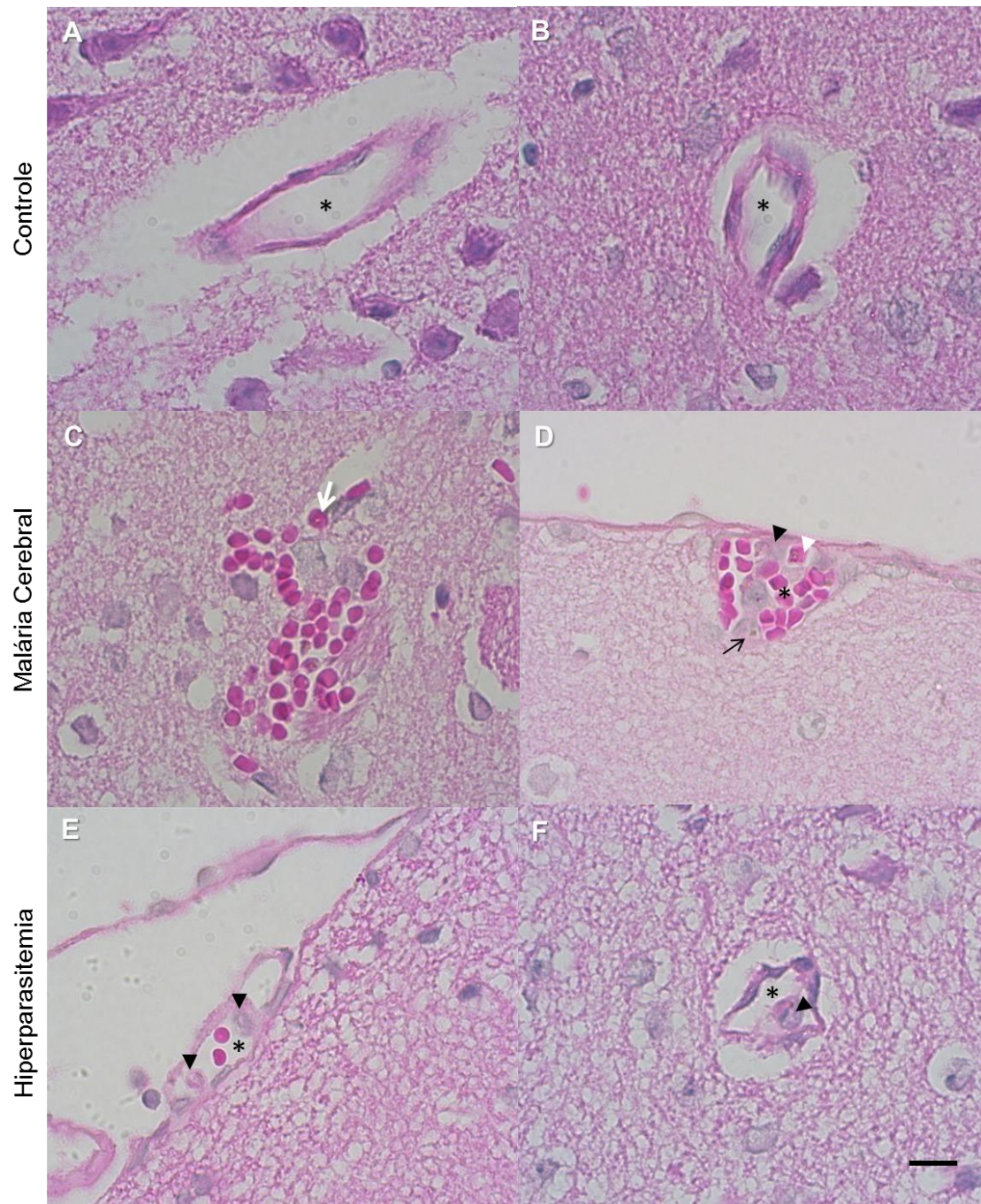


Figura 12: Histopatologia do cérebro de animais controle (A e B), animais que desenvolveram quadro de malária cerebral (C e D) e de animais que desenvolveram hiperparasitemia (E e F). Nas imagens A e B: camundongos controle, vasos desobstruídos. C e D: camundongos com MC, C: região de hemorragia no tecido cerebral com presença de diversas hemácias; D: vaso sanguíneo na região da meninge obstruído por hemácias e leucócitos. E e F: cérebro de camundongos com HP: E: vaso sanguíneo da meninge cerebral com dois leucócitos aderidos e duas hemácias. F: vaso sanguíneo com adesão de leucócito. \*: vaso sanguíneo; seta branca: hemácias; cabeça de seta branca: hemácia parasitada por *P. berghei* ANKA; seta preta: leucócito com hemozoína; cabeça de seta preta: leucócitos. Barra: 10  $\mu$ m, aumento de 100x.

#### **5.4 Análise dos níveis de citocinas anti-inflamatórias (IL-10) e pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ ) no cérebro dos camundongos segundo padrão clínico apresentado**

Considerando que a malária cerebral parece ser um evento mediado pelo balanço entre citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias, nós então, investigamos por meio do ELISA, os níveis de IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  no cérebro de animais apresentado esse fenótipo clínico em relação àqueles apresentando hiperparasitemia (Figura 13).

Como observado na figura 13, entre as citocinas detectadas no cérebro dos animais que desenvolveram malária cerebral, independente do grupo avaliado, a IL-10 foi aquela que apresentou os maiores níveis teciduais (>1000pg), enquanto TNF- $\alpha$  foi a citocina detectada em menores níveis (< 200 pg). Conforme esperado, os níveis de IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  estiveram significativamente aumentados no cérebro de animais que apresentaram sinais neurológicos do que no cérebro daqueles que apresentaram aumento da parasitemia circulante, porém, sem acometimento neurológico (Teste T student;  $p=0,002$ ;  $p=0,04$  e  $p=0,01$ , respectivamente).

As razões observadas entre os níveis de citocinas IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  no grupo de animais que desenvolveram malária cerebral em relação aos hiperparasitemicos foram 3:1, 4:1 e 3:1, respectivamente.

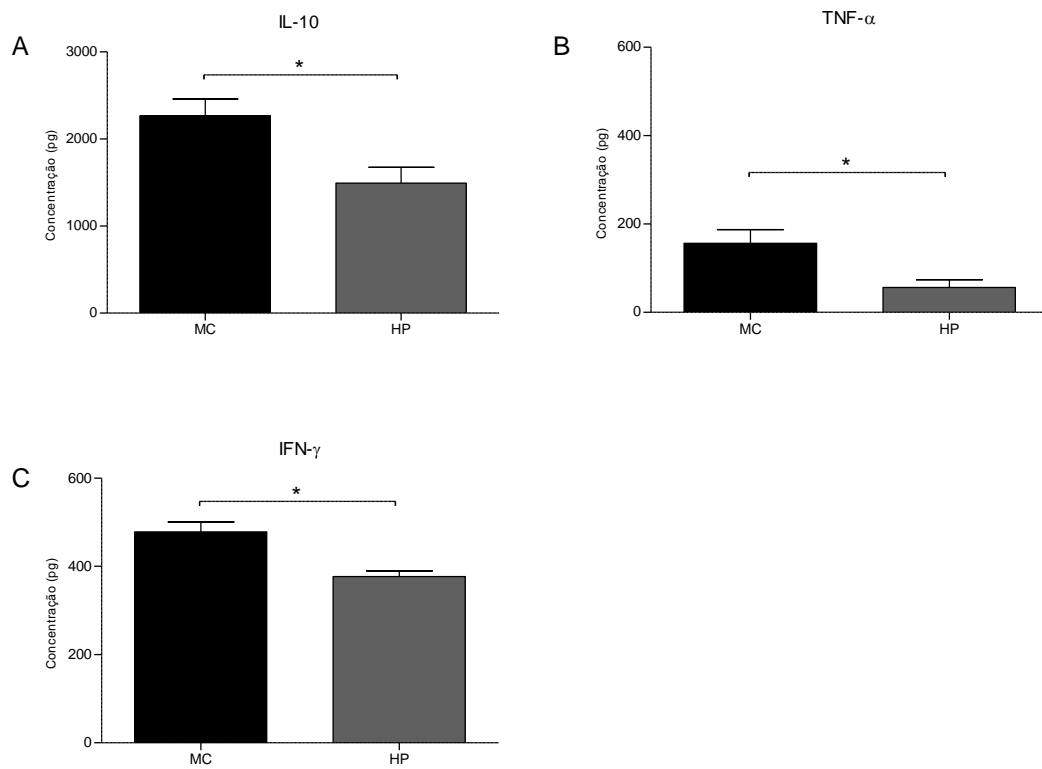


Figura 13: Concentração de citocinas detectadas por ELISA a partir de homogenato de cérebro. IFN- $\gamma$ : interferon gama; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa; IL-10: interleucina 10. MC: animais que desenvolveram quadro clínico de malária cerebral. HP: animais que desenvolveram quadro de hiperparasitemia após desafio experimental. MC: malária cerebral; HP: hiperparasitemia.

## 5.5 Impacto das imunizações na perda de peso e na atividade esplênica dos animais imunizados com antígeno proteico de PbN e PbA associado ao adjuvante CPG-ODN

Para avaliarmos o impacto das imunizações no peso corporal, todos os animais, independentemente do grupo experimental, foram pesados antes das imunizações e da eutanásia (Figura 14 A). Como observado, animais controles não apresentaram variação no seu peso corporal no período em que foram mantidos no laboratório sob as mesmas condições dos animais experimentais (One-Way Anova;  $p>0.05$ ). Em contraste, animais somente desafiados com PbA, portanto, sem imunização prévia, apresentaram significativa perda peso ( $\pm 2.92$  g) após desafio experimental (média de  $20,90 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$  versus  $17,95 \pm 1,98 \text{ g}$ ; teste One-way Anova;  $p=0,001$ ). Para os grupos imunizados, resultados semelhantes foram observados, isto é, imediatamente antes da eutanásia, os animais imunizados com CpG-ODN, CpG-ODN-PbN ou CpG-ODN-PbA apresentaram perda de peso variando de 2,72 a 2,87 gramas em relação ao seu peso determinado imediatamente antes dos processos de imunização. Interessantemente, dentro de cada grupo experimental o peso médio corporal dos animais que morreram de malária cerebral e aqueles que desenvolveram hiperparasitemia foi similar (dados não mostrados;  $p>0.05$ ). Esses resultados sugerem que a perda de peso está associada à infecção malárica e não a fatores decorrentes das imunizações.

A seguir, nós investigamos a influência das imunizações na atividade esplênica dos animais experimentais. Conforme observado na Figura 14 B, não houve diferença no índice esplênico apresentado por animais sadios (controle) e imunizados com CPG-ODN em relação àqueles infectados com PbA (teste One-Way Anova;  $p>0.05$ ). Por outro lado, animais imunizados com CpG-ODN PbN ou CpG-ODN PbA e posteriormente desafiados com PbA apresentaram baço significativamente maior que àqueles somente infectados com essa espécie de parasito (dado não mostrado; teste One-way Anova;  $p<0.05$ ) sugerindo que o aumento do baço poderia estar associado aos processos imunogênicos. Então, para investigarmos essa hipótese, os animais imunizados pertencentes aos grupos CpG-ODN PbN e CpG-ODN PbA foram divididos de acordo com o perfil clínico apresentado: malária cerebral e hiperparasitemia (Figura 14B). Apesar de animais

hiperparasitêmicos, independentemente do grupo avaliado, apresentarem esplenomegalia significativamente superior àqueles que desenvolveram malária cerebral (teste One-way Anova;  $p < 0,0001$ ), observa-se que os animais com comprometimento neurológico ainda apresentam índice esplênico superior a de animais somente desafiados com PbA (teste One-way Anova ;  $p < 0,0001$ ). Esses resultados sugerem que a esplenomegalia observada em animais imunizados também pode ter sido influenciada, mesmo que em pequena proporção, pelos procedimentos de indução de imunidade.

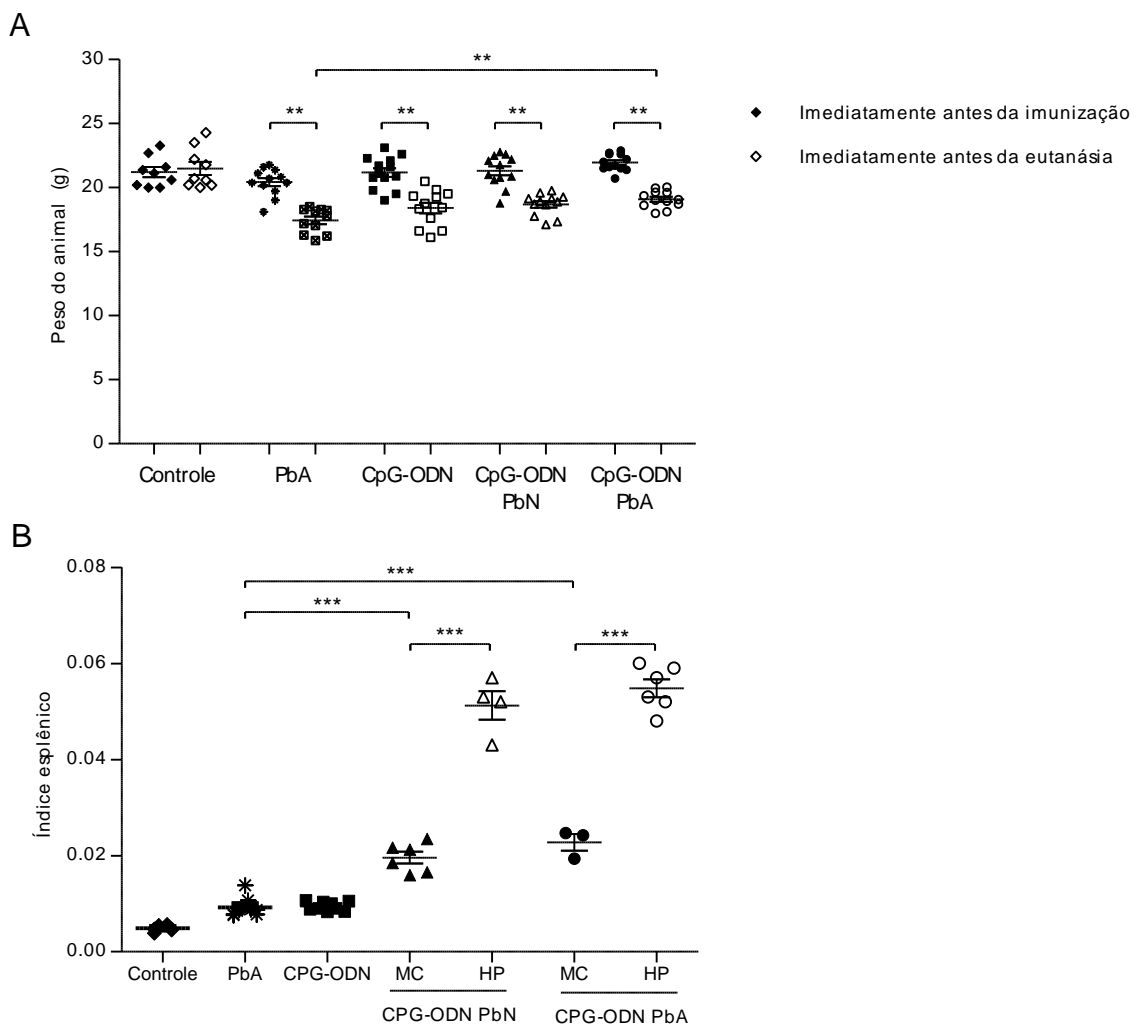


Figura 14: (A) Peso dos animais antes e depois do desafio experimental e (B) índice esplênico apresentado pelos grupos após o desafio. Controle: animais não imunizados e não desafiados. PbA: grupo apenas desafiado com *Plasmodium berghei* ANKA. CpG-ODN: grupo imunizado duas vezes com adjuvante e desafiado com PbA. CPG-ODN PbN: grupo imunizado duas vezes com extrato proteico de *Plasmodium berghei* NK65 associado ao adjuvante CPG-ODN e desafiado com PbA. CPG-ODN PbA: grupo imunizado duas vezes com extrato proteico de PbA associado ao adjuvante CPG-ODN e desafiado com PbA MC: animais que desenvolveram quadro de malária cerebral. HP: animais que desenvolveram quadro de hiperparasitemia sanguínea. \*\* $p=0,001$ ; \*\*\* $p=0,0001$



## 5.6 Análise da população celular presente no baço dos animais

O baço é um órgão de grande importância durante o controle das mais diversas infecções, sendo capaz não somente de remover antígenos circulantes, mas também de exercer atividade hematopoiética e de iniciar as respostas imunes inatas e adaptativas (ENGWERDA; BEATTIE; AMANTE, 2005; WLUKA & OLSZEWSKI, 2006). Especificamente, a resposta imune adaptativa pode ser mediada tanto por células T e B que residem ou que são recrutadas a partir desse órgão para os sítios de infecção (BRONTE; PITTET, 2013). Assim, para investigar se o padrão típico de morte por malária cerebral ou por hiperparasitemia observado nos animais imunizados com extrato proteico de PbN ou PbA associado ao adjuvante CPG-ODN foi influenciado por alterações no perfil de células esplênicas, células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) foram quantificados por meio de citometria de fluxo.

Em relação aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (Figura 16 A e B), observou-se que animais hiperparasitêmicos apresentaram redução no número absoluto dessas células em relação àqueles que desenvolveram malária cerebral e aos animais saudáveis (Teste t-student;  $p=0,001$ ). Intrigantemente, animais que desenvolveram malária cerebral e animais saudáveis apresentaram número similar para ambos os tipos celulares.

Em relação aos linfócitos B (expressando o marcador CD19<sup>+</sup>; Figura 16 C), observou-se resultados similares aos observados para os linfócitos T, ou seja, a hiperparasitemia foi acompanhada pela redução significativa desses linfócitos em relação ao número determinado fenotipicamente nos animais que demonstraram sinais neurológicos e/ou saudáveis (Teste t-student;  $p<0,001$ ). Não houve diferença no perfil de linfócitos B entre animais saudáveis e apresentando sinais neurológicos.

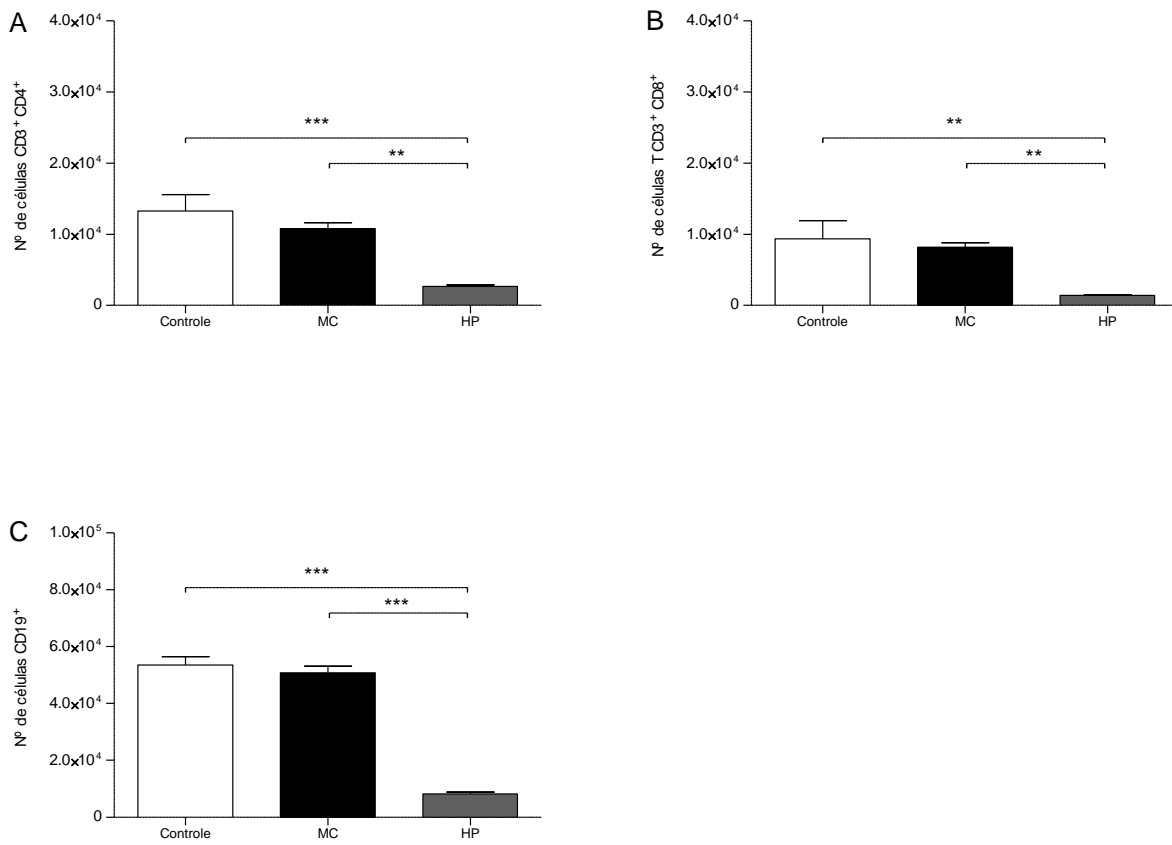


Figura 15: número de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup> e linfócitos B presentes no baço dos animais após desafio experimental. Controle: animais não imunizados e não desafiados. MC: animais com quadro clínico de malária cerebral. HP: animais com quadro clínico de hiperparasitemia. \* $p < 0,05$

### **5.7 Avaliação da ocorrência de imunidade humoral transcendente a cepa em animais imunizados com antígeno proteico de PbN e PbA associado ao adjuvante CPG-ODN**

Para investigarmos se nosso protocolo experimental de imunização foi capaz de induzir resposta imune humoral e, ainda, se essa resposta foi capaz de reconhecer antígeno homólogo e heterólogo ao utilizado no ensaio vacinal, soro dos animais imunizados foram testados por meio de ELISA utilizando-se os antígenos proteicos PbA e PbN.

Em contraste ao observado para animais somente desafiados, onde anticorpos IgG anti-parasito estiveram ausentes ( $IR < 1$ ), aqueles imunizados soroconverteram ( $IR \geq 1$ ) independentemente se a imunização foi realizada utilizando-se o antígeno proteico PbN ou PbA (Figura 15 A e C). Interessantemente, esses animais apresentaram anticorpos IgG capazes de reconhecer tanto o antígeno homólogo quanto o heterólogo àquele utilizado no processo de imunização experimental (Figura 15) porém, o antígeno produzido a partir de *P. berghei* NK65 (PbN) foi melhor reconhecido tanto por animais imunizados com PbN quanto por aqueles imunizados com PbA associado ao adjuvante CPG-ODN (Figura 15 A). Especificamente, anticorpos IgG presente no soro de animais imunizados com PbN reconheceram esse antígeno com IR 2,5 vezes superior ao observado para o antígeno heterólogo PbA. Da mesma forma, anticorpos IgG presente no soro de animais imunizados com PbA reconheceram o antígeno PbN com IR 1,7 vezes superior ao observado para o antígeno homólogo PbA.

Para verificarmos se os anticorpos IgG poderiam influenciar o padrão de malária clínica apresentado pelos animais, esses foram subdivididos em malária cerebral e hiperparasitemia considerando-se o protocolo de imunização utilizado (PbN ou PbA associado ao adjuvante CPG-ODN) (Figura 15 B e D). Como observado, apesar do antígeno PbN ser o mais reconhecido por animais imunizados pertencentes a ambos os grupos (extrato proteico de PbN e PbA associado ao adjuvante CPG-ODN), esses anticorpos parecem não influenciar o padrão de malária clínica visto que não há diferença nos níveis detectados independentemente dos grupos de imunização e do padrão clínico considerado.

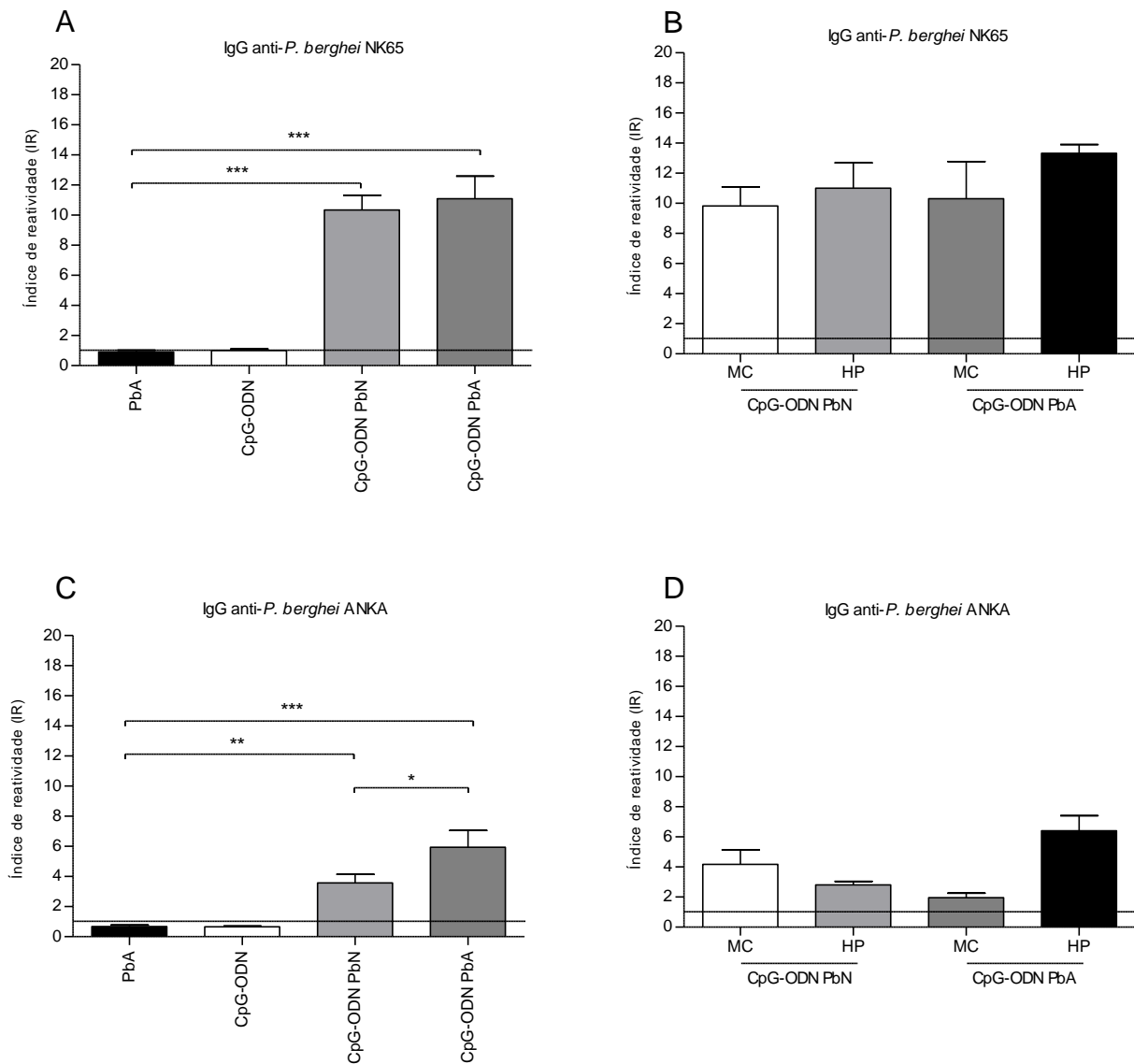


Figura 16: Níveis de anticorpos IgG detectados no soro dos animais experimentais. A: índice de reatividade (IR) apresentado pelos anticorpos IgG no reconhecimento de antígenos de *P. berghei* NK65. B: IR apresentado pelos anticorpos IgG presentes no soro dos animais que desenvolveram MC e HP nos grupos CpG-ODN PbN e CpG-ODN PbA no reconhecimento de antígenos de PbN. C: IR apresentado pelos anticorpos IgG no reconhecimento de antígenos de *P. berghei* ANKA. D: IR apresentado pelos anticorpos IgG presentes no soro dos animais que desenvolveram MC e HP nos grupos CpG-ODN PbN e CpG-ODN PbA no reconhecimento de antígenos de PbA.

## 6 DISCUSSÃO

Considerando o atual cenário relacionado à distribuição de malária no mundo o desenvolvimento de uma vacina efetiva e segura para uso em humanos ainda constitui uma grande prioridade (KARUNAMOORTHY, 2014).

Independente se em modelos de malária murina ou em humanos, vários protótipos vacinais já foram testados, incluindo uso de parasitos vivos (atenuados ou não) e vacinas de subunidades antigênicas. Seja com o objetivo de evitar uma nova infecção ou de combater parasitos de fase sanguínea, evitando assim a manifestação da doença, os melhores resultados obtidos até o momento foram àqueles provenientes de estudos utilizando parasitos vivos, seja de estágio pré-eritrocítico (esporozoítos) ou eritrocítico (trofozoítos) (BELNOUE et al., 2004b; CULLETON et al., 2011; GERALD et al., 2011; NUSSENZWEIG et al., 1967, 1972; RÉNIA et al., 2006a; SEDER et al., 2013; TARTZ et al., 2013). Contudo, as limitações oriundas do uso dessas vacinas, como as dificuldades de obtenção de esporozoítos e ocorrência de problemas na atenuação dos parasitos possibilitando o desencadeamento de doença clínica, têm incentivado a busca por outras estratégias que possam transpor tais obstáculos. Nesse sentido, destaca-se o uso de proteínas recombinantes para a composição de protótipos vacinais. Porém, a baixa imunogenicidade, a variação antigênica e o elevado polimorfismo encontrado nos principais candidatos vacinais têm sido implicados como potenciais entraves para o sucesso desses protótipos (GENTON et al., 2002). Portanto, nos anos recentes, o uso de extratos proteicos tem despertado o interesse de importantes grupos de pesquisa, sobretudo por ser considerada uma estratégia segura em relação ao uso de parasitos vivos e por apresentar maior potencial imunogênico quando comparado a antígenos recombinantes (revisto por GOOD, 2011).

Apesar da vasta literatura enfatizando o uso de parasitos vivos ou mortos para indução de imunidade antimalárica direcionada tanto a parasitos de fase hepática quanto sanguínea, esse é, com base em nosso conhecimento literário, o primeiro estudo que investiga se a indução de resposta imune com extrato proteico proveniente de um parasito de baixa virulência é capaz de proteger contra o desenvolvimento da doença grave, especificamente a malária cerebral. Os

resultados obtidos por nós a partir do estudo conduzido em modelo murino serão discutidos a seguir.

### **6.1 Imunização com extrato proteico de PbN é capaz de induzir proteção contra desenvolvimento de malária cerebral em modelo murino**

Apesar de não reproduzir exatamente todos os aspectos da malária cerebral humana, o modelo murino de malária cerebral, representado pela infecção de camundongos consanguíneos C57BL/6 e CBA com *P. berghei* ANKA (ENGWERDA et al., 2005; LOU; LUCAS; GRAU, 2001), tem sido fundamental para a geração de conhecimentos que possam ser extrapolados para humanos (revisito por RÉNIA et al., 2012). Relativo a esse quadro clínico, as principais similaridades encontradas nos dois hospedeiros são a ativação e disfunção endotelial com elevada expressão de moléculas de adesão, elevada concentração de citocinas pro-inflamatórias, redução do fluxo sanguíneo, edemas, micro hemorragias, ruptura da barreira hematoencefálica e aumento da permeabilidade vascular, dentre outras (NACER et al., 2014). Nesse estudo, nós demonstramos que 46% dos animais imunizados com extrato proteico de PbN foram protegidos contra o desenvolvimento de malária cerebral, ou seja, não apresentaram qualquer sinal clínico sugestivo de acometimento neurológico. Esses animais tiveram sua sobrevivência prolongada sendo eutanasiados entre o 13<sup>o</sup> e 16<sup>o</sup> dia após a infecção com a cepa letal PbA. Por outro lado, animais que evoluíram para o quadro de malária cerebral (54%) sucumbiram ao óbito entre os dias 6 e 10 após o desafio com PbA. Como observado em outros estudos, tais animais apresentaram baixa carga parasitária (<10%), além de sinais clínicos como perda de equilíbrio e agressividade, paralisia e ataxia (BAO et al., 2013; ENGWERDA et al., 2005; GOOD et al., 2005; JENNINGS et al., 1997). Esse dado contraria estudos prévios de imunização desenvolvidos em modelos experimentais (CHEESMAN et al., 2006; CULLETON et al., 2011) e em humanos (EISEN et al., 2002), que sugerem que a variação antigênica entre as cepas de parasitos circulantes levam preferencialmente ao fenômeno conhecido como “imunidade cepa-específica”. Portanto, os resultados dessas pesquisas sugerem que indivíduos vacinados são capazes de desenvolver forte imunidade contra cepas homólogas àquelas que integram o protótipo vacinal, mas não contra cepas

heterólogas. Uma possível explicação para essa divergência nos resultados pode estar relacionada à concentração antigênica utilizada nos protótipos vacinais já que em estudos conduzidos em modelo murino o uso de doses baixas de antígeno permitiu indução de imunidade capaz de proteger os animais contra o desafio com cepas heterólogas do parasito (ELLIOTT; KUNS; GOOD, 2005; PINZON-CHARRY et al., 2010). Deve-se ressaltar, no entanto, que o índice de proteção (no nosso caso de 69%) é ligeiramente maior quando o antígeno utilizado no protocolo de imunização é idêntico ao utilizado no desafio experimental. Interessantemente, um estudo recente publicado por Heiss et al (2018) demonstrou que animais experimentais imunizados com esporozoítos de *P. berghei* ANKA, foram protegidos contra o desenvolvimento de malária cerebral, mas não contra a infecção, quando desafiados por parasito homólogo (HEISS et al., 2018).

Apesar de nosso estudo sugerir que a imunidade induzida por PbN e PbA protege aproximadamente 50% e 70% dos animais, respectivamente, contra o desenvolvimento de malária cerebral, esses não mostram-se protegidos contra o desenvolvimento de parasitemia sanguínea tornando-se, portanto, hiperparasitêmicos a partir do 11º dia após desafio experimental. Esses dados corroboram um estudo prévio onde animais previamente imunizados com *P. berghei* ANKA de fase sanguínea, porém atenuados por irradiação, apesar de protegidos contra o desenvolvimento de malária cerebral após desafio com cepa homóloga, sucumbiram ao óbito graças ao desenvolvimento de hiperparasitemia (GERALD et al., 2011). Cabe ressaltar que apesar desses nossos animais não apresentarem sinais neurológicos eles apresentaram leucócitos aderidos no endotélio vascular, porém em quantidade inferior ao verificado naqueles com sinais evidentes de malária cerebral. Esses dados corroboram um estudo recente onde leucócitos foram quantitativamente menos abundantes no cérebro de animais hiperparasitêmicos em relação aos que desenvolveram malária cerebral (NACER et al., 2014). Nesse estudo, os autores ainda demonstram que linfócitos T CD8<sup>+</sup>, macrófagos e neutrófilos foram os tipos celulares mais abundantes no cérebro quando o quadro de malária cerebral foi desencadeado pela infecção. Linfócitos T CD8<sup>+</sup> parecem ser fundamentais na patogênese da malária cerebral visto sua capacidade de matar as células endoteliais após fagocitose de antígenos plasmodiais (RÉNIA et al., 2006b). Em nosso estudo, as populações celulares presentes no cérebro de acordo com o espectro clínico da infecção ainda permanece por ser elucidado.

Em nosso estudo, outra característica marcante em relação ao aspecto histopatológico do cérebro dos animais com malária cerebral foi a presença de vasos completamente obstruídos pela ação conjunta de leucócitos e eritrócitos, bem como de áreas de hemorragias; alterações essas, ausentes nos animais hiperparasitêmicos. Apesar da adesão de eritrócitos aos capilares endoteliais ainda ser um evento que demanda discussão, estudos têm demonstrado que esse parece ser sim um fator fundamental no estabelecimento do quadro de malária cerebral em modelo murino (BAPTISTA et al., 2010; JENNINGS et al., 1997; MCQUILLAN et al., 2011; RÉNIA et al., 2012).

A evolução da infecção malárica para sua forma grave depende, dentre outros fatores, do balanço entre citocinas com perfil pró- e anti-inflamatório (KOSSODO; GRAU, 1993). Assim, visto que em nosso estudo, animais imunizados tanto com antígeno homólogo quanto com antígeno heterólogo ao desafio puderam apresentar dois perfis clínicos distintos (desenvolveram malária cerebral ou hiperparasitemia) nós, a seguir, investigamos a relação entre ambos os espectros clínicos da doença e os níveis de IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  detectados diretamente no tecido nervoso dos animais imunizados. Como demonstrado na figura 13 da seção resultados, animais hiperparasitêmicos apresentaram níveis significativamente reduzidos de todas as citocinas em relação ao observado no cérebro de animais com agravos neurológicos. Realmente, estudos em modelo murino (JENNINGS et al., 1997) e humanos (KWIATKOWSKI et al., 1990) têm demonstrado aumento de citocinas, sobretudo, pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-1) em tecido nervoso quando na presença de sinais neurológicos. Esses achados sugerem que a encefalite observada na malária cerebral também é mediada pela ação sinérgica dessas citocinas, as quais podem ser produzidas localmente pelas células endoteliais e da micróglia (BROWN et al., 1999; MANEERAT et al., 1999), contribuindo assim para produzir efeitos deletérios nos tecidos. Em relação a IL-10, tem-se sugerido que níveis aumentados dessa citocina podem proteger os animais contra os efeitos nocivos promovidos por citocinas pró-inflamatórias (AMANTE et al., 2010; KOSSODO et al., 1997). Especificamente, esses estudos demonstram que o bloqueio do receptor de IL-10 ou a neutralização desta citocina promove o agravamento da infecção com consequente desenvolvimento do quadro de malária cerebral em animais resistentes ou previamente imunizados. Contudo, em nosso



estudo, não foi possível estabelecer uma clara relação entre os níveis dessa citocina e a proteção ou não contra a malária cerebral.

Não se pode desconsiderar, no entanto, 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 (PGE<sub>2</sub>), 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., 2005; PERKINS; KREMSNER; WEINBERG, 2001). Da mesma forma, em modelos murinos, estudos demonstram que o bloqueio da produção de PGE<sub>2</sub> associa-se com mortalidade precoce e desenvolvimento de malária cerebral (BALL et al., 2004; XIAO et al., 1999). Como provável explicação para essas observações estão o fato de PGE<sub>2</sub> regular processos inflamatórios bastante relevantes para a fisiopatologia da malária incluindo produção de mediadores inflamatórios (tais como de TNF- $\alpha$ ), permeabilidade vascular (VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998) e a supressão da atividade leucocitária, tais como quimiotaxia, fagocitose e geração de espécies de oxigênio reativo (revisto por STEVENS et al., 1995). Assim, outros mediadores inflamatórios necessitam ser investigados, de forma que possamos estabelecer uma relação mais estrita entre esses e a malária cerebral.

## **6.2 Índice esplênico e sua relação com imunidade antimalárica**

O baço apresenta funções muito importantes na resposta imune, além de ser um dos sítios de hematopoiese (revisto por ENGWERDA et al. 2005). Nas infecções maláricas, o baço filtra eritrócitos infectados que sofrem deformações pela presença do parasito em seu interior (WEISS, 1989) e aqueles que são opsonizados por anticorpos (revisto por WHITE, 2017). Portanto, é considerado um importante órgão para o controle de infecções intraeritrocíticas (GARNHAM, 1970). Na malária, o baço tende a aumentar rapidamente seu volume tornando-se, muitas vezes, palpável (ou seja, apresenta  $\geq 3$  vezes seu volume normal); o que reflete o aumento da sua atividade (HO et al., 1990; KOTLYAR et al., 2014; revisto por WHITE, 2017). Realmente, a esplenomegalia observada em indivíduos acometidos pela malária

sugere retenção dos eritrócitos infectados e de parasitos no interior do baço, reafirmando, portanto, sua importância no controle da parasitemia (CHOTIVANICH et al., 2002).

Então, nesse estudo nós avaliamos se o protocolo de imunização utilizado foi capaz de aumentar a atividade esplênica, bem como sua relação com o espectro clínico apresentado pelos animais. Como observado, houve significativo aumento da atividade do baço nos animais imunizados em relação aos somente desafiados e saudáveis, independente se utilizado o antígeno de PbN ou PbA. Essa observação está de acordo com o estudo conduzido por GERALD e colaboradores (2011), que notaram o baço aumentado em 1,5 a 2 vezes em animais imunizados com  $10^7$  parasitos de fase sanguínea da espécie *P. berghei* ANKA. Além disso, nós pudemos observar que animais que desenvolveram hiperparasitemia apresentaram maior índice esplênico em relação àqueles que morreram de malária cerebral, sugerindo que o aumento da atividade do baço foi fundamental para o prolongamento da vida dos animais e melhor prognóstico da infecção. Interessantemente, um estudo conduzido em uma área hiper-holoendêmica de malária na África, demonstrou que crianças infectadas por *P. falciparum* apresentando anemia grave, mas que sobreviveram à infecção, apresentaram esplenomegalia evidente, ao passo que aquelas que sucumbiram ao óbito apresentaram volume esplênico similar ao verificado em indivíduos expostos, porém saudáveis. Os autores ainda demonstraram que o volume do baço foi maior em crianças com anemia grave do que naquelas que evoluíram para malária cerebral (KOTLYAR et al., 2014). Outros estudos realizados previamente também apontam para a importância da atividade esplênica no fenótipo clínico e prognóstico final da infecção malárica em área endêmica (JAFFAR et al., 1997; RANQUE et al., 2008).

Portanto, é evidente que a atividade esplênica reduzida, bem como a esplenectomia e a disfunção esplênica podem trazer consequências graves para indivíduos expostos à malária em área endêmica e que vacinas capazes de ativar a função esplênica podem contribuir para um bom prognóstico para a infecção.

### 6.3 Análise da população esplênica e dos níveis de anticorpos sorológicos e sua relação com a imunidade antimalárica

Alguns estudos demonstram que a imunidade antimalárica também pode estar relacionada à ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (HERMSEN et al., 1997; RÉNIA et al., 2006a; YANEZ et al., 1996) sendo o baço o sítio inicial dessa ativação malária específica (HERMSEN et al., 1997). Portanto, nesse estudo nós avaliamos se animais imunizados que evoluíram para malária cerebral apresentaram diferença no número de linfócitos esplênicos (T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e linfócitos B) em relação àqueles que desenvolveram hiperparasitemia. Conforme se pôde notar, nos animais hiperparasitêmicos todas as populações celulares investigadas mostraram reduzidas em relação ao observado nos animais com malária cerebral. Uma hipótese para explicar esses achados é que a infecção malárica exacerbada, refletida aqui no aumento da parasitemia, pode sobrecarregar o sistema imunológico levando a remoção de células T potencialmente protetoras, assim como já aventado em estudos prévios (GOOD, 2011). Realmente, Elliott et al (2005) em seus estudos com *Plasmodium chabaudi* em modelo murino, demonstraram uma elevada taxa de apoptose de células T especialmente quando a densidade parasitária mostrou-se expressiva. Em contraste, apoptose não foi observada quando a infecção foi interrompida dois dias após infecção experimental dos animais (ELLIOTT; KUNS; GOOD, 2005). Outra observação importante extraída desse estudo foi que as células T provenientes de animais com elevadas parasitemias, mostraram-se hiporresponsivas a estímulos *in vitro* realizados com antígeno homólogo ou heterólogo a *P. chabaudi* (ELLIOTT; KUNS; GOOD, 2005). Isso pode explicar, portanto, por que nossos animais continuaram a apresentar altas parasitemias.

Enquanto o papel de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> vêm sendo rotineiramente investigado em modelos de malária cerebral, e em humanos (JAGANNATHAN et al., 2014) o mesmo, não acontece em relação às células B. Muito pouco se sabe, por exemplo, a respeito das alterações e distribuições das populações de células B ao longo da infecção malárica com evolução para quadros graves, incluindo malária cerebral (NDUATI et al., 2010). Considerando-se, no entanto, que tais células são fundamentais no contexto da imunidade humoral

(COHEN, S; MCGREGOR, I. A.; CARRINGTON, 1961; SABCHAREON et al., 1991) torna-se fundamental entender seu papel em todos os âmbitos clínicos e patológicos da infecção. Recentemente, Bao e colaboradores (2013) demonstraram que células B parecem ser fundamentais na proteção contra malária cerebral em camundongos infectados com *P. berghei* ANKA e que essa proteção parece não ser mediada pela produção de anticorpos (BAO et al., 2013). Em nosso estudo, níveis elevados de anticorpos parasito específicos foram detectados no soro de animais imunizados, independentemente do número de linfócitos B detectados fenotipicamente (isto é: os níveis de anticorpos detectados no soro de animais com hiperparasitemia, os quais apresentaram redução no número de linfócitos B esplênicos, foram similares aos níveis detectados no soro de animais com malária cerebral). Apesar desses anticorpos terem sido capazes de reconhecer tanto o antígeno homólogo quanto o heterólogo (como já demonstrado previamente INOUE et al., 2012; PINZON-CHARRY et al., 2010), o reconhecimento de PbN pelos animais imunizados foi muito mais expressivo que o reconhecimento de PbA. Uma hipótese para explicar o reconhecimento simultâneo de ambos os antígenos usado em nosso estudo pode ser a ocorrência de epítomos conservados entre as duas cepas de parasitos permitindo, assim, a reatividade cruzada entre os antígenos. Essa hipótese já foi previamente aventada para explicar a reatividade cruzada no reconhecimento de antígenos de *P. yoelii* pelo soro imune para *P. vinckei* e vice-versa (INOUE et al., 2012). Já uma hipótese para explicar o maior reconhecimento de PbN seria o acúmulo de parasitos PbA nos capilares de vários órgão, incluindo pulmão e baço como, já demonstrado por AMANTE et al (2010) reduzindo assim o estímulo do sistema imunológico por uma maior variedade de antígenos oriundos desse parasito.

Cabe ressaltar, no entanto, que os anticorpos detectados em nosso estudo parecem não influenciar no prognóstico da infecção já que tanto os animais que evoluíram para o quadro de malária cerebral e os que desenvolveram hiperparasitemia demonstraram níveis similares de IgG. 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. Nesse caso a infecção foi interrompida antes do aparecimento dos parasitos na circulação. Nesse estudo a proteção mostrou-se independente de anticorpos (o que corrobora nossos resultados), sendo

predominantemente associada à ativação de linfócitos T ( $CD4^+$  principalmente e  $CD8^+$ ) e à presença de citocinas (principalmente  $IFN-\gamma$ ) (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 do parasito (ELLIOTT; KUNS; GOOD, 2005; PINZON-CHARRY et al., 2010). Essa proteção também foi mediada por células T  $CD4^+$ , não havendo participação evidente de anticorpos (DA SILVA et al., 2013; PINZON-CHARRY et al., 2010).

Assim, diante de todo o exposto, muitas questões permanecem por serem esclarecidas dentre eles: 1) Qual e a real participação das populações celulares e dos anticorpos na imunidade induzida por vacinas? 2) Quais são os mecanismos envolvidos nessa proteção e qual é a dinâmica de interação entre células e mediadores inflamatórios que permitem o estabelecimento de equilíbrio entre parasito-hospedeiro? 3) Considerando a divergência de resultados obtidos por distintos grupos de pesquisa, poderiam fatores inerentes aos modelos utilizados interferirem nos resultados obtidos?

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a partir desse estudo nos permitem concluir que:

- Imunizações com antígenos proteicos provenientes de parasitos de baixa virulência podem proteger contra do desenvolvimento de malária cerebral causada por parasitos altamente virulentos. No entanto, em nosso modelo, os animais protegidos contra a malária cerebral desenvolveram quadro de hiperparasitemia sanguínea;
- Nosso estudo corrobora estudos prévios, que demonstram que maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias e maior acúmulo leucocitário são encontrados no tecido nervoso de animais que desenvolveram malária cerebral. No entanto, o real balanço nos níveis de citocinas anti- e pró-inflamatórias que podem atuar contribuindo ou não para o desencadeamento desse quadro clínico ainda permanece por ser estabelecido;
- O protocolo de imunização experimental utilizado no presente estudo parece não influenciar na perda de peso apresentado pelos animais imunizados, contudo, parece atuar mesmo que discretamente na indução de maior atividade esplênica;
- Animais que não desenvolveram malária cerebral apresentaram redução no número absoluto de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e linfócitos B esplênicos. No entanto, isso precisa ser melhor investigado visto que essas células são associadas a mecanismos que contribuem para o controle do desenvolvimento parasitário;
- A detecção de anticorpos IgG capazes de reconhecer antígenos homólogos e heterólogos aos utilizados nos ensaios vacinais sugerem a ocorrência de imunidade humoral transcendente a cepa. No entanto, em nosso estudo, os anticorpos pareceram não influenciar o padrão clínico apresentado pelos animais imunizados;

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, S. H. Peripheral blood and bone marrow leucocytes in Gambian children with malaria: numerical changes and evaluation of phagocytosis. **Annals of Tropical Paediatrics**, v. 8, n. 4, 250-258, 1988.

AGBNEYEGA, T.; ANGUS, B. J.; BEDU-ADDO, G.; BAFFOE-BONNIE, B.; GUYTON, T.; STACPOOLE, P. W.; KRISHNA, S. Glucose and Lactate kinetics in children with severe malaria. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 83, n. 4, 1569-1576, 2000.

AMANTE, F. H.; HAQUE, A.; STANLEY, A. C.; RIVIERA, F. L.; RANDALL, L. M.; WILSON, Y. A.; YEO, G.; PIEPER, C.; CRABB, B. S.; KONING-WARD, T. F.; LUNDIE, R. J.; GOOD, M. F.; PINZON-CHARRY, A.; PEARSON, M. S.; DUKE, M. G.; McMANUS, D. P.; LOUKAS, A.; HILL, G. R.; ENGWERDA, C. R. Immune-mediated mechanisms of parasite tissue sequestration during experimental cerebral malaria. **Journal of Immunology**, v. 185, n. 5, 3632-3642, 2010.

AMINO, R.; THIBERGE, S.; MARTIN, B.; CELLI, S.; SHORTE, S.; FRISCHKNECHT, F.; MENARD, R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. **Nature Medicine**, v. 12, n. 2, 2006.

ANSTEY, N. M.; RUSSELL, B.; YEO, T. W.; PRICE, R. N. The pathophysiology of vivax malaria. **Cell Press**, v. 25, n. 5, 220-227, 2009.

ARTAVANIS-TSAKONAS, K.; RILEY, E. M. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN- $\gamma$  from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Journal of immunology**, v. 169, n. 6, 2956-2963, 2002.

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

BACCARELLA, A.; FONTANA, M. F.; CHEN, E. C.; KIM, C. C. Toll-like receptor 7 mediates early innate immune responses to malaria. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 12, 4431-4442, 2013.

BALL, H. J.; MACDOUGALL, H. G.; MCGREGOR I. S.; HUNT, N. H. Cyclooxygenase-2 in the pathogenesis of murine cerebral malaria. **Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 4, 751-758, 2004.

BAO, L. Q.; HUY, N. T.; KIKUCHI, M.; YANAGI, T.; SENBA, M.; SHUAIBU, N.; HONMA, K.; YUI, K.; HIRAYAMA, K. CD19<sup>+</sup> B cell confer protection against experimental cerebral malaria in semi-immune rodent model. **Plos One**, v. 8, n. 5, 2013.

BAPTISTA, F. G.; PAMPLONA, A.; PENA, A. C.; MOTA, M. M.; SYLVIANE, P.; VIGARIO, A. M. Accumulation of *Plasmodium berghei*-infected red blood cells in the brain is crucial for the development of cerebral malaria in mice. **Infection and immunity**, v. 78, n. 9, 4033-4039, 2010.

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

BERENDT, A. R.; TURNER, G. D. H.; NEWBOLD, C. I. Cerebral Malaria: The sequestration hypothesis. **Parasitology Today**, v. 10, n. 10, 412-414, 1994.

BODE, C.; ZHAO, G.; STEINHAGEN, F.; KINJO, T.; KLINMAN, D. M. CpG DNA as a vaccine adjuvant. **Expert Reviews Vaccines**, v. 10, n. 4, 499-511, 2011.

BOUHAROUN-TAYOUN, H.; ATTANATH, P.; SABCHAREON, A.; CHONGSUPHAJASIDDHI, T.; DRUILHE, P. Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 172, n. 6, 1633-1641, 1990.

BOYLE, M. J.; REILLING, L.; FENG, G.; LANGER, C.; OSIER, F. H.; ASPELING-JONES, H.; CHENG, Y. S.; STUBBS, J.; TETTEH, K. K. A.; CONWAY, D. J.; MCCARTHY, D. J.; MULLER, I.; MARSH, K.; ANDERS, R. F.; BEESON, J. G. Human antibodies fix complement to inhibit *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes and are associated with protection against malaria. **Immunity**, v. 42, n. 3, 580-590, 2015.

BRONTE, V.; PITTET, M. J. The Spleen in local and systemic regulation of immunity. **Immunity**, v. 39, n. 5, 806-818, 2013.

BROWN, H.; TURNER, G.; ROGERSON, S.; TEMBO, M.; MWENECHANYA, J.; MOLYNEUX, M.; TAYLOR, T. Cytokine expression in the brain in human cerebral malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 5, 1742-1746, 1999.

CAMPOS, M. A. S.; ALMEIDA, I. C.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; VALENTE, E. P.; PROCOPIO, D. O.; TRAVASSOS, L. R.; SMITH, J. A.; GOLENBOCK, D. T.; GAZZINELLI, R. T. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 1, 416-423, 2001.

CARROLL, R. W.; WAINWRIGHT, M. S.; KIM, K.; KIDAMBI, T.; GOMEZ, N. D.; TAYLOR, T.; HALDAR, K. A rapid murine coma and behavior scale for quantitative assessment of murine cerebral malaria. **Plos One**, v. 5, n. 10, 1-12, 2010.

CHEESMAN, S.; RAZA, A.; CARTER, R. Mixed strain infections and strain-specific protective immunity in the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi chabaudi* in mice. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 5, 2996-3001, 2006.



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

CLARK, I.A.; ROCKETT, K. A. The cytokine theory of human cerebral malaria. **Parasitology today**, v. 10, n. 10, 410-412, 1994

COHEN, S.; MCGREGOR, I. A.; CARRINGTON, S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. **Nature**, n. 4804, 733-737, 1961.

COPPI, A.; TEWARI, R.; BISHOP, J. R.; BENNET, B. L.; LAWRENCE, R.; ESKO, J. D.; BILKER, O.; SINNIS, P. Heparan sulfate proteoglycans provide a signal to *Plasmodium* sporozoites to stop migrating and productively invade host cells. **Cell Host and Microbe**, v. 2, n. 5, 316-327. 2007.

COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell**, v. 124, 755-766. 2006

COWMAN, A. F.; HEALER, J.; MARAPANA, D.; MARSH, K. Malaria: Biology and Disease. **Cell**, v. 167, n. 3, 610-624. 2016.

COX, F. E. G. History of the Discovery of the malaria parasites and their vectors. **Parasite & Vectors**, 3: 5. 2010.

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

DA SILVA, H. B.; SALLES, E. M.; PANATIERI, R. H.; BOSCARDIN, S. B.; RODRIGUEZ-MALAGA, S. M.; ALVAREZ, J. M.; LIMA, M. R. D. IFN-gamma, induced priming maintains long-term strain-transcending immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 10, 5160-5169, 2013.

DOOLAN, D. L. *Plasmodium* immunomics. **Int Journal Parasitology**, v. 41, n. 1, 3-20, 2011.

DOOLAN, D. L.; DOBANO, C.; BAIRD, J. K. Acquired Immunity to malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, 13-36, 2009.

DOSTERT, C.; GUARDA, G.; ROMERO, J. K.; MENU, P.; GROSS, O.; TARDIVEL, A.; SUVA, M.; STEHLE, J.; KOPF, M.; STAMENKOVIC, I.; CORRADIN, G.; TSCHOPP, J. Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activation danger signal. **Plos One**, v. 4, n. 8, 1-10. 2009.

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

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

ELLOSO, M. M.; VAN DER HEYDE, H. C.; TROUTT, A.; MANNING, D. D.; WEIDANZ W. P. Human gamma delta T cell subset-proliferative response to malarial antigen in vitro depends on CD4<sup>+</sup> T cells or cytokines that signal through components of the IL-2R. **The Journal of Immunology**, 2096-2102, 1996.

ENGWERDA, C. R.; BEATTIE, L.; AMANTE, F. H. The importance of the spleen in malaria. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 2, 75-80, 2005.

ENGWERDA, C.; BELNOUE, E.; GRUNER, A. C.; RENIA, L. Experimental models of cerebral malaria. **Current topics in microbiology immunology**, v. 297, 103-143, 2005.

EPSTEIN, J. E.; PAOLINO, K. M.; RICHIE, T. L.; SEDEGAH, M.; SINGER, A.; RUBEN, A. J.; CHAKRAVARTY, S.; STAFFORD, A.; RUCK, R. C.; EAPPEN, A. G.; LI, T.; BILLINGSLEY, P. F.; MANOJ, A.; SILVA, J. C.; MOSER, K.; NIELSEN, R.; TOSH, D.; CICALTELLI, S.; GANESHAN, H.; CASE, J.; PADILLA, D.; DAVIDSON, S.; GARVER, L.; SAVERINO, E.; MURSHEDKAR, T.; GUNASEKERA, A.; TWOMEY, P. S.; REYES, S.; MOON, J. E.; JAMES, E. R.; KC, N.; LI, M.; ABOT, E.; BELMONTE, A.; HAUNS, K.; BELMONTE, M.; HUANG, J.; VASQUEZ, C.; REMICH, S.; CARRINGTON, M.; ABEBE, Y.; TILLMAN, A.; HICKEY, B.; REGULES, J.; VILLASANTE, E.; SIM, B. K. L.; HOFFMAN, S. L. Protection against *Plasmodium falciparum* malaria by PfSPZ Vaccine. **JCI insight**, v. 2, n. 1. 2017

FERREIRA, M. U.; CASTRO, M. C. Challenges for malaria elimination in Brazil. **Malaria Journal**. v. 15, n. 1. 2016.

FRIED, M.; DUFFY, P.; Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in human placenta. **Science**, v. 272, n. 5267, 1502-1504, 1996.

Gamma-delta T cell function in pathogenesis of cerebral malaria in mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA. **Infection and Immunity**, v. 67, v. 1, 446-448, 1999.

GARNHAM, P. C. C. The role of the spleen in protozoal infections with special reference to splenectomy. **Acta Tropica**, 1970.

GENTON, B.; BETUELA, I.; FELGER, I.; AL-YAMAN, F.; ANDERS, R. F.; SAUL, A.; RARE, L.; BAISOR, M.; LORRY, K.; BROWN, G. V.; PYE, D.; IRVING, D. O.; SMITH, T. A.; BECK, H.; ALPERS, M. P. A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces *Plasmodium falciparum* density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase 1-2b trial in Papua New Guinea. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 6, 820-827, 2002.

GERALD, N. J.; MAJAM, V.; MAHAJAN, B.; KOZAKAI, Y.; KUMAR, S. Protection from experimental cerebral malaria with a single dose of radiation-attenuated, blood-stage *Plasmodium berghei* parasites. **Plos One**, v. 6, n. 9, 1-8, 2011.

GIDDAM, A. K.; REIMAN, J. M.; ZAMAN, M.; SKWARCZYNSKI, M.; TOTH, I.; GOOD, M. F. A semi-synthetic whole parasite vaccine designed to protect against blood-stage malaria. **Acta Biomaterialia**, v. 44, 295-303, 2016.

GOMES, A. P.; VITORINO, R. R.; COSTA, A. P.; MENDONÇA, E. G.; OLIVEIRA, M. G. A.; SIQUEIRA-BATISTA, R. Malaria grave por *Plasmodium falciparum*. **Rev. Brasileira de Terapias Intensivas**, v. 23, n. 3, 358-369. 2011.

GOOD, M. F. A whole parasite vaccine to control the blood stages of Plasmodium – the case of lateral thinking. **Cell Press**, v. 27, n. 8, 335-340, 2011.

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

GREVE, B.; LEHMAN, L.G.; LELL, G.; LUCKNER, D.; SCHMIDT-OTT, R.; KREMSNER, P. G. High oxygen radical production is associated with fast parasite clearance in children with *Plasmodium falciparum* malaria. **The Journal of infectious diseases**, v. 179, n. 6, 1584-1586, 1999.

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

HAWASS, Z.; GAD, YZ.; ISMAIL, S.; KHAIRAT, R.; FATHALLA, D.; Hasan, N.; Ahmed, A.; Elleithy, H.; Ball, M.; Gaballah, F.; Wasef, S.; Fateen, M.; Amer, H.; Gostner, P.; Selim, S.; Zink, A.; Pusch, C. M. Ancestry and pathology in king Tutankhamun's Family. **Journal of American Medical Association**. v. 303, n. 7. 2010.

HEISS, K.; MAIER, M. I.; HOFFMANN, A.; FRANK, R.; BENDSZUS, M.; MUELLER, A.; PFEIL, J. Protection from experimental cerebral malaria with a single intravenous or subcutaneous whole-parasite immunization. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.

HERMSEN, C.; van de WIEL, T.; MOMMERS, E.; SAUERWEIN, R.; ELING, W. Depletion of CD4+ or CD8 T-cells prevents Plasmodium berghei induced cerebral malaria in end-stage disease. **Parasitology**, v. 114, 7-12, 1997.

HILL, D. L.; SCHORIELD, L.; WILSON, D. W. IgG opsonization of merozoites: multiple immune mechanisms for malaria vaccine development. **International Journal for Parasitology**, v. 47, n. 10-11, 585-595, 2017.

HIRUNPETCHARAT, C.; FINKELMAN, F.; CLARK, I. A.; GOOD, M. F. Malaria parasite-specific Th1-like T cells simultaneously reduce parasitaemia and promote disease. **Parasite Immunology**, v. 21, n. 6, 319-329, 1999.

HO, M.; WHITE, N. J.; LOOAREESUWAN, S.; WATTANAGOON, Y., LEE, S. H.; WALPORT, M. J.; BUNNAG, D.; HARINASUTS, T. Splenic Fc receptor function in host defense and anemia in acute *Plasmodium falciparum* malaria. **Oxford**, v. 161, n. 3, 555-561, 1990.

HOFFMAN, S. L.; GOH, L. M. L.; LUKE, T. C.; SCHNEIDER, I.; LE, T. P.; DOOLAN, D. L.; SACCI, J.; VEGA, P.; DOWLER, M.; PAUL, C.; GORDON, D. M.; STOUTE, J.

A.; CHURCH, L. W. P.; SEDEGAH, M.; HEPPNER, D. G.; BALLOU, W. R.; RICHIE, T. L. Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. **The Journal of infectious diseases**, v. 185, n. 8, 1155-1164, 2002.

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

JAFFAR, S.; GREENWOOD, B.; SCHNEIDER, G.; PALMER, A.; VAN HENSBROEK, B. Predictors of a fatal outcome following childhood cerebral malaria. **The American Journal of Tropical Medicine and hygiene**, v. 57, n. 1, 20-24, 1997.

JAGANNATHAN, P.; ECCLES-JAMES, I.; BOWEN, K.; NANKYA, F.; AUMA, A.; WAMALA, S.; EBUSU, C.; MUHINDO, M. K.; ARINAITWE, E.; BRIGGS, J.; GREENHOUSE, B.; TAPERO, J. W.; KAMYA, M. R.; DORSEY, G.; FEENEY, M. E. IFN- $\gamma$ /IL-10 co-producing cells dominate the CD4 response to malaria in highly exposed children. **Plos Pathogens**, v. 10, n. 1, 2014.

JENNINGS, V. M.; ACTOR, J. K.; LAL, A. A.; HUNTER, R. L. Cytokine profile suggesting that murine cerebral malaria is an encephalitis. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 11, 1997.

JOOS, C.; MARRAMA, L.; POLSON, H. E. J.; CORRE, S.; DIATA, A.; DIOUF, B.; TRAPE, J.; TALL, A.; LONGACRE, S.; PERRAUT, R. Clinical protection from *Falciparum* malaria correlates with neutrophil respiratory bursts induced by merozoite opsonized with human serum antibodies. **Plos One**, v. 5, n. 3, 2010.

KARUNAMOORTHU, K. Malaria vaccine: a future hope to curtail the global malaria burden. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 5, n. 5, 529-538, 2014.

KATSURAGAWA, T. H.; GIL, L. H. S.; TADA, M. S.; da SILVA, L. H. P. Endemias e epidemias na Amazônia. Malária e outras doenças emergentes em áreas ribeirinhas do Rio Madeira. Um caso escola. **Estudos Avançados**, v. 22 n. 64. 2008.

KENNEDY, A. T.; SCHMIDT, C. Q.; THOMPSON, J. K.; WEISS, G. E.; TAECHALERTPAISARN, T.; GILSON, P. R.; BARLOW, P. N.; CRABB, B. S.; COWMAN, A. F.; THAM, W. Recruitment of factor H as a novel complement evasion strategy for blood-stage *Plasmodium falciparum* infection. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 3, 1239-1248, 2016.

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

KOSSODO, S.; MONSO, C.; JUILLARD, P.; VELU, T.; GOLDMAN, M.; GRAU, G. E. Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria. **Immunology**, v. 91, 536-540, 1997.

KREUTZFELD, O.; MULLER, K.; MATUSCHEWSKI, K. Engineering of genetically arrested parasites (GAPs) for a precision malaria vaccine. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, n. 5, 1-13, 2017.

KRIEG, A. M.; YI, A.; MATSON, S.; WALDSCHMIDT, T. J.; BISHOP, G. A.; TEASDALE, R.; KORETZKY, G. A.; KLINMAN, D. M. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. **Nature**, v. 374, 546-548, 1995.

KUBLIN, J. G.; MIKOLAJCZAK, S. A.; SACK, B. K.; FISHBAUGHER, M. E.; SEILIE, A.; SHELTON, L.; VonGOEDERT, T.; FIRAT, J.; MAGEE, S.; FRITZEN, E.; BETZ, W.; KAIN, H. S.; DANKWA, D. A.; STEEL, R. W. J.; VAUGHAN, A. M.; SATHER, D. N.; MURPHY, S. C.; KAPPE, S. H. I. Complete attenuation of genetically engineered *Plasmodium falciparum* sporozoites in human subjects. **Science Translational Medicine**, v. 9, n. 1, 1-11, 2017.

KUMAR, H.; SATTler, J. M.; SINGER, M.; HEISS, K.; REINIG, M.; HAMMERSCHMIDT-KAMPER, C.; HEUSSLER, V.; MUELLER, A.; FRISCHKNECHT, F. Protective efficacy and safety of liver stage attenuated malaria parasites. **Scientific Reports**, v. 6, 2016

KWIATKOWSKI, D.; HILL, A. V. S.; SAMBOU, I.; TWUMASI, P.; CASTRACANE, J.; MANOGUE, K. R.; CERAMI, A.; BREWSTER, D. R.; GREENWOOD, B. M. TNF concentration in fatal malaria, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. **The Lancet**, v. 336, 1201-1204, 1990.

LIEHL, P.; MOTA, M. M. Innate recognition of malarial parasites by mammalian hosts. **International Journal of Parasitology**, v. 42, n. 6, 557-566, 2012.

LOPES, L. N.; SANTOS, F. A. F.; OLIVEIRA, L. C. M.; ARAUJO, M. T. F.; SEQUEIRA, C. G.; LIBONATI, R. M. F.; VENTURA, A. M. R. S. An analysis of the influence of sex hormones on Balb/c infected mice with *Plasmodium berghei*. **Microbial Pathogenesis**, v. 90, 7-12, 2015.

LOU, J.; LUCAS, R.; GRAU, G. E. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, 810-820, 2001.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Readings**, v. 193, n. 1, 265-275, 1951.

LU, X.; LIU, T.; ZHU, F.; CHEN, L.; XU, W. A whole-killed, blood-stage lysate vaccine protects against the malaria liver stage. **Parasite immunology**, n. 9, 1-7, 2016.

LYKE, K. E.; ISHIZUKA, A. S.; BERRY, A. A.; CHAKRAVARTY, S.; DeZURE, A.; ENMA, M. E.; JAMES, E. R.; BILLINGSLEY, P. F.; GUNASEKERA, A.; MANOJ, A.; LI, M.; RUBEN, A. J.; LI, T.; EAPPEN, A. G.; STAFFORD, R. E.; KC, N.; MURSHEDKAR, T.; MENDOZA, F. H.; GORDON, I. J.; KEPHIR, K. L.; HOLMAN, L. A.; PLUMMER, S. H.; HENDEL, C. S.; NOVIK, L.; COSTNER, P. J. M.; SAUNDERS, J. G.; BERKOWITZ, N. M.; FLYNN, B. J.; NASON, M. C.; GARVER, L. S.; LAURENS, M. B.; PLOWE, C. V.; RICHIE, T. L.; GRAHAM, B. S.; ROEDERER, M.; SIM, B. K. L.; LEDGERWOOD, J. E.; HOFFMAN, S. L.; SEDER, R. A. Attenuated

PfSPZ vaccine induces strain-transcending T cells and durable protection against heterologous controlled human malaria infection. **PNAS**, 2017.

MALIK, A.; EGAN, J. E.; HOUGHTEN, R. A.; SADOFF, J. C.; HOFFMAN, S. L. Human cytotoxic T lymphocytes against the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 8, 3300-3304, 1991.

MANEERAT, Y.; PONGPONRATN, E.; VIRIYAVEJAKUL, P.; PUNPOOWONG, B.; LOOAREESUWAN, S.; UDOMSANGPETCH, R. Cytokines associated with pathology in the brain tissue of fatal malaria. **Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health**, v. 30, n. 4, 643-649, 1999.

McQUILLAN, J. A.; MITCHELL, A. J.; HO, Y. F.; COMBES, V.; BALL, H. J.; GOLENSER, J.; GRAU, G. E.; HUNT, N. H.; Coincident parasite and CD8 T cell sequestration is required for development of experimental cerebral malaria. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 2, 155-163, 2011.

MIKOLAJCZAK, S. A.; LAKSHMANAN, V.; FISHBAUGHER, M.; CAMARGO, N.; HARUPA, A.; KAUSHANSKY, A.; DOUGLASS, A. N.; BALDWIN M.; HEALER, J.; O'NEILL, M.; PHUONG, T.; COWMAN, A.; KAPPE, S. H. A Next genetically attenuated *Plasmodium falciparum* Parasite created by triple gene deletion. **Molecular Therapy**, v. 9, n. 22, 1707-1715, 2014.

Ministério da Saúde, Brasil. Guia de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância das Doenças transmissíveis. Volume único. 2016.

MOHAN, K.; MOULIN, P.; STEVENSON, M. M. Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. **Journal of Immunology**, v. 159, n. 10, 4990-4998, 1997.

MONTES DE OCA; M.; GOOD, M. F.; McCARTHY, J. S.; ENGWERDA, C. R. The impact of established immunoregulatory networks on vaccine efficacy and the development of immunity to malaria. **The Journal of Immunology**, v. 197, n.12, 4518-4526, 2016.

MOORTHY, V. S.; NEWMAN, R. D.; OKWO-BELE, J.; MALARIA VACCINE FUNDERS GROUP. Malaria Vaccine Technology Roadmap. **Lancet**, v. 382, n. 11, 2017.

MORDMULLER, B.; SURAT, G.; LAGLER, H.; CHAKRAVARTY, S.; ISHIZUKA, A. S.; LALREMRUATA, A.; GMEINER, M.; CAMPO, J. J.; ESEN, M.; RUBEN, A. J.; HELD, J.; CALLE, C. L.; MENGUE, J. B.; GEBRU, T.; IBANEZ, J.; SULYOK, M.; JAMES, E. R.; BILLINGSLEY, P. F.; KC, N. MANOJ, A.; MURSHEDKAR, T.; GUNASEKERA, A.; EAPPEN, A. G.; LI, T.; STAFFORD, R. E.; LI, M.; FELGNER, P. L.; SEDER, R. A.; RICHIE, T. L.; SLIM, B. K. L.; HOFFMAN, S. L.; KREMSNER, P. G. Sterile protection against human malaria by chemoattenuated PfSPZ vaccine. **Nature**, v. 542, n. 7642, 445-449. 2017.

MORRISSETTE, N.; SIBLEY, L. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 55, n. 1, 21-38. 2002.

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

MULLEN, G. E. D.; ELLIS, R. D.; MIURA, K.; MALKIN, E.; NOLAN, C.; HAY, M. FAY, M. P.; SAUL, A.; ZHU, D.; RAUSH, K.; MORETZ, S.; ZHOU, H.; LONG, C. A.; MILLER, L. H.; TREANOR, J. Phase 1 Trial of AMA1-C1/Alhydrogel plus CPG 7909: An asexual blood-stage vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria. **Plos One**, v. 3, n. 8, 2008.

NACER, A.; MOVILLA, A.; SOHET, F.; GIRGIS, N. M.; GUNDRU, U. M.; LOKE, P.; DANEMAN, R.; FREVERT, U. Experimental cerebral malaria pathogenesis – hemodynamics at the blood brain barrier. **Plos Pathogens**, v. 10, n. 12, 2014.

NDUATI, E. W.; NG, D. H. L.; NDUNGU, F. M.; GARDNER, P.; URBAN, B. C.; LANGHORNE, J. Distinct kinetics of memory b-cell and plasma-cell responses in peripheral blood following a blood-stage *Plasmodium chabaudi* infection in mice. **Plos One**, v. 5, n. 11, 2010.

NUSSENZWEIG, R. S.; VANDERBERG, J.; MOST, H.; ORTON, C. Protective immunity produced by injection of x-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. **Nature**, v. 216, n. 5111, 160-162, 1967.

Nussenzweig, R.S.; Vanderberg, J.; Spitalny, G.L.; Rivera, C.I.; Orton, C.; Most, H. Sporozoite-Induced Immunity in Mammalian Malaria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 21, n. 5, 722-728, 1972.

O'BRIEN, C.; HENRICH, P. P.; PASSI, N.; FIDOCK, D. A. Recent clinical and molecular insights into emerging artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*. **Current opinion in Infectious diseases**, v. 24, n. 6, 570-577, 2011.

PAIN, A.; FERGUSON, D. J. P.; KAL, O.; URBAN, B. C.; LOWE, B.; MARSH, K.; ROBERTS, D. J. Platelet mediated clumping of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes is a common adhesive phenotype and is associated with severe malaria. **PNAS**, v. 98, n. 4, 1805-1810

PARROCHE, P.; LAUW, F. N.; GOUTAGNY, N.; LATZ, E.; MONKS, B. G.; VISINTIN, A.; HALMEN, K. A.; LAMPHIER, M.; OLIVIER, M.; BARTHOLOMEU, D. C.; GAZZINELLI, R. T. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**, v. 104, n. 6, 1919-1924. 2007.

PERKINS, D. J.; HITTNER, J. B.; MWALKAMBO, E. D.; GRANGER, D. L.; WEINBERG, J. B.; ANSTEY, N. M. Impaired systemic production of prostaglandin E2 in children with cerebral malaria. **JID** 2005:191, 1555, 2005

PERKINS, D. J.; KREMSNER, P. G.; WEINBERG, J. B. Inverse relationship of plasma prostaglandin E2 and blood mononuclear cell cyclooxygenase-2 with disease

severity in children with *Plasmodium falciparum* malaria. **The Journal of Infectious diseases**, v. 183, 2001.

PINZON-CHARRY, A.; McPHUN, V.; KIENZLE, V.; HIRUNPETCHARAT, C.; ENGWERDA, C.; McCARTHY, J.; GOOD, M. F. Low doses of killed parasite in CpG elicit vigorous CD4 T cell responses against blood-stage malaria in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 8, 2967-2978, 2010.

POMBO, D. J.; LAWRENCE, G.; HIRUNPETCHARAT, C.; RZEPczyk, C.; BRYDEN, M.; CLOONAN, N.; ANDERSON, K.; MAHAKUNKIJCHAROEN, Y.; MARTIN, L. B.; WILSON, D.; ELLIOTT, S.; ELLIOTT, S.; EISEN, D. P.; WEINBERG, J. B.; SAUL, A.; GOOD, M. F. Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. **The Lancet**, v. 360, n. 9333, 610-617, 2002.

PRUDENCIO, M.; RODRIGUEZ, A.; MOTA, M. M. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 11, 849-856. 2006.

RAJ, D. K.; NIXON, C. P.; NIXON, C. E.; DVORIN, J. D.; DiPETRILLO, C. G.; POND-TOR, S.; WU, H.; JOLLY, G.; PISCHEL, L.; LU, A.; MICHELOW, I. C.; CHENG, L.; CONTEH, S.; McDONALD, E. A.; ABSALON, S.; HOLTE, S. E.; FRIEDMAN, J. F.; FRIED, M.; DUFFY, P. E.; KURTIS, J. D. Antibodies to PfSEA-1 block parasite egress from RBCs and protect against malaria infection. **Science**, v. 344, n. 6186, 871-877, 2014.

RAJA, A. I.; CAI, Y.; REIMAN, J. M.; GROVES, P.; CHAKRAVARTY, S.; McPHUN, V.; DOOLAN, D. L.; COCKBURN, I.; HOFFMAN, S. L.; STANISIC, D. L.; GOOD, M. F. Chemically attenuated blood-stage *Plasmodium yoelii* parasites induced long-lived and strain-transcending protection. **Infection and immunity**, v. 84, n. 8, 2274-2288, 2016.

RAJA, A. I.; STANISIC, D. I.; GOOD, M. F. Chemical attenuation in the development of a whole organism malaria vaccine. **Infection and Immunity**, v. 85, n. 7, 2018.

RANQUE, S.; POUDIOUGOU, B.; TRAORÉ, A.; KEITA, M.; OUMAR, A. A.; SAFEUKUI, I.; MARQUET, S.; CABANTOUS S.; DIAKITÉ, M.; MINTHA, D.; CISSÉ, M. B.; KEITA, M. M.; DESSEIN, A. J.; DOUMBO, O. K. Life-threatening malaria in african children – A prospective study in a mesoendemic urban setting. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 27, n. 2, 130-135, 2008.

RANSON, H.; N'GUESSAN, R.; LINES, J.; MOIROUX, N.; NKUNI, Z.; CORBEL, V. P. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control?. **Trends in parasitology**, v. 27, n. 2, 91-98, 2011.

REILING, L.; RICHARDS, J. S.; FOWKES, F. J. I.; BARRY, A. E.; TRIGLIA, T.; CHOKEJINACHAI, W.; MICHON, P.; TAVUL, L.; SIBA, P. M.; COWMAN, A. F.; MUELLER, I.; BEESON, J. G. Evidence that erythrocyte invasion ligand PfRh2 is a target of protective immunity against *Plasmodium falciparum* malaria. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 10, 6157-6167, 2010.



RENIA, L.; GRUNER, A. C.; MAUDUIT, M.; SNOUNOU, G. Vaccination against malária with live parasites. **Expert Review of vaccines**, v. 5, n. 4, 473-481, 2006.

RENIA, L.; HOWLAND, S. W.; CLASER, C.; GRUNER, A. C.; SUWANARUSK, R.; TEO, T.; RUSSELL, B.; NG, L. F. P. Cerebral malaria – mysteries at the blood-brain barrier. **Virulence**, v. 3, n. 4, 2012.

RENIA, L.; POTTER, S. M.; MAUDUIT, M.; ROSA, D. S.; KAYIBANDA, M.; DESCHEMIN, J.; SNOUNOU, G.; GRUNER, A. C. Pathogenic T cells in cerebral malaria. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 5, 547-554, 2006.

RIBEIRO, J. M. C. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annual Rev. Entomology**, v. 32, n. 92. 463-478. 1987.

RILEY, E. M.; STEWART, V. A. Immune mechanisms in malaria: new insights in vaccine development. **Nature Medicine**, v. 19, n. 2, 168-178, 2013.

RILEY, E. M.; WAGNER, G. E.; AKANMORI, B. D.; KORAM, K. A. Do maternally acquired antibodies protect infants from malaria infection? **Parasite immunology**, v. 23, 51-59, 2001.

ROBERTS, D. J.; CRAIG, A. G.; BERENDT, A. R.; PINCHES, R.; NASH, G.; MARSH, K.; NEWBOLD, C. I. Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. **Nature**, v. 357, n. 6380, 689-692, 1992.

ROESTENBERG, M. D. M.; McCALL, M. M. D.; HOPMAN, J. M. D.; WIERSMA, J.; ADRIAN, J. F.; GEMERT, G. J.; VEGTE-BOLMER, M.; SCHAIJK, B.; ROEFFEN, W.; SNOUNOU, G.; RENIA, L.; van der VEN, A.; HERMSEN, C. C.; SAUERWEIN, R. Protection against a malaria challenge by sporozoite inoculation. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 5, 468-477, 2009.

RUDIN, W.; QUESNIAUX, V.; FAVRE, N.; BORDMANN, G. Malaria toxins from *P. chabaudi chabaudi* AS and *P. berghei* ANKA causes dyserythropoiesis in C57BL/6 mice. **Parasitology**, v. 115, 467-474, 1997.

SABCHAREON, A.; BOUHAROUN-TAYOUN, H.; CHONGSUPHAJASIDDHI, T.; CHANTAVANICH, P.; DRUILHE, P.; ATTANATH, P. Parasitological and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 45, n. 3, 297-308, 1991.

SCHOFIELD, L.; GRAU, G. E. Immunological processes in malaria pathogenesis. **Nature reviews**, v. 2005, n. 9, 722-735, 2005.

SEDER, R. A.; CHANG, L.-J.; ENAMA, M. E.; ZEPHIR, K. L.; SARWAR, U. N.; GORDON, I. J.; HOLMAN, L. A.; JAMES, E. R.; BILLINGSLEY, P. F.; GUNASEKERA, A.; RICHMAN, A.; CHAKRAVARTY, S.; MANOJ, A.; VELMURUGAN, S.; LI, M.; RUBEN, A. J.; LI, T.; EAPPEN, A. G.; STAFFORD, R.; PLUMMER, S. H.; HENDEL, C. S.; NOVIK, L.; COSTNER, P. J. M.; MENDOZA, F. H.; SAUNDERS, J. G.; NASON, M. C.; RICHARDSON, J. H.; MURPHY, J.; DAVIDSON, S. A.; RICHIE, T. L.; SEDEGAH, M.; SUTAMIHARDJA, A.; FAHLE, G. A.; LYKE, K. E.; LAURENS, M. B.; ROEDERER, M.; TEWARI, K.; EPSTEIN, J. E.; SIM, B. K. L.; LEDGERWOOD, J. E.; GRAHAM, B. S.; HOFFMAN, S. L.;

DIGIOVANNI, C.; WILLIAMS, P.; LUONGO, N.; MITCHELL, J.; FLOREZ, M. B.; LARKIN, B.; BERKOWITZ, N.; WILSON, B.; CLARKE, T.; VASILENKO, O.; YAMSHCHIKOV, G.; SITAR, S.; STANFORD, L.; PITTMAN, I.; BAILER, R. T.; CASAZZA, J.; DECEDERFELT, H.; STARLING, J.; WILLIAMS, E. C.; LAU, A.; ANTONARA, S.; BROCIOSUS, J.; KEMP, M.; INGLESE, J.; DRANCHAK, P.; ABOT, E. N.; REYES, S.; GANESHAN, H.; BELMONTE, M.; HUANG, J.; BELMONTE, A.; KOMISAR, J.; ABEBE, Y.; GETACHEW, Y.; PATIL, A.; MATHENY, S.; NELSON, K.; OVERBY, J.; PICH, V.; WEN, Y.; FAN, R.; FOMUMBOD, E.; AWE, A.; CHAKIATH, C.; KING, M.; OROZCO, M. S.; MURSHEDKAR, T.; PADILLA, D.; JIANG, B.; GAO, L.; KC, N.; XU, R.; ADAMS, M.; PLOWE, C.; LOBLEIN, H.; RENEHAN, P. Z.; KUNCHAI, M.; DIEP, L. Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. **Science**, v. 341, n. 6152, 1359-1365, 2013.

SEGUIN, M. C.; KLOTZ, F. W.; SCHNEIDER, I.; WEIR, J. P.; GOODBARY, M.; SLAYTER, M.; RANEY, J. J.; ANIAGOLU, J. U.; GREEN, S. Induction of nitric oxide synthase protects against malaria in mice exposed to irradiated *Plasmodium berghei* infected mosquitoes: involvement of interferon gamma and CD8<sup>+</sup> T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 7, 4-6, 1994.

SEIBERT, K.; ZHANG, Y.; LEAHY, K.; HAUSER, S.; MASFERRER, J.; PERKINS, W.; LEE, L.; ISAKSON, P.; SEARLE, G. D. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. **Pharmacology**, v. 91, 1994.

Serviço de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Brasil. 2015

Serviço de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Brasil. 2015

Serviço de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Brasil. 2015

SOLDATI, D.; FOTH, B. J.; COWMAN, A. F. Molecular and functional aspects of parasite invasion. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 12, 567-574. 2004.

STANISIC, D. I.; GOOD, M. F. Whole organism blood stage vaccines against malaria. **Vaccine**, v. 33, n. 52, 7469-7475, 2015.

STEVENSON, L.; LAURSEN, E.; COWAN G. J.; BANDO, B.; BARFOD, L.; CAVANAGH, D. R.; ANDERSEN, G. R.; HVIID, L.  $\alpha$ 2-macroglobulin can cross link multiple *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) molecules and may facilitate adhesion of parasitized erythrocytes. **Plos Pathogens**, v. 11, n. 7, 1-19, 2015.

STEVENSON, M. M.; RILEY, E. M. Innate immunity to malaria. **Nature Reviews**, v. 4, n. 3, 169-180, 2004.

STURM, A.; AMINO, R.; van de SAND, C.; REGEN, T.; RETZLAFF, S.; Manipulation of hosts hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, v. 1287. 2006.

TACHADO, S. D.; GEROLD, P.; McCONVILLE, M. J.; BALDWIN, T.; QUILICI, D.; SCHWARZ, R. T.; SCHOFIELD, L. Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial

cells by a protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase c-dependent signaling pathway. **The journal of immunology**, n. 156, 1897-1907. 1995.

TARTZ, S.; DESCHERMEIER, C.; RETZLAFF, S.; HEUSSLER, V.; SEBO, P.; FLEISCHER, B.; JACOBS, T. *Plasmodium berghei* sporozoite challenge of vaccinated BALB/c mice leads to the induction of humoral immunity and improved function of CD8 memory T cells. **European Journal of Immunology**, v. 43, 693-704, 2013.

TEO, A.; FENG, G.; BROWN, G. V.; BEESON, J. G.; ROGERSON, S. J. Functional antibodies and protection against blood-stage malaria. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 11, 887-898, 2016.

THUMWOOD, C. M.; HUNT, N. H.; CLARK, I. A.; COWNDEN, W. B. Breakdown of the blood-brain barrier in murine cerebral malaria. **Parasitology**, v. 96, n. 3, 579-589, 1988.

TINTO, H.; D'ALESSANDRO, U.; SORGHO, H.; VALEA, I.; TAHITA, M. C.; KABORE, W.; KIEMDE, F.; LOMPO, P.; OUEDRAOGO, S.; DERRA, K.; OUEDRAOGO, F.; OUEDRAOGO, J. B.; BALLOU, W. R.; COHEN, J.; HEERWEGH, D.; JONGERT, E.; LAPIERRE, D.; LEACH, A.; LIEVENS, M.; ANYINAM, O. O.; OLIVIER, A.; VEKEMANS, J.; AGNANDJI, S. T.; LELL, B.; FERNANDES, J. F.; ABOSSOLO, B. P.; KABWENDE, A. L.; ADEGNIKA, A. A.; MORDMULLER, B. ISSIFOU, S.; KREMSNER, P. G.; LOEMBE, M. M.; BACHE, E.; ALABI, A.; OWUSU-AGYEI, S.; ASANTE, K. P.; BOAHEM, O.; DOSOO, D.; ASANTE, I.; YIDANA, Z.; ANIM, J.; ADENJI, E.; YAWSON, A. K.; KAYAN, K.; CHANDRAMOHAN, D.; GREENWOOD, B.; ANSONG, D.; AGBENYEGA, T.; ADJEI, S.; BOATENG, H. O.; RETTING, T.; SYLVERKEN, J.; SAMBIAN, D.; BADU-PREPAH, A.; KOTEY, A.; BUABENG, P.; PAINTSIL, V.; ENIMIL, A.; HAMEL, J. M.; KARIUKI, S.; ONEKO, M.; ODERO, C.; OTIENO, K.; AWINO, N.; MUTURI-KIOI, V.; OMOTO, J.; SANG, T.; ODHIAMBO, S.; LASERSON, K. F.; SLUTSKER, L. RTS,S CLINICAL TRIALS PARTNERSHIP. Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomized, controlled trial. **The Lancet**, v. 6736, n. 15, 31-45, 2015.

TROTTEIN, F.; TRIGLIA, T.; COWMAN, A. F. Molecular cloning of a gene from *Plasmodium falciparum* that codes for a protein sharing motifs found in adhesive molecules from mammals and Plasmodia. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 74, n.2, 129-141. 1995.

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

VAUGHAN, A. M.; KAPPE, S. H. I. Genetically attenuated malaria parasites as vaccines. **Expert Review of Vaccines**, v. 16, n. 8, 765-767, 2017.

WASSMER, S. C.; GRAU, G. E. R. Severe malaria: what's new on the pathogenesis front? **International Journal for Parasitology**, 2016.

WASSMER, S. C.; TAYLOR, T.; MACLENNAN, A. C.; TAYLOR, T.; MOLYNEUX, M. E.; GRAU, G. E. Platelet-induced clumping of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes from Malawian patients with cerebral malaria – possible modulation in vitro by thrombocytopenia. **Journal of Infectious diseases**, v. 197, n. 1, 72-78, 2008.

WHITE, N. J. Malaria parasite clearance. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, 1-14, 2017.

WICKRAMASINGHE, S. N.; LOOAREESUWAN, S.; NAGACHINTA, B.; WHITE, N. J.; Diserythropoiesis and ineffective erythropoiesis in *Plasmodium vivax* malaria.

World Health Organization. Top 10 causes of death, WHO, 2017.

World Health Organization. WHO Preferred product characteristics for malaria vaccines. 2014.

World Health Organization. World malaria report, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2016.

World Health Organization. World malaria report, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2017.

World Health Organization. World malaria report, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2015.

Xiao, L.; Patterson, P. S.; Yang, C.; Lal, A. A. Role of eicosanoids in the pathogenesis of murine cerebral malaria. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 4, 668-673, 1999.

YAMAUCHI, L. M.; COPPI, A.; SNOUNOU, G.; SINNIS, P. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 5, 1215-1222. 2007.

YANEZ, D. M.; MANNING, D. D.; COOLEY, A. J.; WEIDANZ, W. P.; van der HEYDE, H. C. Participation of lymphocyte subpopulations in the pathogenesis of experimental murine cerebral malaria. *The Journal of Immunology*, v. 157, n. 4, 1620-1624, 1996.

ZHU, F.; LIU, T.; ZHAO, C.; LU, X.; ZHANG, J.; XU, W. Whole-killed blood-stage vaccine-induced immunity suppresses the development of malaria parasites in mosquitoes. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 1, 300-307, 2016.

## **ANEXOS**

**ANEXO I****Protocolo Comitê De Ética**

**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo nº. 032/2016 – CEUA sobre “O efeito de vacinas antimaláricas compostas por parasitos vivos e extratos proteicos no desenvolvimento de malária grave em modelo murino” projeto de pesquisa sob a responsabilidade de KÉZIA KATIANI GORZA SCOPEL está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 01/11/2016. Para o desenvolvimento da pesquisa serão liberados 133 camundongos da linhagem C57BL/6 (133 fêmeas) de 6 a 8 semanas conforme solicitado e que serão utilizados no período de 05/01/2017 a 30/12/2018.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº. 032/2016 - CEUA about “O efeito de vacinas antimaláricas compostas por parasitos vivos e extratos proteicos no desenvolvimento de malária grave em modelo murino” under responsibility of KÉZIA KATIANI GORZA SCOPEL is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 01/11/2016. For the development of this research 133 mice of lineage C57BL/6 (133 females) of 6 to 8 weeks of age, will be delivered as requested in the period of 05/01/2017 to 30/12/2018.

**Juiz de Fora, 10 de novembro de 2016**

Coordenadora  
CEUA

Vice-coordenadora  
CEUA

## ANEXO II

**Tabela 2:** Escala rápida de avaliação do coma e comportamento murino. Adaptada de Carroll et al, 2010

Data: ___/___/___ - ___º dia pós desafio		Grupo: _____		
<b>Camundongo</b>				
<b>Coordenação</b>	Marcha (0-2)			
	Equilíbrio (0-2)			
<b>Comportamento exploratório</b>	Desempenho motor (0-2)			
<b>Força e Tone</b>	Posição do corpo (0-2)			
	Força dos membros (0-2)			
<b>Reflexos e auto-preservação</b>	Fuga ao toque (0-2)			
	Reflexo do pavilhão auricular (0-2)			
	Beliscão no dedo do pé (0-2)			
	Agressão (0-2)			
<b>Higiene</b>	Grooming (0-2)			
<b>Somatório</b>				