UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Daniela Chaves Renhe

EXPOSIÇÕES PRÉVIAS A PARASITOS VIVOS DE *Plasmodium berghei* NK65 NA PROTEÇÃO CONTRA A MALÁRIA CEREBRAL EXPERIMENTAL

Juiz de Fora
2021

DANIELA CHAVES RENHE

EXPOSIÇÕES PRÉVIAS A PARASITOS VIVOS DE *Plasmodium berghei* NK65 NA PROTEÇÃO CONTRA A MALÁRIA CEREBRAL EXPERIMENTAL

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e DIP, para obtenção do Título de Doutora em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Orientadora: Profª Drª Kézia Katiani Gorza Scopel
Coorientador: Prof Dr Cláudio Romero Farias Marinho

Juiz de Fora
2021

Daniela Chaves Renhe

EXPOSIÇÕES PRÉVIAS A PARASITOS VIVOS DE *Plasmodium berghei* NK65 NA PROTEÇÃO CONTRA A MALÁRIA CEREBRAL EXPERIMENTAL

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e DIP, para obtenção do Título de Doutora em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e DIP.

Banca Examinadora:

_____

Prof. Drª. Kézia Katiani Gorza Scopel - Presidente da Banca

_____

Dr. Josué Costa Lima - Examinador Externo

_____

Drª. Letusa Albrecht- Examinador Externo

_____

Dr. Erick Esteves de Oliveira - Examinador UFJF

_____

Prof. Dr. Vinícius Novaes Rocha- Examinador UFJF

Juiz de Fora, 8 de fevereiro de 2021

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

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter permitido transpor mais essa etapa.

À minha orientadora Professora Kézia Katiani Gorza Scopel pela orientação e colaboração para realização desse trabalho.

Ao meu coorientador Professor Dr. Cláudio Romero Farias Marinho por ter me recebido com tanta atenção no Laboratório de Imunoparasitologia Experimental da USP, pelos seus ensinamentos e atenção dedicada.

Ao Oscar, À Natércia, Douglas e Carla, pelo auxílio e calorosa companhia em diversos momentos.

À Erika, que além da sua fundamental ajuda em todos os passos da realização dos meus experimentos em São Paulo, me acolheu com tanto carinho.

Ao Prof. Dr. Vinícius Novaes Rocha, pela valorosa colaboração no processamento e avaliação histológica.

Ao Prof. Dr. Gilson Costa Macedo e à Profª Drª Jacy Gameiro, pelo auxílio nas análises dos dados obtidos na citometria e pelo socorro em diversos momentos no citômetro.

À Profª Drª Dioneia Evangelista César, pela disponibilidade e boa vontade para a realização de alguns experimentos.

A Drª Wanessa Araújo Carvalho pelas aquisições de grande parte das amostras no citômetro do laboratório da EMBRAPA Gado de leite, além das valiosas contribuições e discussões técnicas.

À Drª Roberta Reis Soares, pelo auxílio nos experimentos iniciais de citometria e por sua presteza e boa vontade em um momento crucial.

À Raíssa e ao Ari, por sempre tão prontamente se disponibilizarem a realizar as leituras no espectrofotômetro do laboratório de Bioquímica.

À Sara, que como sempre solícita e cheia de simpatia, me ajudou tão prontamente com as análises dos dados de fenotipagem.

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

Às professoras e técnicos do Núcleo de Pesquisas em Parasitologia pela colaboração em todos esses anos de convivência.

Aos alunos de iniciação científica, que em algum momento contribuíram para a realização dos experimentos.

Às meninas do laboratório, Paty, Ayla, Juliane Marinho, Juliana Granato, Luciana, Cinthia e Jéssica e pelas ótimas discussões profissionais e, principalmente pelas conversas aleatórias, que tornavam o dia a dia mais divertido. Além de me ajudarem em diversos momento de muito aperto.

À Alyssa, que mesmo distante agora, muito contribuiu para a construção da meus hábitos em relação à pesquisa.

À Ayla e Bárbara, pelos almoços, pausas/ “terapia de grupo” tão necessários.

À Bárbara, que mesmo diante de suas próprias atribulações, esteve comigo nos infindáveis plantões de malária cerebral, ficamos muitos dias sem dormir direito juntas, além da ajuda nos experimentos, quero agradecer pela companhia e por todo resto.

À Luciene, nossas conversas e seus conselhos me ajudam muito.

Às minhas amigas, Thaiana, Laila, Rosaline e Thamara, agora vamos marcar.

Às minhas amigas Cíntia e Valesca, saudades dos nossos cafés que tanto aliviavam o peso do cotidiano.

A todos os meus amigos e amigas.

Agradeço à minha família, pelo apoio e incentivo.

À minha mãe, Rosa, que apesar de não estar presente, sempre foi o motivo da minha busca por conhecimento, a única coisa que nunca podem nos tirar.

Ao meu pai e a Rose, pela companhia e incentivo quando me acolheram tão calorosamente em sua casa durante a realização dos experimentos.

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

Ao Luke, que não sabe ler, mas que alegra meus dias com seu amor.

Ao meu filho Bernardo, pela paciência com a minha ausência, seu carinho, amor e sua companhia nas noites de fim de semana no laboratório.

Ao meu marido Italo, por sempre me incentivar e me dar forças para continuar, pelo seu amor, carinho e compreensão, que me ajudaram a terminar essa jornada.

Aos membros da banca examinadora, por terem gentilmente aceitado contribuir na concretização deste trabalho.

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

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

“Todas as coisas são possíveis para os que têm o coração livre da maldade.”

Mestre dos Magos

RESUMO

A malária continua sendo um grande problema de saúde mundial. A ocorrência de espécies e cepas de plasmódios com distintos graus de virulência em uma mesma área torna primordial o esclarecimento dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro nas infecções maláricas. Essa elucidação pode colaborar na elaboração de estratégias que evitem o agravamento da doença ou até mesmo a infecção. Assim, esse trabalho investigou a ocorrência da imunidade antimalárica transcendente a cepa em camundongos pré-expostos a parasitos vivos *P. berghei* cepa NK65 e desafiados com *P. berghei* cepa ANKA (PbA). Primeiramente, determinou-se a concentração do inóculo capaz de induzir malária cerebral (MC) em animais C57BL/6. Para tal, foram testados inóculos com 10^5, 10^6 e $5x10^6$ eritrócitos parasitados, todos os grupos apresentaram baixos níveis de parasitemia, escore clínico em declínio e óbito dentro do período esperado para malária cerebral. Diante da linearidade dos parâmetros apresentados pelo grupo que recebeu 10^5 eritrócitos infectados, esse foi o inóculo selecionado para realização dos experimentos. Então, camundongos C57BL/6 foram expostos uma ou duas vezes a 10^3 hemácias parasitadas por *P. berghei* NK65 (PbN). Decorridos 30, 90 e 180 dias após a última pré-exposição, os animais foram desafiados com 10^5 eritrócitos parasitados por *P. berghei* ANKA. Os animais foram, então, acompanhados diariamente a partir do 4º dia após a infecção para delineamento das curvas de escore clínico, parasitemia e sobrevivência. Foram ainda avaliados os níveis de anticorpos no soro, achados histopatológicos do tecido cerebral, os níveis de citocinas no cérebro, o índice esplênico, fenótipo de esplenócitos e as populações celulares de linfócitos T $CD4^+$, $CD8^+$ e linfócitos B presentes no cérebro dos animais experimentais. Observou-se que, em média, 21% dos animais pré-expostos 1 ou 2x a PbA e 43% e 54% dos animais que foram pré-expostos a PbN, respectivamente não desenvolveram MC. Interessantemente, os níveis de sobrevivência e parasitemia permaneceram semelhantes quando o desafio foi realizado 90 dias após a última exposição, porém o grau de proteção decaiu para cerca de 20% em animais desafiados no dia 180 após a última pré-exposição. Os níveis de anticorpos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 se mostraram semelhantes entre os

animais que desenvolveram MC e aqueles que foram protegidos da MC, mesmo nos desafios ocorridos nos dias 30, 90 e 180 após a última pré-exposição. A análise de citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IFN-ɣ, bem como da citocina anti-inflamatória IL-10, mostrou níveis semelhantes entre os grupos pré-expostos e o grupo que não foi infectado, independentemente do tipo de imunização ou perfil clínico apresentados pelos animais ou, mesmo, de quanto tempo decorrido até o desafio (30, 90 ou 180 dias). Em relação ao perfil fenotípico dos esplenócitos dos animais que foram desafiados 30 dias após a última pré-exposição, a frequência de linfócitos B totais, linfócitos B *naive* e linfócitos T citotóxicos, se mostraram diminuídas em animais imunizados que não desenvolveram MC, quando comparados aos animais que desenvolveram MC e animais do grupo controle. Portanto, as pré-exposições a parasitos vivos de baixa virulência influenciam no desenvolvimento da MC experimental em modelo murino causada por *P. berghei* ANKA.

Palavras-chave: Exposição prévia, parasitos vivos, *Plasmodium berghei*.

ABSTRACT

Malaria remains a great world health issue. The occurrence of *Plasmodium* species and strains with different degrees of virulence in one area makes its essential to clarify the mechanism of immune response in the host during malarial infections. This elucidation can collaborate in strategies that avoids the disease severity or even the infection. So, this study aims to investigate the occurrence of transcendent antimalarial immune response in pre-exposed mice to live parasites of *Plasmodium berghei* NK65 (PbN) and challenged with *P. berghei* ANKA (PbA). First, we determined the concentration of parasites that were capable to induce cerebral malaria (CM) in C57BL/6 mice. For that, 10^5, 10^6 e $5x10^6$ parasitized erythrocytes (pRBCs) were tested, all groups presented low levels of parasitaemia, decreased clinical score and death between the period estimated for the development of cerebral malaria. In front of the parameter linearity shown by the group that received 10^5 parasitized erythrocytes, that was the inoculum used in the experiments. So, C57BL/6 mice were exposed once or twice to 10^3 parasitized erythrocytes by PbN. Following 30, 90 and 180 days after the last exposure to parasites, animals were challenged with 10^5 pRBCs by PbA. Then, animals were daily followed since day 4 after infection to determine the clinical score, parasitaemia and survival rate. Antibody levels, histopathological findings at cerebral tissue, cerebral cytokine levels, splenic index, splenocytes phenotype and T $CD4^+$, $CD8^+$ and B cerebral lymphocyte population were also evaluated. We could observe that, in average, 21% of pre-exposed animals once or twice to PbA and 43% and 54% of animals pre-exposed to PbN, respectively, did not developed CM. Interestingly, survival rate and parasitaemia levels remained similar when challenge was performed 90 days after the last exposure, on the other hand, protection declined to 20% in animals challenged 180 days after the last exposure. IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3 levels showed similar between animals that developed CM and those that were protected from the severe form of the disease, even in animals that were challenged 30, 90 and 180 days after the last pre-exposition. TNF-α e IFN-ɣ pro-inflammatory and IL-10 anti-inflammatory cytokine analysis shown similar levels between pre-exposed groups and the group that was not infected, independently of the type of immunization or the clinical profile showed by animals, or even the elapsed time until the challenge

(30, 90 or 180 days). Regarding the splenocytes phenotyping, when animals were challenged 30 days after the last exposure, they showed low frequencies of B lymphocytes, naïve B cells or cytotoxic T cells when did not developed CM, compared to the control group or to animals that developed the severe form of the disease. Then, pre-expositions to low virulence live parasites influences at the experimental cerebral malaria development in murine model caused by PbA.

Key- words: Previous plasmodium exposure, live parasites, *Plasmodium berghei*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mapa da incidência de malária (casos por 1000 habitantes) por país, 2018, estimativa WHO 22
Figura 2 Mapa da incidência de malária no Brasil, SVS, 2019..... 23
Figura 3 Ciclo evolutivo de *P. falciparum* evidenciando o desenvolvimento dos gametócitos (Adaptado de BOUSEMA e DRAKELEY, 2011)..... 26
Figura 4 Mecanismos de ação de anticorpos na resposta antimalárica. Adaptado de Hill et al., 2017..... 33
Figura 5 Resposta imune inata no baço. Adaptado de DUNST et al., 2017..... 35
Figura 6 Desenho experimental 53
Figura 7 Estratégia de análise dos eritrócitos infectados por *P. berghei* ANKA marcado com GFP 57
Figura 8 Estratégia de análise para marcação fenotípica esplenócitos..... 61
Figura 9 Avaliação de diferentes concentrações de hemácias parasitadas por PbA para indução de MC em camundongos C57BL/6. 68
Figura 10 - Fotografias representativas da calota craniana de animais que receberam diferentes concentrações de inóculos. 69
Figura 11 Efeito da exposição prévia de camundongos C57BL/6 a *P. berghei* ANKA e *P. berghei* NK65 na proteção contra a MC, considerando-se desafio experimental nos dias 30, 90 e 180..... 72
Figura 12 Efeito da exposição prévia de camundongos C57BL/6 a *P. berghei* ANKA ou *P. berghei* NK65 nos sinais clínicos de MC, considerando-se desafio experimental nos dias 30, 90 e 180..... 73
Figura 13 Perfil clínico de camundongos C57BL/6 pré-expostos 2 x a infecção malárica por *P. berghei* NK65 e desafiados no dia 180 com *P. berghei ANKA* 180. n=9 74
Figura 14 Fotografias representativas da calota craniana dos animais, considerando-se perfil clínico e desafio experimental nos dias 30, 90 e 180... 76
Figura 15 Fotografias representativas das calotas cranianas e dos cérebros submetidos a coloração de Azul de Evans..... 77
Figura 16 Fotomicrografias representativas de secções do cérebro de animais, considerando-se perfil clínico e desafio experimental nos dias 30, 90 e 180... 78

Figura 17 Índice de reatividade de anticorpos IgG total em animais C57BL/6 não expostos a infecção malárica. 80
Figura 18 Índice de reatividade de anticorpos IgG total e subclasses, considerando-se perfil clínico e tipo de exposição prévia, em animais desfiados no dia 30 após última exposição. 81
Figura 19 Índice de reatividade de anticorpos IgG total e subclasses, considerando-se perfil clínico e tipo de exposição prévia, em animais desfiados no dia 90 após última exposição. 82
Figura 20 Índice de reatividade de anticorpos IgG total e subclasses, considerando-se perfil clínico e tipo de exposição prévia, em animais desfiados no dia 180 após última exposição. 83
Figura 21 Níveis de citocinas anti-inflamatória (TNF-α e IFN-ɣ) e pró-inflamatória (IL-10) determinadas no cérebro, considerando-se o perfil clínico e o tipo de exposição, em animais desafiados nos dias 30, 90 e 180 após a última exposição. 86
Figura 22 Índice esplênico no momento da eutanásia, considerando-se p perfil clínico e o tipo de exposição, em animais desafiados nos dias 30, 90 e 180 após a última exposição..... 88
Figura 23 Perfil fenotípico de esplenócitos dos animais de acordo com perfil clínico de animais desafiados no dia 30 após última exposição..... 90
Figura 24 Marcação de linfócitos B, T helper e T citotóxicos por imuno-histoquímica no tecido cerebral de camundongos. 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Comparação das características da malária cerebral humana e da malária cerebral experimental em modelo murino de infecção com *P. berghei*. Extraído e adaptado de Torre et al., 2018 45
Tabela 2 Parâmetros avaliados no Escore Clínico 58
Tabela 3 Perfil clínico, frequência média de parasitemia e taxas de sobrevevivência observado ao final do seguimento e em razão do número de exposição prévia aos parasitos da malária 74

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CSP	Circumsporozoite protein – Proteína ciscunsporozoíta
AMA-1	Apical Membrane Antigen – Antígeno 1 da membrana apical
TRAP	Thrombospondin-related adhesive protein – Proteína adesiva relacionada à trombospondina
IFN-ɣ	Interferon gama
TNF-α	Tumour necrosis fator- Fator de necrose tumoral
PfEMP1	*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein – Proteína de
PfEMP2	membrana do eritrócito associada ao *Plasmodium falciparum*
PfHRP 1	*Plasmodium falciparum* Histidine-rich protein – Proteína rica em histidina associada ao *Plasmodium falciparum*
KAHRP	Knob-associated histidine-rich protein – Proteína rica em histidina associada ao knob
ELAM-1	Endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 – Molécula de adesão endotelial do leucócito
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1 – Molécula de adesão intracelular
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1 – Molécula de adesão de celular vascular
ROS	Reactive oxygen species - Espécies reativas de oxigênio
NO	Óxido nítrico
CD 36	Cluster of Differentiation 36 – Agrupamento de diferenciação 36
IgG	Imunoglobulina G
NK	Natural killer
IL	Interleucina
TGF-β	Transforming growth factor beta – Fator transformador de crescimento beta
mRNA	Messenger RNA – RNA mensageiro
APC	Antigen-presenting cell – Célula apresentadora de antígeno
HLA	Human leukocyte antigen – Antígeno leucocitário humano
MHC	Major histocompatibility complex – Complexo principal de histocompatibilidade

CCR	Chemokine receptor – receptor de quimiocina
ADCI	Antiboby dependente celullar inhibition- Inibição celular dependente de anticorpo
CpG- ODN	CpG oligodeoxynucleotides – Oligodeoxinucleotídeo CpG
PBS	Tampão fosfato-salino
MC	Malária cerebral
HP	Hiperparasitemia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21
1.1 A malária no mundo 21
1.2 Os parasitos da malária e seu ciclo biológico 24
1.3 A malária não complicada e a malária complicada 27
1.4 Resposta imunológica à malária no hospedeiro vertebrado 30
1.5 Vacinas antimaláricas 39
1.6 A importância do modelo murino para o estudo da malária grave: uma ênfase na malária cerebral 43
2 JUSTIFICATIVA 46
3 OBJETIVOS 48
3.1 Geral 48
3.2 Específicos 48
4 METODOLOGIA 50
4.1 Animais 50
4.2 Padronização do inóculo de *P. berghei* ANKA 50
4.3 Exposição padronizada de camundongos C57BL/6 a parasitos vivos de fase sanguínea de *P. berghei* 50
4.3.1 Animais repique 51
4.3.2 Grupos experimentais e procedimento de exposição prévia. 51
4.4 Procedimento de obtenção de extrato proteico bruto para realização do ensaio imunoenzimático (ELISA) 53
4.4.1 Detecção de anticorpos IgG totais 54
4.4.2 Detecção de anticorpos das subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 55
4.5 Procedimentos experimentais após o desafio com PbA ou PbN 56
4.5.1 Curva de parasitemia 56
4.5.2 Curva de mortalidade 57
4.5.3 Escore Clínico 57

4.5.4 Eutanásia 58

4.5.5 Processamento do baço e marcação dos esplenócitos para análise fenotípica 59

4.5.6 Análise histológica 61

4.5.7 Extração de citocinas *in loco* 63

4.5.8 Detecção dos níveis de citocinas *in loco* 64

4.5.9 Avaliação da permeabilidade vascular da barreira hematoencefálica ... 64

5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 66

6 RESULTADOS 67

6.1 Padronização da concentração de eritrócitos parasitados por PbA para indução de MC em camundongos C57BL/6 67

6.2 Desenvolvimento de MC em animais desafiados com PBA após 30, 90 e 180 da exposição prévia a parasito homólogo e heterólogo 69

6.3 Análise macroscópica da calota craniana e microscópica do tecido encefálico dos animais que desenvolveram ou não MC após exposição prévia a parasito homólogo ou heterólogo 74

6.3.1 Relação entre perfil clínico apresentado pelos animais pré-expostos a infecção malárica por PbA e PbN e níveis de anticorpos séricos, níveis de citocinas anti- e pró-inflamatórias, índice esplênico e perfil fenotípico de células esplênicas 79

6.3.2 Avaliação da presença de linfócitos T helper ($CD4^+$), T citotóxicos ($CD8^+$) e linfócitos B ($CD19^+$) no cérebro de animais desafiados 30 dias após pré-exposição a malária 91

7 DISCUSSÃO 94

7.1 Concentração de eritrócitos parasitados para indução de MC experimental murina 94

7.2 Impacto das exposições heterólogas no desenvolvimento da MC experimental 96

7.3 Análise do impacto das exposições heterólogas em parâmetros imunológicos 99

8 CONCLUSÕES..... 105
9 REFERÊNCIAS 106

1 INTRODUÇÃO

1.1 A malária no mundo

Atualmente, a malária ainda é considerada um grande problema de saúde mundial (FIGURA 1). Em 2018, após todos os investimentos e esforços para eliminar a malária globalmente, dados emitidos pela Organização Mundial de Saúde mostraram que 91 países ainda eram considerados endêmicos para a doença. A maioria deles se localiza em áreas de clima tropical e subtropical, onde as altas temperaturas e os elevados índices de pluviosidade tornam ideais as condições ambientais para o desenvolvimento dos mosquitos vetores da malária (WHO, 2019).

Nesse mesmo ano foram notificados cerca de 228 milhões de casos clínicos da doença em todo mundo; 93% deles aconteceram na região africana, seguidos por 3,4% ocorridos na região do sudeste asiático e 2,1% na região mediterrânea oriental (WHO, 2019). Estima-se que cerca de 405 000 mortes ocorreram em 2018, 94% na região africana, onde prevalecem as infecções por *Plasmodium falciparum* (99,7%). Do total de óbitos, 67% foram registrados em crianças menores que 5 anos e mulheres primigestas; grupos mais vulneráveis ao agravamento da infecção (WHO, 2019).

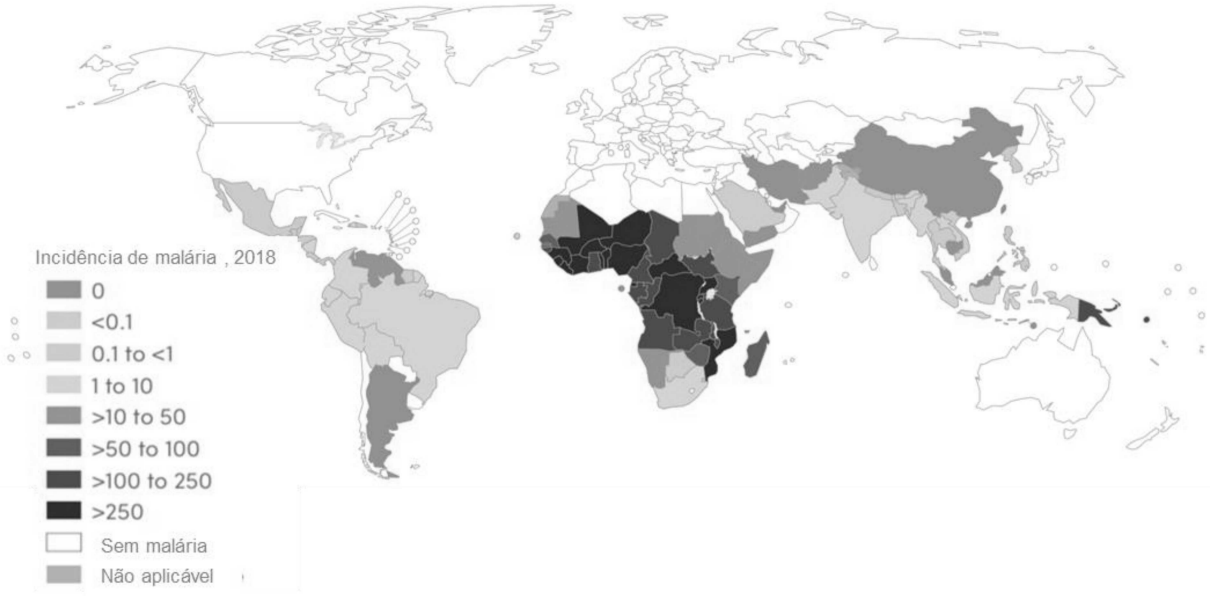


Figura 1 Mapa de taxa de incidência de casos de malária por país (casos por 1000 habitantes em população de risco), estimativa WHO, 2018.

Mundialmente, 3,3% dos casos de malária são causados por infecções por *P. vivax*. No entanto na região das Américas, os casos de malária atribuídos a essa espécie correspondem a 75% do total. Em 2018 foram notificados 929 mil casos e 577 óbitos nas Américas (WHO, 2019).

No Brasil, segundo dados preliminares disponibilizados pelo Ministério da Saúde, em 2019 foram notificados cerca de 157 000 casos, dos quais 89,3% se deveram a *P. vivax*, sendo o restante atribuídos a infecções por *P. falciparum* ou infecções mistas. De todas as notificações de casos, 99,9% concentraram na região da Amazônia Legal, composta pelos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. A região amazônica é responsável por 69,4% dos 37 óbitos ocorridos por malária no Brasil em 2019. (FIGURA 2) (Ministério da Saúde, 2020).

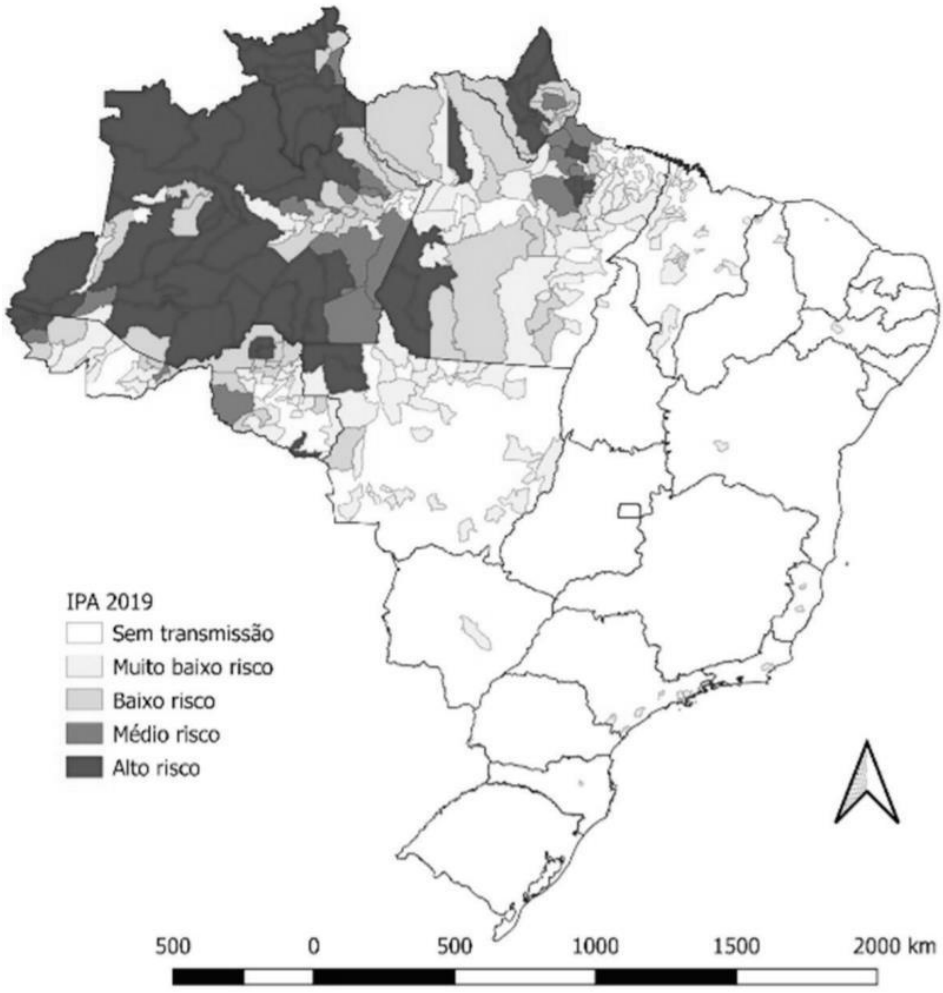


Figura 2 Mapa de risco de malária por município, Brasil, 2019*.

Fonte: Sivep-Malária, Sinan/SVS/MS e IBGE. Data de atualização: 4 de agosto de 2020. *Dados sujeitos a alteração.

De maneira geral, a variação na incidência da malária está estreitamente ligada ao grau de pobreza da área. Os países endêmicos para a doença têm seu PIB (Produto Interno Bruto) diminuído em cerca de 1,3% ao ano, causando grande impacto social e econômico nessas regiões (SACHS e MALANEY, 2002). Assim, o desenvolvimento e/ou manutenção das estratégias de controle que visam frear ou eliminar a disseminação da doença no mundo são fortemente recomendadas pela Organização Mundial de Saúde. Neste contexto, o desenvolvimento de uma vacina efetiva e segura contra a infecção tem justificado os recursos destinados a essa área.

1.2 Os parasitos da malária e seu ciclo biológico

A malária é uma doença causada por protozoários intracelulares do gênero *Plasmodium*. Das mais de 200 espécies desse protozoário, que infectam diversos hospedeiros vertebrados (NCBI TAXONOMY BROWSER, 2020), até o momento as espécies descritas como infectantes para o homem são: *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium cynomolgy* e *Plasmodium simium* (DEANE et al., 1966, WHITE, 2008; BRASIL et al., 2017, GRIGNARD et al., 2019).

Para que o ciclo de vida do parasito ocorra é necessária a presença de um hospedeiro intermediário vertebrado e um hospedeiro definitivo invertebrado. O hospedeiro invertebrado, vetor do protozoário, é a fêmea dos mosquitos do gênero *Anopheles*. Existem mais de 460 espécies de mosquitos nesse gênero, sendo que 70 são potenciais vetores da malária (SYNKA *et al*., 2012). No Brasil, as principais espécies de anofelinos responsáveis pela transmissão da doença são *Anopheles darlingi*, na região amazônica (DEANE, 1948) e *Anopheles aquasallis*, na região litorânea, que se estende da região nordeste até a sudeste (Revisto por HIWAT e BRETAS, 2011). Já na região africana existe a codominância de 3 espécies de vetores: *Anopheles gambiae*, *Anopheles funestus* e *Anopheles arabiensis* (SYNKA et al., 2012).

Nos seres humanos, o ciclo se inicia com a picada da fêmea do anofelino infectada, que durante o repasto sanguíneo deposita na derme do hospedeiro formas esporozoítas armazenadas em suas glândulas salivares (FIGURA 3). Os esporozoítos se movimentam ativamente, mas somente 50% conseguem deixar essa região, penetrando nos vasos sanguíneos (~70%) ou vasos linfáticos (~30%). As formas evolutivas que alcançam os vasos linfáticos são carreadas para o linfonodo drenante. Apesar de não serem detectados nesse sítio após algumas horas, os parasitos que se desenvolvem nesse local parecem não ser capazes de alcançar os vasos sanguíneos para iniciar o ciclo sanguíneo (AMINO et al., 2006). Já os esporozoítos que chegam aos vasos sanguíneos são carreados e alcançam os hepatócitos cerca de 30 minutos após a infecção, não sendo mais encontrados na corrente sanguínea após esse período (SHIN et al., 1982).

A invasão dos hepatócitos é o evento primordial para o estabelecimento da infecção ocorrendo através de sinalizações moleculares e bioquímicas, que

direcionam a migração do parasito. Porém, antes da invasão ocorre um processo denominado travessia, pelo qual os esporozoítos atravessem diversas barreiras físicas antes de se estabelecer em determinado hepatócito. Portanto, acredita-se que a entrada e saída dos esporozoítos das células hepáticas sem causar sua lise (MOTA et al., 2001) seja fundamental para o “amadurecimento” dos parasitos garantindo o sucesso do ciclo exoeritrocítico (MOTA et al., 2002).

A interação de proteínas presentes nos esporozoítos, como a proteína circunsporozoíta (CSP), com moléculas de heparan-sulfato existentes nos hepatócitos, promovem sua invasão (COPPI et al., 2005; COPPI et al., 2007). Ainda estão presentes nos esporozoítos, dentre outras, o antígeno 1 da membrana apical (AMA-1) (MITCHELL et al., 2004), que participa da reorientação do parasito e consequente contato entre o polo apical e a célula hospedeira; e a proteína adesiva relacionada a trombospondina (TRAP), presente nos micronemas, que se liga a receptores presentes na superfície da célula do hospedeiro, facilitando a invasão (THOMPSON et al.,2004).

Após a invasão, os esporozoítos permanecem no fígado por cerca de 14 a 16 dias, passando por um processo de reprodução assexuada denominada esquizogonia, dando origem a milhares de merozoítos. Esses merozoítos são liberados de forma silenciosa nos sinusóides hepáticos através de pequenas vesículas denominadas merossomas. Cada merossoma pode conter mais de 40 000 merozoítos (STURM et al., 2006), os quais permanecem circulantes por até 2 minutos (YAHATA et al., 2012). O processo de invasão das hemácias pelos merozoítos hepáticos se divide em etapas: se inicia com a interação entre o merozoíto e o eritrócito, que leva a deformação da membrana da célula hospedeira, seguida pelo rolamento e consequente interação da porção apical do merozoíto, culminando na invasão do eritrócito, que passa então, pela equinocitose e termina com recuperação da célula invadida (WEISS et al., 2015). Após invasão, dentro de 24 a 48 horas, o parasito se replica por esquizogonia originando 16 a 32 merozoítos. Com o rompimento dos eritrócitos ocorrerão os sintomas clássicos da infecção malárica, ao mesmo tempo que os merozoítos, ao invadirem novas hemácias, darão continuidade ao ciclo (Revisto por COWMAN et al., 2016).

Alguns dos merozoítos, previamente comprometidos com o desenvolvimento de gametócitos, invadem os eritrócitos se diferenciam e dão origem, a micro e macrogametócitos, que são as células reprodutivas masculinas e femininas,

respectivamente (SILVESTRINI et al., 2000). As bases para a determinação do comprometimento com o desenvolvimento sexual ainda não são bem definidas, mas estudos *in vitro* mostram uma concorrência de fatores que contribuem para a formação dos gametócitos, como a predeterminação genética de certos merozoítos para a evolução de formas assexuadas e sexuadas, bem como a pressão de fatores ambientais como alteração de pH, quantidade de população de formas assexuadas, resposta imune específica ou não ao parasito (DYER e DAY, 2000; BRANCUCCI et al., 2017; BUCKLING et al., 1999).

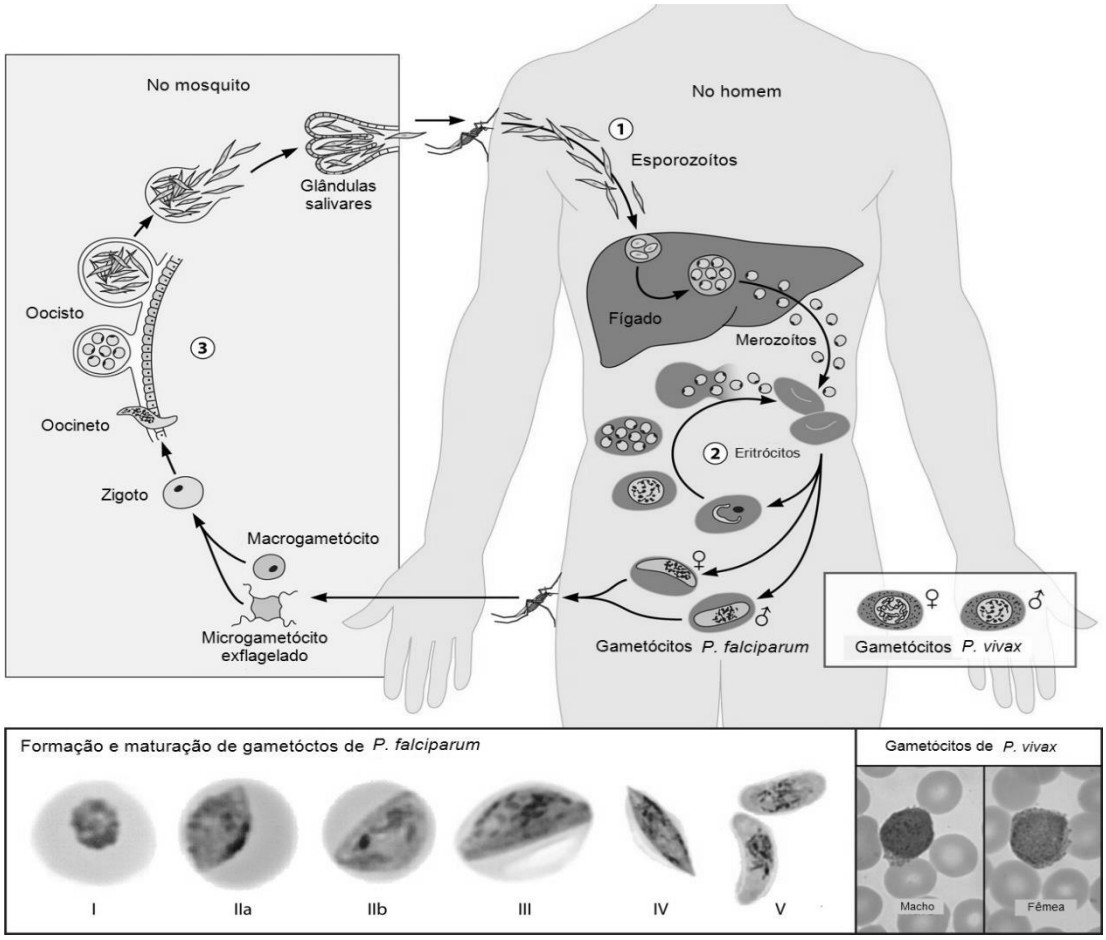


Figura 3 Ciclo evolutivo de *P. falciparum* evidenciando o desenvolvimento dos gametócitos (Adaptado de BOUSEMA e DRAKELEY, 2011).

Após a picada de fêmeas infectadas de anofelinos, esporozoítos ganham a acorrente sanguínea e alcançam os hepatócitos, ode se reproduzirão por esquizogonia, dando origem a merozoítos, que são liberados na corrente sanguínea. Uma vez na corrente sanguínea, os merozoítos passam a invadir eritrócitos, onde se reproduzem, levando a seu rompimento e dando continuidade às reinvasões dos eritrócitos, durante a fase eritrocítica do ciclo do parasito. Alguns do merozoítos se diferenciam em gametócitos, que no momento de um novo repasto sanguíneo serão ingeridos pelas fêmeas dos anofelinos, dando continuidade à fase sexuada do ciclo do parasito, dentro do hospedeiro invertebrado.

Uma vez na corrente sanguínea, os gametócitos maduros permanecem circulando (FARFOUR et al., 2012) e são, eventualmente, ingeridos pelas fêmeas dos anofelinos durante o repasto sanguíneo, dando continuidade à fase esporogônica do ciclo. No interior do estômago do mosquito são gerados os zigotos, que se tornam móveis (oocinetos) e invadem a parede do mesentério, onde se tornam oocistos. Esses oocistos se desenvolvem originando os esporozoítos que, então, migram para as glândulas salivares do inseto, sendo inoculados no homem no momento de um novo repasto (COWMAN e CRAB, 2006) (FIGURA 3).

1.3 A malária não complicada e a malária complicada

Os sinais e sintomas apresentados por indivíduos infectados pelos plasmódios se manifestam durante a fase eritrocítica do ciclo, especificamente durante o rompimento dos eritrócitos e consequente liberação de antígenos do parasito na corrente sanguínea. Ao conjunto de sintomas que ocorrem em consequência do rompimento das hemácias infectadas dá-se o nome de acesso malárico. Inicialmente, os acessos se caracterizam por uma fase de sudorese e calafrios, com duração de 15 minutos até 1 hora; após esse período é observado aumento da temperatura, com febre que pode alcançar até 41ºC, seguindo-se um período de defervescência, que dura entre 2 a 6 horas, quando o indivíduo apresenta sudorese intensa e fraqueza generalizada. Após o término do acesso, os indivíduos se sentem bem novamente, sem apresentar nenhum sinal ou sintoma da malária (BARTOLONI e ZAMMARCHI, 2012; Parasitologia Humana, 2016). Como os acessos ocorrem em função do rompimento das hemácias, os intervalos em que ocorrem variam de acordo com a espécie de parasito infectante. Em infecções causadas por *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*, o intervalo é de 48h, enquanto em infecções por *P. malariae*, os acessos ocorrem em períodos de 72h. Ao contrário do que ocorre em áreas de baixa endemicidade, os acessos febris são pouco observados em regiões de alta endemicidade, o que se deve a elevada frequência de picadas infectantes que ocorrem nessas regiões (Parasitologia Humana, 2016).

A malária complicada ou grave ocorre, principalmente, pela adesão de eritrócitos infectados em capilares de pequeno calibre, sendo esse fenômeno

observado, principalmente, em infecções causadas por *P. falciparum* (CLARK e COWDEN, 2003). Esse mecanismo é uma estratégia do parasito para evadir-se do sistema imune do hospedeiro, porém o acúmulo de eritrócitos nos capilares associado a resposta inflamatória local leva ao comprometimento da função de órgãos e tecidos vitais (revisto por SCHOFIELD e GRAU, 2005).

Existem fatores que desempenham um importante papel no resultado do desenvolvimento da síndrome de agravamento da doença, dentre eles podemos citar: a falta de acesso à terapêutica ou tratamento clínico adequados, a idade, o histórico imunológico e fatores genéticos do hospedeiro. Esses fatores fazem com que aproximadamente cerca de 1 a 2% dos pacientes, infectados por *P. falciparum,* desenvolvam a forma grave da doença, que se caracteriza por uma síndrome que afeta o indivíduo de forma sistêmica, causando lesão pulmonar, insuficiência renal, malária cerebral e anemia grave entre outros (MILLER et al., 2002; IDRO et al., 2007).

A lesão pulmonar aguda afeta cerca de 25% dos pacientes adultos que desenvolvem malária grave causada por *P. falciparum* (TAYLOR et al., 2012), ela se caracteriza por aumento da frequência respiratória acompanhada de falta de ar, podendo evoluir para a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). A SDRA é caracterizada clinicamente por hipoxemia grave (PaO_2/ FiO_2<200mmHg, pressão arterial de oxigênio (PaO_2) /frequência inspirada de oxigênio (FiO_2) menor que 200 mmHg) acompanhada da presença de infiltrado bilateral. Os mecanismos que desencadeiam o desenvolvimento do quadro ainda não são totalmente elucidados, mas estudos mostram que a lesão pulmonar se inicia por uma resposta inflamatória local em reação à produtos do parasito, como a hemozoína, ou pela presença das células parasitadas, ou ainda, que pode ocorrer por uma resposta inflamatória sistêmica (SOUZA et al., 2012; DEROOST et al., 2013).

A insuficiência renal causada pela malária atinge cerca de 40% dos adultos com malária grave, contribuindo com a alta taxa de mortalidade dos casos (WHITE et al., 2014; WOLFSWINKEL et al., 2016). As manifestações clínicas relacionadas a insuficiência renal incluem oligoanúria, anormalidades eletrolíticas como a hiponatremia (diminuição dos níveis de sódio no sangue) e a hipercalemia (aumento dos níveis sanguíneos de potássio), acidose metabólica grave e estado hipercatabólico (NAQVI et al., 2016, WIN et al., 2012). Inicialmente, a insuficiência renal se deve a anormalidade morfológica apresentada pelos eritrócitos infectados, que se aderem a outros eritrócitos, plaquetas e ao endotélio, prejudicando a

microcirculação (DONDORP et al., 2008). Além dos fatores micro embólicos, a ativação endotelial, causada pela liberação de citocinas vasoativas, levam a hipovolemia e redução da viscosidade sanguínea. Esses fatores somados a liberação de mediadores inflamatórios, como leucotrienos e prostaglandinas, durante resposta imune, aumentam a vasoconstrição (BARSOUM, 2000).

Outra complicação da malária é a anemia grave, a qual se caracteriza por superfícies das mucosas e palmas pálidas, associadas a níveis de hemoglobina menores que 5g/dL (<5g/dL) ou hematócrito menor que 15% (<15%) em crianças menores que 12 anos, enquanto em adultos é caracterizada por níveis de hemoglobina menores que 7g/dL (<7g/dL) ou hematócrito menor que 20% (<20%), descartando-se outra causa de anemia grave crônica e associando-se a uma parasitemia maior que 10 000 parasitos/μL de sangue periférico (WHITE et al., 2014). Sua ocorrência durante infecções maláricas se deve a concorrência de múltiplos eventos, dentre eles, o rompimento de eritrócitos parasitados no momento da liberação dos merozoítos, diseritropoiese e destruição de eritrócitos não parasitados pelo baço do hospedeiro (WHITE, 2018). Dentre os três eventos que norteiam o desenvolvimento da anemia grave, o menos expressivo é a destruição dos eritrócitos infectados, uma vez que a taxa de destruição de eritrócitos não parasitados pode chegar a 10 vezes mais que a de eritrócitos parasitados (JAKEMAN et al., 1999). Já a diseritropoiese, que ocorre pela ação de citocinas pró-inflamatórias produzidas em resposta a infecção e que agem diretamente na medula, diminuindo a produção dos eritrócitos, é responsável por cerca de 90% da anemia grave durante a malária (PRICE et al., 2001; WHITE et al., 2014). A destruição de eritrócitos sadios no baço ocorre como um mecanismo de defesa “frustrado” do organismo hospedeiro. Especificamente, esse processo é mediado pela adsorção de antígenos do parasito na membrana da hemácia favorecendo sua opsonização por anticorpos e, consequente, a destruição por células do sistema imunológico, incluindo os macrófagos residentes no baço (SAFEUKUI et al., 2008; DONDORP et al., 1999; DOUGLAS et al., 2012).

A MC é definida pelo coma, menor que 11 pontos na escala de Glasgow, quando mensurada em adultos; e menor que 3 pontos na escala Blantyre, mensurada em crianças, ou coma que perdure por mais que 30 minutos após a convulsão, e que não pode ser atribuída a outra causa (WHO, 2015). Aproximadamente 1% dos pacientes infectados por *P. falciparum* desenvolvem MC, sendo que 90% desses

casos ocorrem em crianças da África subsaariana (Infections of the Central Nervous System: Pathology and Genetics, 2020). As taxas de mortalidade podem alcançar de 15 a 25%, mesmo em indivíduos tratados, e cerca de 25% dos sobreviventes podem apresentar sequelas neurológicas ou cognitivas pelo resto de suas vidas (JOHN et al., 2008)

O agravamento neurológico se inicia a partir da adesão de eritrócitos infectados e plaquetas ao endotélio das veias e capilares do cérebro (WASSMER et al., 2011). A interação de moléculas presentes na superfície de células infectadas, como as proteínas de membrana do eritrócito 1 e 2 (PfEMP1 e PfEMP2) ou PfHRP1 e KAHRP (Proteína de *P. falciparum* Rica em Histidina e Proteína de *P. falciparum* Rica em Histidina Associadas aos Knobs, respectivamente) com receptores presentes no endotélio como ICAM-1, E-Selectina e CD36, levam a uma hipertensão local e consequente rompimento local da barreira hematoencefálica (DOROVINI-ZIS et al., 2011; FRANCISCHETTI et al., 2008). Esses fatores contribuem para a ocorrência de edema cerebral, hemorragia e inflamação local, levando aos sintomas característicos da MC.

1.4 Resposta imunológica à malária no hospedeiro vertebrado

A resposta imunológica a infecções maláricas depende de diversos fatores associados tanto ao hospedeiro, quanto ao parasito. Em relação ao parasito, pode-se citar seu complexo ciclo de vida, com diversos estágios evolutivos e consequentemente, a ampla variedade de moléculas antigênicas, bem como a elevada variabilidade genética que leva a circulação de distintas cepas do parasito (GUPTA e DAY,1994). No que se refere aos fatores relacionados ao hospedeiro, características genéticas, como a anemia falciforme, a talassemia, defeitos na membrana dos eritrócitos (ovalocitoses do Sudoeste Asiático, algumas formas de eliptocitoses) e algumas anormalidades metabólicas (deficiência em glicose-6-fosfato dehidrogenase - G6PD) (MIN-OO e GROS, 2005; HEDRICK, 2011) podem manter o indivíduo naturalmente protegido contra a malária. Além disso, o estado imunológico do hospedeiro influencia na intensidade dos sinais e sintomas apresentados pelo indivíduo. Nesse contexto, pessoas que residem em áreas de endemicidade elevada e estável podem apresentar a chamada imunidade clínica não esterilizante, o que

significa ausência de sintomas mesmo na presença de níveis patentes ou subpatentes de parasitos circulantes. Desse modo, o avanço da idade e, consequentemente, as repetidas exposições ao parasito são fatores que juntos confluem para o desenvolvimento e a manutenção do controle na evolução da doença (BEJON et al., 2010).

De maneira geral, a reposta imune do hospedeiro vertebrado a malária é bastante complexa, e se inicia durante o repasto sanguíneo, quando a fêmea do anofelino inocula na derme do hospedeiro as formas esporozoítas dos plasmódios; infeções experimentais demostraram que durante o repasto o mosquito inocula em média 125 esporozoítos na pele de camundongos (MEDICA e SINNIS, 2005). Os esporozoítos permanecem na pele por no mínimo 5 minutos antes de migrar para os vasos sanguíneos e linfáticos (MATSUOKA et al., 2002), podendo ser encontrados nesse sítio até 2 horas após a inoculação (LLOYD e SOMMERVILLE, 1949). Tanto os esporozoítos que atingem os vasos sanguíneos, quanto aqueles que permanecem na derme, ou mesmo os que são drenados pelos linfonodos podem ser opsonizados por anticorpos direcionados a CSP (proteína circunsporozoíta) (FLORES-GARCIA et al., 2018). Nos linfonodos drenantes, os esporozoítos sofrem, ainda, a ação de células dendríticas, que potencializam a resposta de linfócitos T citotóxicos nos hepatócitos (BRUÑA-ROMERO e RODRIGUEZ, 2001). Já foi demonstrado que anticorpos opsonizantes agem sobre esporozoítos bloqueando a invasão dos hepatócitos, que quando são infectados passam a expor em suas membranas externas proteínas do parasito em associação ao MHC I (Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe 1), sendo reconhecidas por linfócitos T citotóxicos. O reconhecimento leva a destruição dos hepatócitos infectados pelos linfócitos T citotóxicos, através da liberação de perforinas e granzimas e, também, a estimulação de células NK (natural killer) e linfócitos T *helper* a produzirem interferon gama (IFN-ɣ). Esses eventos desencadeiam uma cascata de reações da resposta imune, levando a morte intracelular do parasito (WEISS et al.,1990; WANG et al., 1996). Apesar da resposta imune inicial a infecção, essa não se mostra suficiente para impedir o desenvolvimento da doença, que passa a fase eritrocítica do ciclo, a partir da liberação de merossomas repletos de merozoítos na corrente sanguínea.

Após atingirem a corrente sanguínea os merozoítos rapidamente iniciam a invasão dos eritrócitos, processo que ocorre em cerca de 30 segundos (GILSON e CRABB, 2009). Porém, ao serem liberados das hemácias, os merozoítos tornam-se

alvos de anticorpos, que desempenham importante papel no controle parasitário. Neste sentido, sabe-se desde a década de 1960 que anticorpos IgG, quando transferidos passivamente de indivíduos hiper imunes para crianças, promoviam queda acentuada da parasitemia circulante, enquanto seu esgotamento voltava a permitir a elevação nas taxas de parasitos circulantes (COHEN et al., 1961).

Vários são os mecanismos pelos quais os anticorpos podem agir mediando proteção antimalárica sendo os principais: 1 – lise direta do parasito pela ação do sistema complemento; 2 – internalização do parasito pela fagocitose; 3 – destruição de merozoítos pelo burst respiratório; ou ainda 4 – por meio da inibição celular dependente de anticorpo (ADCI, do inglês antibody-cellular dependent inhibition) (HILL et al., 2017) (FIGURA 4). A ADCI ocorre pela ação de anticorpos opsonizantes, que têm sua porção Fc reconhecida por receptores presentes na superfície de monócitos, que então, passam a liberar mediadores solúveis, inibindo a divisão intraeritrocítica de parasitos ao redor (PÉRIGNON e DRUILHE, 1994; BOUHAROUN-TAYOUN et al., 1995).

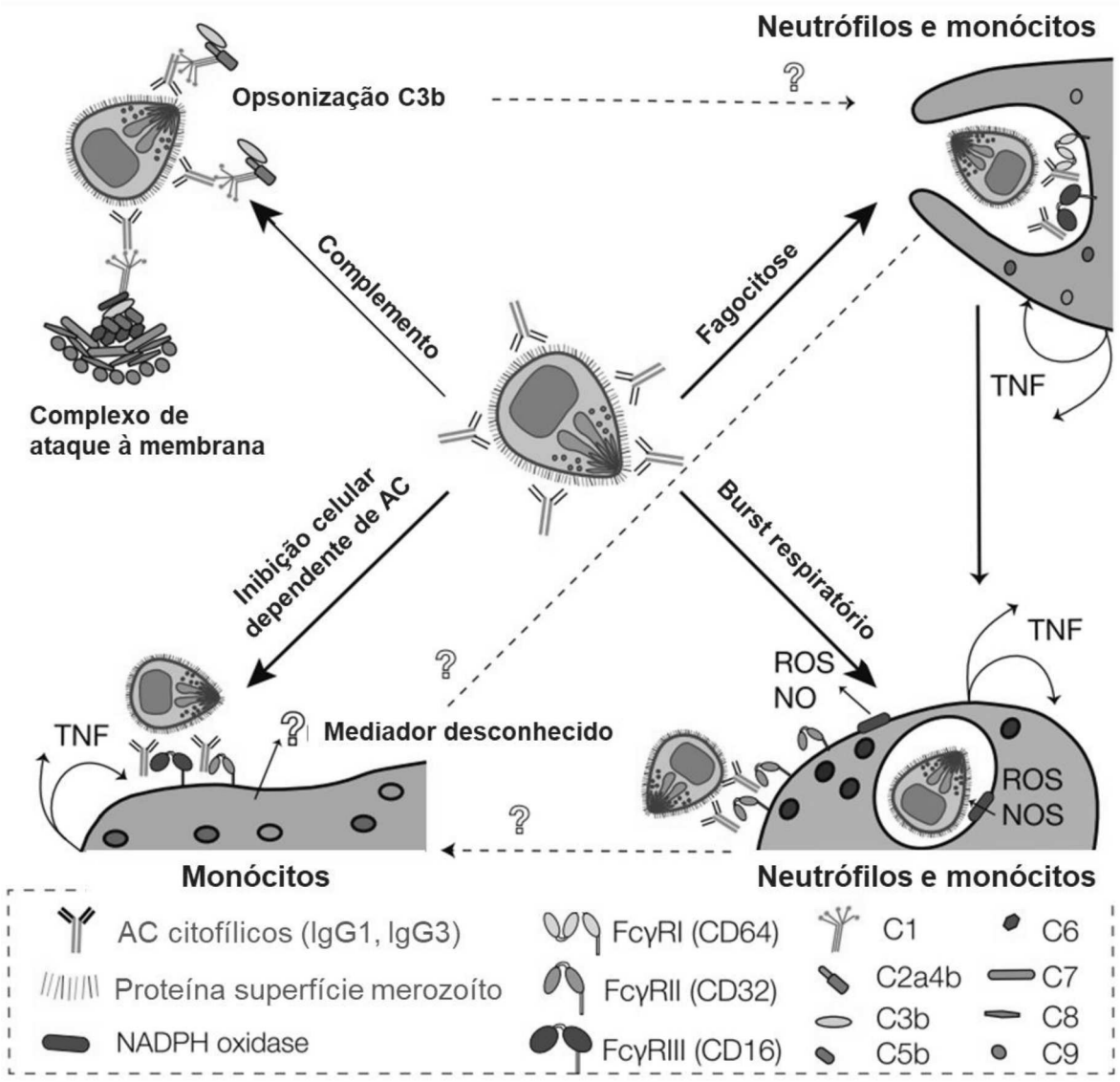


Figura 4 Mecanismos de ação de anticorpos na resposta antimalárica. Adaptado de Hill et al., 2017.

Os anticorpos podem atuar de diversas formas frente a infecções maláricas. Através da fixação do complemento na porção Fc dos anticorpos opsonizantes, que leva a formação do Complexo de Ataque a Membrana (MAC). Além disso, o reconhecimento da porção FC de anticorpos opsonizantes leva ao processo de fagocitose dos parasitos por neutrófilos e monócitos. Também, após o reconhecimento de parasitos opsonizados ocorre o chamado *burst* respiratório, com a produção de espécies reativas de oxigênio, levando o parasito a morte. Ainda, os anticorpos participam da Inibição Celular Dependente de Anticorpos, na qual, após o reconhecimento de parasitos opsonizados, monócitos e macrófagos passam a secretar mediadores, que levam parasitos e eritrócitos parasitados circundantes a morte.

Em seres humanos as subclasses citofílicas de imunoglobulinas G, IgG1 e IgG3, desenvolvem importante papel em infecções maláricas, uma vez que indivíduos que apresentam níveis reduzidos dessas imunoglobulinas mostram-se mais susceptíveis a infecção quando comparados aos que apresentam níveis elevados (revisto por GREEN e KRIER, 1978; HILL et al., 2017). Em estudos realizados com crianças, altos níveis de anticorpos IgG1 e IgG3, direcionados a proteína EBA

(Erythrocytes antigen biding), MSP-2, MSP-3, ou a PfRH5, presentes na superfície de merozoítos, estão associados com a diminuição dos riscos de desenvolvimento clínico da malária e de altos níveis de parasitemia (TAYLOR et al., 1998; ROUSSILHON et al., 2007; RICHARDS et al., 2010; WEAVER et al., 2016).

Já em modelos murinos, as subclasses de imunoglobulinas que apresentam propriedades citofílicas são IgG1 (VALERO *et al*., 1998) e IgG2a, a última desempenha importante papel mais proeminente na diminuição da parasitemia (ROTMAN et al., 1998; SMITH e TAYLOR-ROBINSON, 2003). Já foi demonstrado que em infecção experimental com *P. yoelii* 17X e *P. berghei* (XAT), o isótipo IgG2a modula parasitemia de camundongos recipientes de transferência passiva (WHITE et al., 1991; WAKI et al., 1995). Além do papel protetor de IG1 e IgG2a, já descrito em infecções maláricas, os isótipos IgG2b e IgG3 também já foram descritos como participantes da resposta imune a doença. A transferência passiva de anticorpos monoclonais IgG3, produzidos a partir da cultura de esplenócitos de camundongos BALB/C expostos a *P. yoelii* 17X, protegeu os camundongos recipientes do óbito após desafio com *P. yoelii 17XL*, fazendo com que seus níveis de parasitemia permanecessem baixos (MAJARIAN et al.,1984), o mesmo foi observado em outro estudo utilizando a cepa YM de *P. yoelii* (SPENCER VALLERO et al., 1998).

Além dos anticorpos, diferentes células do sistema imunológico atuam no combate a infecção malárica. No breve período entre o rompimento da célula infectada e a invasão de outras atuam, por exemplo, células T$\gamma\delta$, macrófagos, células dendríticas e células NK (natural killer).

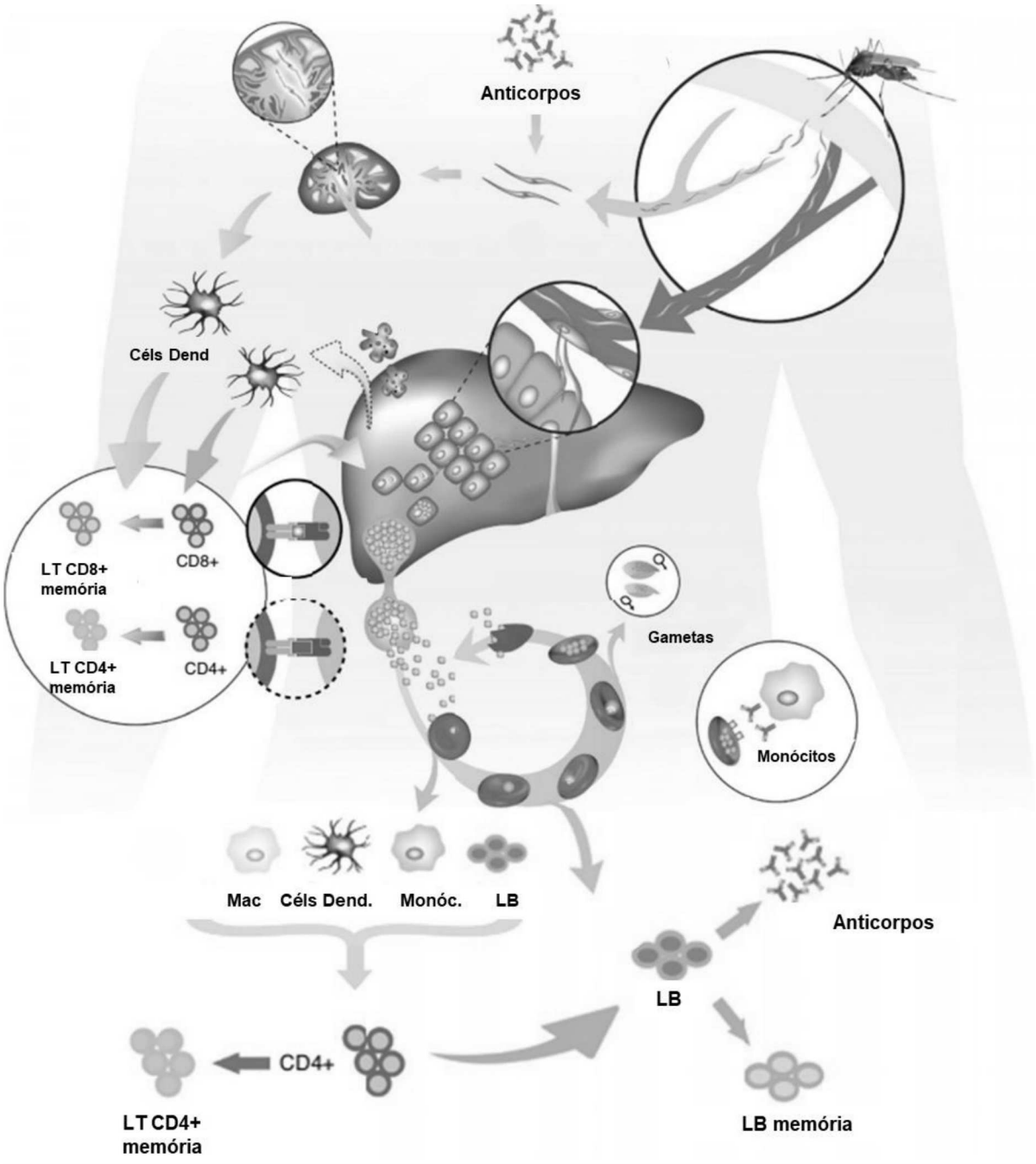


Figura 5 Representação esquemática da resposta imune contra parasitos *Plasmodium spp*.

Após a picada da fêmea do anofelino, quando parte dos esporozoítos inoculados chega aos hepatócitos e outra parte permanece na pele ou segue para os linfonodos drenante, anticorpos específicos, gerados em exposições prévias a malária ou por imunização, podem impedir a invasão de hepatócitos. Nos linfonodos drenantes alguns esporozoítos são degradados e seus antígenos são apresentados via células apresentadoras de antígenos (APCs) a linfócitos T *naive*, primando linfócitos T CD8+, que podem migrar para o fígado e desenvolver funções efetoras nesse sítio. Já na fase sanguínea, diferentes APCs podem apresentar antígenos e metabólitos dos parasitos a linfócitos T CD4+, que levam os linfócitos B a secretarem anticorpos.

Células dendríticas (Céls. Dend.); Monócitos (Monóc.); Linfócitos B (LB): Linfócitos T (LT); Macrófagos (Mac).

As células Tγδ compõem um compartimento celular que une funções da imunidade inata e adaptativa. Especificamente, elas preenchem os espaços deixados pelos linfócitos T αβ, e têm como funções: a morte de células infectadas; recrutamento de neutrófilos; ativação de fagócitos e indução de formação de granulomas (RIBOT et al., 2020). Já foi demonstrado que infecções maláricas em camundongos e seres humanos levam a uma grande expansão dessa população celular (HO et al., 1994; PERERA et al., 1994; PIED et al., 2000). As células Tγδ hepáticas produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias como IFN- ɣ. No contexto de infecções maláricas já foi descrito que o IFN-ɣ produzido por células Tγδ pode modular a resposta imune ao parasito de fase sanguínea, promovendo a produção dessa citocina em linfócitos T helper e citotóxicos no baço. Além da participação na modulação da resposta a fase eritrocítica, as células Tγδ hepáticas também contribuem para o desfecho de agravamento da malária em uma das suas formas mais comuns, a MC (YAÑEZ et al., 1999, RIBOT et al., 2019).

Durante a fase sanguínea, as células Tγδ atuam mediando a morte direta de merozoítos ou indiretamente por meio da morte de eritrócitos infectados pela ação de granzimas (ELLOSO et al., 1994; COSTA et al, 2011; HERNÁNDEZ-CASTAÑEDA et al., 2020), além de atuarem na apresentação de antígeno para células T αβ (HOWARD et al., 2017). Quantidades reduzidas de linfócitos Tγδ estão associados com a imunidade clínica apresentada por indivíduos residentes de áreas endêmicas, visto que essas células são importantes produtoras de IFN-ɣ e TNF-α, citocinas associadas ao agravamento da malária (JAGANNATHAN et al., 2014; STANISIC et al., 2014).

Os macrófagos agem induzindo a fagocitose de eritrócitos infectados, ou promovendo a ADCI (inibição celular dependente de anticorpo), além de produzir citocinas que contribuem para a eliminação do parasito. A fagocitose de eritrócitos infectados ocorre mesmo sem a presença de anticorpos, através da interação do receptor de superfície CD36, presente no macrófago, com a proteína PfEMP-1 (*P. falciparum* – encoded erythrocyte membrane protein 1) expressa na superfície de eritrócitos infectados (PATEL et al., 2004). Já na interação de macrófagos com anticorpos que recobrem os parasitos, através do reconhecimento da porção Fc desses anticorpos, pode ocorrer a chamada inibição celular dependente de anticorpo (ADCI), que leva a liberação de componentes solúveis que matam os parasitos intra-

eritrocíticos circundantes (BOUHAROUN-TAYOUN et al., 1995; GALAMO et al., 2009).

Os macrófagos também desempenham importante papel na produção de citocinas que auxiliam no combate aos plasmódios. No entanto, a produção excessiva dessas citocinas, por essa e por outras células do sistema imunológico, pode contribuir, também, para a patogênese da malária. Dentre as citocinas produzidas por macrófagos durante as infecções maláricas, o IFN-ɣ desempenha um importante papel na resposta inflamatória inicial de combate ao parasito de fase sanguínea. Dentre outros mecanismos, o IFN-ɣ induz a produção da enzima óxido nítrico sintetase, desencadeando a produção de óxido nítrico (NO), que atua na eliminação de esquizontes e de células infectadas, bem como na indução de radicais de oxigênio e reativos intermediários de nitrogênio, que também atuam no sentido de eliminar o parasito (KIRUNPETCHARAT et al., 1999; DOOLAN e HOFFMAN 2000).

As células dendríticas são células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs); elas internalizam os patógenos, processando-os e expondo-os em sua superfície na forma de antígenos. Ao serem reconhecidos por células do sistema imune inicia-se, então, a resposta imunológica adquirida (NUSSENZWEIG e STAEIMAN, 1980). Em infecções maláricas, um grupo de células dendríticas, inicialmente, desempenham papel pró-inflamatório, através da produção e secreção da citocina IL-12, que estimula a proliferação de linfócitos T helper de perfil TH1 e consequentemente, a produção de IL-12, IFN-ɣ e TNF-α (PERRY et al., 2004). Ao longo do curso da infecção, outro grupo de células dendríticas passa a induzir a proliferação de linfócitos T helper que secretam grandes quantidades de IL-4 e IL-10, citocinas características de células de perfil TH2, com papel regulatório em infecções maláricas (SPONAAS et al., 2006). Essa atividade supressiva da reposta imune também é direcionada a fase hepática do ciclo, a geração de células dendríticas durante o ciclo eritrocítico da malária levam a supressão *in vitro* da atividade dos linfócitos T citotóxicos ($CD8^+$) direcionados a fase hepática (OCAÑA-MORGNER et al., 2003).

Entretanto, a resposta de células dendríticas em infecções maláricas experimentais pode variar de acordo com a cepa de parasito utilizada (WYKES e GOOD, 2008). Por exemplo, durante a malária causada por *P. yoelli cepa* 17XNL e *P. chabaudi* observa-se a geração de células dendríticas que, classicamente, induzem a produção de IL-12. Por outro lado, células dendríticas geradas em reposta a infecções

por *P. yoelii* cepa YM, *P. vinkey* e *P. berghei* têm sua capacidade de indução de IL-12 diminuída (WYKES et al., 2007). Em infecções causadas por *P. berghei* ANKA, indutora de MC em camundongos C57BL/6, as células dendríticas são necessárias para a indução de linfócitos T CD4, que são importantes na patogênese da MC (DEWALICK et al., 2007).

Juntamente com as células dendríticas, as células NK (do inglês *natural killer*) contribuem para a ativação de linfócitos T helper, dentre suas principais atribuições estão a produção citocinas pró-inflamatórias, como IFN-ɣ; e a morte direta do patógeno (RIG-CORNEJO et al., 2013). As células NK detêm um papel bem estabelecido na produção de citocinas durante a infecção malárica. Nesse contexto, essas células são capazes de secretar quantidades elevadas de IFN-ɣ muito rapidamente (STEGMANN et al., 2015). Além da produção de citocinas, as células NK participam da lise direta de parasitos ou células parasitadas (MAVOUNGOU et al. 2003), por meio do processo de ADCC (citotoxicidade celular dependente de anticorpo) ou sem a necessidade da presença de anticorpos (WOLF et al., 2017). Estudos *in vitro*, demonstraram que anticorpos provenientes de indivíduos residentes em área de alta endemicidade e protegidos da malária clínica, tiveram capacidade de opsonizar eritrócitos parasitados induzindo rápida lise através de ADCC mediada por células NK (ARORA et al., 2018). Em seres humanos e em modelos murinos, a abundância dessas células está associada com a proteção clínica e contra altos níveis de parasitemia na malária falciparum (CHOUDHURY et al., 2000; CHEN et al., 2014; HART et al., 2019).

Tanto na malária humana quanto em modelos murinos, a presença de linfócitos T helper de perfil Th1 e grandes quantidades de IFNɣ são características notáveis da resposta imune durante o estágio sanguíneo em infecções maláricas (TROYE-BLOMBERG et al., 1985; SU e STEVENSON, 2000). Os linfócitos desse compartimento celular secretam grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias como o TNF, IFN-γ e IL-12, ativando outros tipos celulares como os macrófagos e células NK, envolvidos na diminuição da parasitemia (BASTOS et al., 2002; HOROWITZ et al., 2010). Os linfócitos T helper também têm a função de ativar linfócitos B, para a troca de isótipo de anticorpos IgM para IgG, que são a principal forma de defesa do organismo no estágio sanguíneo em infecções maláricas (SU e STEVENSON, 2000).

O equilíbrio entre a resposta imune pró-inflamatória e anti-inflamatória é primordial para a resolução da infecção sem que haja dano ao hospedeiro, promovendo a restauração tecidual (NATHAN, 2002). Em infecções maláricas, o balanço entre as a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN-ɣ, TNF-α, IL-12 e IL-6, que são imprescindíveis no início da fase sintomática/sanguínea da doença, e sua queda após esse período inicial, dando lugar as citocinas reguladoras como TGF-β e IL-10, é fundamental para que a malária não evolua para um quadro clínico grave (Revisto por KURUP et al., 2019). Diante de todo o exposto, é inquestionável que a imunidade a parasitos, incluindo os plasmódios, é gerenciada por diversos tipos celulares que participam de mecanismos orquestrados entre si e que qualquer descompasso nessa maquinaria pode culminar em danos graves ao hospedeiro. Entender essa maquinaria é a peça fundamental para o desenvolvimento de estratégias de controle efetivas como o desenvolvimento de uma vacina antimalárica.

1.5 Vacinas antimaláricas

A malária causa em média 20% de mortalidade em crianças que apresentam sinais clínicos de acometimento neurológico. Cerca de 40% das crianças que desenvolvem MC apresentam alguma sequela neurológica e cognitiva a longo prazo, os danos cognitivos mais comuns são os déficits de linguagem, atenção, memória e habilidades motoras, além de problemas comportamentais e epilepsia, que podem acompanhar os indivíduos por toda vida (WHO, 2014).

Embora o número de mortes que ocorre anualmente seja o grande impulsionador na busca por estratégias que permitam a erradicação da doença, o número de casos clínicos também é alarmante em todo o mundo (WHO, 2019). Assim, o controle de vetores, diagnóstico rápido e a ampliação do acesso ao tratamento em áreas endêmicas (BHATT et al., 2015) têm sido os pilares centrais do combate a doença. Porém, os esforços realizados até o momento esbarram em fatores biológicos inerentes ao parasito que dificultam o alcance dos objetivos. Dentre esses fatores, pode-se citar o fato de que os protozoários do gênero *Plasmodium* apresentam grande diversidade genética e genômica, que permitem o desenvolvimento de resistência a

medicamentos utilizados para o tratamento, as quais podem ser disseminadas de geração a geração de parasitos. Esse fator, aliado a resistência dos mosquitos transmissores aos inseticidas de efeito residual (RANSON et al., 2011; O'BRIEN et al., 2011) tornam imprescindível o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz, que diminua a morbidade e a mortalidade causadas pela malária.

Assim, considerando-se o complexo ciclo de vida do parasito (TAKALA e PLOEW, 2009), os protótipos vacinais atualmente estudados são direcionados aos: 1 – esporozoítos, visando-se a indução de imunidade esterilizante, evitando-se assim o estabelecimento da infecção; 2 – aos merozoítos, evitando-se os sintomas ou a gravidade da doença; e 3 – aos gametócitos, de maneira a impedir a continuidade do ciclo no mosquito vetor (LONG e ZAVALLA, 2016).

Os protótipos vacinais direcionados a fase exoeritrocítica incluem a utilização de esporozoítos vivos que são atenuados por meio de estratégias distintas: por radiação, geneticamente ou quimicamente (drogas medicamentosas) (GOH et al., 2019). Os modelos de vacina que utilizam parasitos atenuados por radiação são obtidos através da exposição de anofelinos infectados a raios x. Estudos em humanos utilizando esse tipo de protótipo vacinal induziram entre 90 e 95% de proteção contra infecções com parasitos homólogos aos utilizados na imunização (Revisto por MOLINA-FRANK et al., 2020).

Já a abordagem que usa a manipulação genética dos esporozoítos visa alterar, atenuar ou eliminar o desenvolvimento da fase exoeritrocítica do parasito. Estudos utilizando essa abordagem demostraram que a depleção do gene *UIS4* (up-regulated in infective sporozoites gene 4) nos esporozoítos evitou que 100% dos animais imunizados com esses parasitos desenvolvessem a fase eritrocítica da doença (MUELLER et al., 2005). Da mesma forma outro estudo, também utilizando modelos murinos, mostrou que a depleção do gene *P36* (que tem papel na habilidade de esporozoítos de infectar e atravessar hepatócitos) fez com que somente 4% dos camundongos da linhagem C57BL/6 e 10% dos animais da linhagem BALB/C desenvolvessem a fase sanguínea do ciclo. Interessantemente, quando esses animais foram submetidos ao desafio com cepa homóloga a imunização, nenhum deles apresentou parasitemia sanguínea em até dois meses após o desafio (VAN DIJK, et al., 2005).

Protótipos que empregam a imunização com esporozoítos inteiros vivos associados a tratamento quimioprofilático intentam expor o indivíduo ao

desenvolvimento exoeritrocítico da malária, impedindo o desenvolvimento da fase sanguínea através do tratamento. Estudos em modelos murinos demostraram a eficiência desse procedimento, evitando o desenvolvimento da fase eritrocítica da doença (BELNOUE et al., 2004; NAHRENDORF et al., 2015). Em seres humanos, a infecção experimental com *P. falciparum*, seguida de tratamento antimalárico específico, foi capaz de induzir taxas de proteção de 90% contra desafio homólogo 28 dias após a imunização e 80% de proteção, em desafio realizado cerca de 28 meses após a imunização (ROESTENBERG et al., 2011; MORDMÜLLER et al., 2017). Além da cloroquina, a mefloquina (SCHATS, 2019), a primaquina, a associação de antibióticos (FRIESEN et al., 2010) e o artesunato também tem sido utilizados como quimioprofiláticos (PENG et al., 2014).

Já os protótipos que utilizam parasitos assexuados de fase sanguínea objetivam, principalmente, diminuir a morbidade e a mortalidade causadas pela malária. Nesse caso, há estudos utilizando parasitos inteiros vivos (atenuados ou não), mortos e até mesmo lisados com o objetivo de induzir imunidade antimalárica eficaz. Neste sentido, imunizações com parasitos vivos de fase sanguínea atenuados por radiação foram capazes de proteger modelos murinos contra altos níveis de parasitemia, contra a deterioração do estado clínico geral do animal e o desenvolvimento de MC experimental (revisto por STANISIC e GOOD, 2015). Da mesma forma, baixas doses de parasitos lisados associados ao adjuvante CpG-ODN foram capazes de induzir, em modelo murino, proteção contra parasitos homólogos ou heterólogos aos utilizados na imunização (PINZON-CHARRY et al., 2010). Nesse caso, a proteção pareceu ser mediada por linfócitos T helper, de IFN-Ɣ e óxido nítrico.

Além do uso de parasitos inteiros vivos ou lisados, sejam de fase exoeritrocítca ou eritrocítica, existem ainda pesquisas voltadas a utilização de somente uma fração antigênica do parasito, alvos que já foram descritos como contendo alto teor de imunogenicidade, como as vacinas de bloqueio de transmissão da malária, direcionadas aos parasitos sexuados de fase sanguínea (e de estágio no mosquito). Em 1976, Gwadz observou que após imunização experimental com parasitos de fase sanguínea em modelos de malária aviária, a transmissão para mosquitos vetores foi bloqueada. Atualmente, existem protótipos direcionados a proteína de membrana Pfs48/45 e Pfs230, expressas na superfície de gametócitos e a proteínas Pfs25, que compõem a membrana de zigotos e oocinetos de *P. falciparum* (Revisto por ZHENG et al., 2019). Em estudos pré-clínicos, esse modelo vacinal se

mostrou altamente imunogênico (SAUL, 2007); mosquitos alimentados em voluntários que receberam 4 doses da vacina de bloqueio de transmissão, que continha a proteína Pfs25, tiveram sua carga parasitária diminuída em até 50% em relação ao observado em mosquitos alimentados em voluntários não imunizados (TALAAT et al., 2016).

Ainda, entre os protótipos vacinais que investigam a eficácia de imunizações utilizando proteínas de subunidades, existem protótipos direcionados tanto ao ciclo eritrocítico quanto exoeritrocítico. Em relação ao ciclo eritrocítico as proteínas mais utilizadas nos protótipos vacinais são: as proteínas de superfície do merozoítos 1-3 (MSP-1, MSP-2 e MSP-3), o antígeno da membrana apical 1 (AMA-1), a proteína rica em glutamato (GLURP), o antígeno de superfície de eritrócito infectado fase de anel (RESA), o antígeno repetitivo de serina 5 (SERA 5), o antígeno de ligação aos eritrócitos 175 (EBA-175) (VAUGHAN et al., 2012). O alvo antigênico eritrocítico mais promissor parece ser a proteína AMA-1 (SKWARCZYNSKI et al., 2020) pois por ser expressa tanto em esporozoítos, quanto em merozoítos favorece proteção cruzada entre estágios (SPRING et al., 2009). Os resultados com AMA-1 mostram níveis de proteção razoáveis em estudos utilizando modelos murinos. Anticorpos produzidos frente a imunização com partículas virais contendo a proteína levaram a 95% de inibição do desenvolvimento do parasito *in vitro* (MUELLER et al., 2003).

Dentre as vacinas de subunidade direcionadas ao estágio pré-eritrocítico, a que se encontra em estágio mais avançado de desenvolvimento é a RTS,S/AS (Mosquirix™), desenvolvida pela GlaxoSmithKline Biologicals S.A. Essa vacina teve sua fase 3 de ensaio clínico finalizada em 2014, tendo sido administrada em mais de 15 000 crianças na região africana. A RTS,S/AS é produzida a partir de proteína recombinante circunsporozoíta de *P. falciparum*, fundida ao antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) e associada ao adjuvante da família AS01 (COHEN et al., 2010). Os estudos mostram que a proteção conferida por essa vacina se deve principalmente a ação de anticorpos e linfócitos T helper. A resposta imune humoral e celular iniciada pela RTS,S/AS é direcionada às proteínas CSP presentes na superfície dos esporozoítos, que conhecidamente são alvos de anticorpos e levam a diminuição de sua motilidade e infectividade (KESTER et al., 2009).

Tratando-se das taxas de proteção, a RTS,S/AS alcança em média 28% de eficácia contra episódios de malária grave após a administração de 3 doses da vacina, mas esse percentual aumenta para 35% quando uma quarta dose é administrada aos 20 meses de idade. Contudo, ao longo do tempo é observada uma

redução nessas taxas de maneira que após quatro anos os níveis de proteção são de cerca de 2,5% (OLOTU et al., 2016). Dentre as crianças vacinadas ocorre também uma variação na eficácia da vacina de acordo com a idade dos indivíduos: contando com 4 doses administradas, crianças com idade entre 5 – 17 meses de idade no início do esquema vacinal apresentaram em média cerca de 36% de proteção, enquanto cerca de 26% daquelas com 6 a 12 semanas de vida no início da vacinação apresentavam proteção em relação ao agravamento da doença. Por outro lado, crianças da mesma idade que receberam somente 3 doses do imunizante apresentaram proteção média de cerca de 18% (RTS,S CLINICAL TRIALS PARTNERSHIP, 2015). Já 50% dos adultos imunizados com RTS,S/AS a foram protegidos conta a aquisição da doença após desafio controlado com esporozoítos (KESTER et al., 2009).

Atualmente, a RTS,S/AS encontra-se em fase de implementação de estudo piloto no Quênia, no Malawi e em Gana. Esse estudo, realizado em conjunto com os ministérios da saúde dos respectivos países, tem a finalidade de estabelecer um programa de implementação de vacina contra a malária e aprimorar sua viabilidade em favor da comunidade (VAN DEN BERG et al., 2019).

Embora a RTS,S/AS seja a vacina antimalárica mais avançada em termos de desenvolvimento, os resultados obtidos quanto a sua eficácia claramente demonstram a necessidade da continuidade das pesquisas focadas em uma vacina.

1.6 A importância do modelo murino para o estudo da malária grave: uma ênfase na malária cerebral

Ao longo dos anos, muito tem-se discutido sobre a relevância de modelos experimentais no estudo da MC humana. Parte dessa discussão deve-se às diferenças nos mecanismos que norteiam o desenvolvimento da MC entre seres humanos e roedores. Por exemplo, enquanto a adesão de eritrócitos infectados ao endotélio de vasos sanguíneos cerebrais parece ser um dos principais fatores desencadeadores de MC em humanos, em roedores esse quadro é principalmente mediado por leucócitos e plaquetas; embora também ocorra adesão de hemácias

parasitadas nesse sítio (LOU et al, 2001; WHITE et al., 2010; CRAIG et al., 2012). Além disso, como a proteína chave nos processos de adesão entre endotélio-hemácia parasitada está ausente em *P. berghei* ANKA, discute-se que a presença dessas células nos capilares venosos cerebrais de camundongos deve-se não a uma interação parasito-hospedeiro, mas a um processo mecânico de acúmulo e aprisionamento celular (EL-ASSAAD et al, 2013).

Apesar das diferenças, muitos outros fatores aproximam a patogênese da MC murina da humana (TABELA 2). O emprego de camundongos das linhagens C57BL/6 e CBA no estudo da MC experimental fornece padrões bem estabelecidos de desenvolvimento da síndrome, como a presença de ataxia e sinais de comprometimento neurológico entre os 6º e 10º dias após a infecção com *Plasmodium berghei* ANKA, apresentando baixos níveis de parasitemia no momento do óbito (ENGWERDA 2005, DE SOUZA AND RILEY, 2002).

Além dos sinais clínicos condizentes com o quadro de MC, existem outros fatores que aproximam a patogênese da MC humana e da MC experimental, como a densidade parasitária apresentada em ambas as espécies, como risco de agravamento cerebral (DONDORP et al., 2005; BAPTISTA et al., 2010), a expressão exacerbada de ICAM-1, VCAM-1 e P-selectina no endotélio de animais e seres humanos que apresentam quadro de MC (revisto por SCHOFIELD e GRAU, 2005; revisto por GOOD et al. 2005), ainda, a resposta imunológica iniciada e sustentada pela MC humana e experimental é muito semelhante no sentido de que ocorre um desequilíbrio entre as respostas de citocinas anti e pró-inflamatórias frente a infecção malárica, gerando aumento da inflamação local e consequente desenvolvimento da síndrome (DE SOUZA AND RILEY, 2002; revisto por GOOD et al. 2005).

Embora a infecção de camundongos com *P. berghei* ANKA não reproduza todos os detalhes da MC humana, esse modelo ainda fornece, sob o ponto de vista ético, a melhor oportunidade para aprofundamento do estudo dos fatores patofisiológicos que não podem ser investigados *post mortem* (DE SOUZA et al., 2009). Além das questões éticas, os modelos murinos têm se mostrado uma importante fonte de estudos dos mecanismos de desenvolvimento da MC, devido a seu baixo custo de manutenção (SHIKANI et al., 2012).

Embora as características patofisiológicas do início do desenvolvimento da MC experimental não espelhem completamente o que ocorre na MC humana, os eventos subsequentes assemelham-se entre si, tornando a utilização de modelos

murinos uma importante ferramenta para melhor compreensão do que ocorre na síndrome humana, provendo conhecimento para a elucidação e diminuição da morbidade e mortalidade causadas pela doença.

Tabela 1 Comparação das características da malária cerebral humana e da malária cerebral experimental em modelo murino de infecção com *P. berghei*. Extraído e adaptado de Torre et al., 2018

Parâmetros	MC Humana	MC Experimental
Físicos e comportamentais		
Convulsão, paralisia,	+	+
Febre	+	-
Hipotermia	-	+
Histopatologia cérebro		
Mudanças nos astrócitos e micróglia	+	+
Sequestro de eritrócitos parasitados	+	+
Sequestro de leucócitos	+	+
Sequestro de plaquetas	+*	+
Protusões tipo Knob nos eritrócitos	+	-
Hemorragia parenquimatosa	+	+
Dano neuronal	+	+
Edema	+	+
Imunológicos		
Expressão citocinas pró-inflamatórias	+	+
Alta expressão de MHC classe I e II	+	+
Aumento de moléculas de adesão celular	ICAM-1, VCAM-1, TSP, E-selectina, ácido hialurônico, CSA	ICAM-1, VCAM-1
Bioquímicas		
Aumento de lactato	+	+
Aumento de metabólitos da via da quinurenina	+	+

*Presente em crianças com MC da África Subsaariana, mas não reportado em adultos

2 JUSTIFICATIVA

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

O uso de parasitos vivos, porém atenuados ou modificados geneticamente, vêm sendo testados com o intuito de induzir imunidade contra estágios pré-eritrocíticos e sanguíneos dos plasmódios (BELNOUE et al., 2004; GERALD et al., 2011; INOUE et al., 2012). Dentre as vantagens dessa metodologia em relação às vacinas recombinantes de subunidades está a indução de resposta imune direcionada a múltiplos antígenos dos parasitos (GOOD 2011; INOUE et al, 2012). Nesse contexto, estudos desenvolvidos com os plasmódios de roedores têm sido fundamentais para o entendimento de fatores associados à proteção, sobretudo quando há envolvimento de órgãos vitais tais como cérebro e pulmões. No entanto, apesar da vasta literatura relacionada à indução de imunidade em modelos experimentais, nenhum estudo tem averiguado o papel da imunidade heteróloga na proteção contra quadros graves de malária, sobretudo a MC. Em sua grande maioria, os estudos são realizados com cepas de parasitos não indutoras de MC (por exemplo, *P. yoelii, P. chabaudi*), sendo a proteção investigada somente em relação à inibição do desenvolvimento do parasito no sangue circulante. Além disso, nada se sabe sobre o impacto dessa exposição em infecções posteriores com parasitos altamente virulentos. Em crianças africanas, a ocorrência de malária grave parece não ser reflexo da ausência de infecções prévias (ERUNKULU et al., 1992). Mesmo assim, no contexto do desenvolvimento natural ou de indução de imunidade, sabe-se que em áreas endêmicas geralmente circulam diferentes espécies e cepas de parasitos com distintos graus de virulência (GUERRA et al., 2006) e que com a globalização a introdução de uma nova espécie/cepa pode

alterar a médio prazo o perfil de virulência das cepas preexistentes (MAYXAY et al., 2004).

Considerando-se, portanto, a possibilidade de indução de imunidade por meio de injeção intraperitoneal de parasitos de fase sanguínea (PINZON-CHARRY et al., 2010) e considerando o modelo murino uma alternativa para o estudo da MC, o objetivo deste trabalho foi avaliar o papel de exposições prévias de camundongos C57BL/6 a parasitos vivos de *P. berghei* NK65 no desenvolvimento de MC por *P. berghei* ANKA.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar em modelo murino se a exposição prévia a parasitos de baixa virulência é capaz de induzir proteção contra o desenvolvimento de MC.

3.2 Específicos

- Estabelecer a concentração ideal do inóculo de *Plasmodium berghei* ANKA capaz de causar MC em animais C57BL/6 provenientes do Biotério da Universidade Federal de Juiz de Fora e mantidos no Núcleo de Pesquisas em Parasitologia do ICB/UFJF;
- Avaliar se animais previamente expostos a infecção malárica por *P. berghei* NK65 são menos sensíveis ao desenvolvimento da MC causada por *P. berghei* ANKA. Para tal, serão analisados conjuntamente os parâmetros: perfil clínico, taxa de sobrevivência; densidade parasitária e rompimento da barreira hematoencefálica;
- Determinar os níveis de anticorpos IgG parasito-específicos (isótipos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) associando-os com presença ou ausência de MC;
- Avaliar por meio de análise histológica a ocorrência de lesões no tecido cerebral de animais desafiados com *P. berghei* ANKA, pré-expostos ou não a parasito homólogo ou heterólogo, traçando associação com os níveis de anticorpos circulantes e mediadores inflamatórios (IFN-γ, IL-10 e TNF-α) determinados *in situ*;
- Avaliar se a exposição prévia aos parasitos da malária influencia o índice esplênico;
- Determinar fenotipicamente a frequência de linfócitos B e linfócitos T CD4+ e T CD8+, no baço de animais associando-os ao desenvolvimento ou não de MC;
- Investigar por meio de imunohistoquímica a presença de linfócitos B e linfócitos T CD4+ e T CD8+ no cérebro de animais associando-os com desenvolvimento ou não MC;

- Investigar a persistência da imunidade considerando-se o período de 3 e 6 meses decorridos da última exposição aos parasitos.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

O presente estudo utilizou camundongos C57BL/6, fêmeas com 6 a 8 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério do Centro de Biologia de Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os animais foram mantidos em gaiolas acondicionadas em estante ventilada, sendo fornecidas água e ração *ad libitum*. O estudo contou com aprovação do Comitê de Ética em Experimentação animal (Protocolos Nº 27/2017).

4.2 Padronização do inóculo de *P. berghei* ANKA

Considerando-se a literatura especializada, sabe-se que a concentração de parasitos *P. berghei* ANKA utilizada para indução de MC em camundongos é variável (REST, 1982; LACKNER et al., 2006; FRANKE-FAYARD et al., 2005; LOVEGROVE at el., 2008, BASIR et al., 2012). Assim, a fim de se estabelecer a concentração ideal do inóculo para o desenvolvimento da MC em animais C57BL/6 provenientes da UFJF e mantidos em nosso laboratório foram utilizados para infecção 10^5, 10^6 e 5 x 10^6 eritrócitos parasitados com *P. berghei* ANKA. Os animais foram acompanhados diariamente a partir do 4º dia após a infecção para delineamento das curvas de escore clínico, parasitemia e sobrevivência.

4.3 Exposição padronizada de camundongos C57BL/6 a parasitos vivos de fase sanguínea de *P. berghei*

Nesse estudo a exposição dos animais foi realizada utilizando-se parasitos vivos de *P. berghei* (cepas ANKA ou NK65) seguida de tratamento com antimalárico.

4.3.1 Animais repique

Amostras criopreservadas de *P. berghei* (cepas ANKA ou NK65), contendo 5 x 10^7 eritrócitos infectados/mL, foram descongeladas em temperatura ambiente e posteriormente inoculadas via intraperitoneal (i.p.) em camundongos C57BL/6 (200µL/animal). A parasitemia sanguínea foi monitorada diariamente, através de esfregaços confeccionados a partir de 2µL de sangue obtido da veia caudal, até atingir taxas entre 5 e 15%. Os animais foram, então, anestesiados com solução fisiológica de cloreto de sódio contendo Xilazina 1% (5mg/kg) e Quetamina 5% (90mg/kg), procedendo-se a exsanguinação por meio de punção cardíaca. Em seguida, a confirmação do óbito foi realizada por meio de deslocamento cervical. O sangue coletado foi diluído em Tampão fosfato-salino (PBS), seguindo-se dois ciclos de centrifugação a 300g, por 5 minutos. Após a retirada do sobrenadante, o sedimento de hemácias foi ressuspendido para 1mL de PBS e o número total de hemácias na suspensão foi estimado, por meio de contagem em Câmara de Neubauer, após diluição de 1000x. Considerando-se o número de células e a parasitemia, uma nova diluição foi realizada de forma a se obter a concentração de 10^3 eritrócitos parasitados para cada 100µL de PBS; volume que foi inoculado via intraperitoneal (i.p.) em cada animal experimental nas exposições prévias.

4.3.2 Grupos experimentais e procedimento de exposição prévia.

Foram definidos 7 grupos experimentais (Quadro 1), cada um composto por 5 a 12 animais agrupados aleatoriamente. Foram realizados 3 experimentos independentes, a fim de investigarmos parâmetros associados ao desenvolvimento de imunidade no período de 30, 90 e 180 dias após exposição prévia.

As exposições aos parasitos de cada grupo experimental seguiram o esquema descrito no quadro 1, com o desafio acontecendo 30, 90 e 180 dias após a última exposição prévia.

Quadro 1 Descrição dos grupos experimentais utilizados no estudo.

Grupo	Descrição do grupo	1ª exposição	2ª exposição	Desafio
1	Controle	Sem exposição prévia		Não desafiado
2	Controle	Sem exposição prévia		*P. berghei* ANKA
3	Controle	Sem exposição prévia		*P. berghei* NK65
4	Desafio homólogo	*P. berghei* ANKA	X	*P. berghei* ANKA
5	Desafio homólogo	*P. berghei* ANKA	*P. berghei* ANKA	*P. berghei* ANKA
6	Desafio heterólogo	*P. berghei* NK65	X	*P. berghei* ANKA
7	Desafio heterólogo	*P. berghei* NK65	*P. berghei* NK65	*P. berghei* ANKA

X- Sem exposição

As exposições foram realizadas inoculando-se 10^3 hemácias parasitadas com *P. berghei* cepa ANKA, conforme descrito no item 4.3.2. Em camundongos C57BL/6 a linhagem ANKA é altamente virulenta, causando MC e óbito entre 6º a 11º dias após o desafio. O mesmo procedimento foi realizado com a cepa NK65 de *P. berghei*, linhagem que induz anemia grave devido à alta carga parasitária em camundongos C57BL/6, mas não MC.

No 3º dia após cada infecção foi iniciada a confecção de esfregaço sanguíneo a partir de sangue coletado da veia caudal a fim de confirmar a infecção. Quando as primeiras formas sanguíneas dos parasitos no sangue periférico foram detectadas, iniciou-se o tratamento de todos os animais do grupo utilizando-se 30mg/kg de mefloquina e 15mg/kg de artesunato diluídos em 100µL de água potável. O tratamento foi feito por meio de gavagem durante 5 dias consecutivos.

Após 30 dias, os animais pertencentes aos grupos 4 e 6 foram desafiados enquanto os do grupo **5** e **7** foram reexpostos aos parasitos, seguindo-se os mesmos procedimentos descritos anteriormente. Animais pertencentes aos grupos **2** e **3** foram somente desafiados com 10^5 hemácias infectadas com *P. berghei* ANKA (Grupo 2) e *P. berghei* NK65 (Grupo 3), sem qualquer exposição prévia aos parasitos.

Para avaliação da persistência da imunidade os animais foram expostos aos parasitos vivos seguindo-se o mesmo procedimento experimental. No entanto, o desafio somente foi realizado no dia 90 e 180 após a finalização do tratamento.

O desenho dos experimentos para realização dos processos de exposição e coleta de amostras está descrito na figura 6.

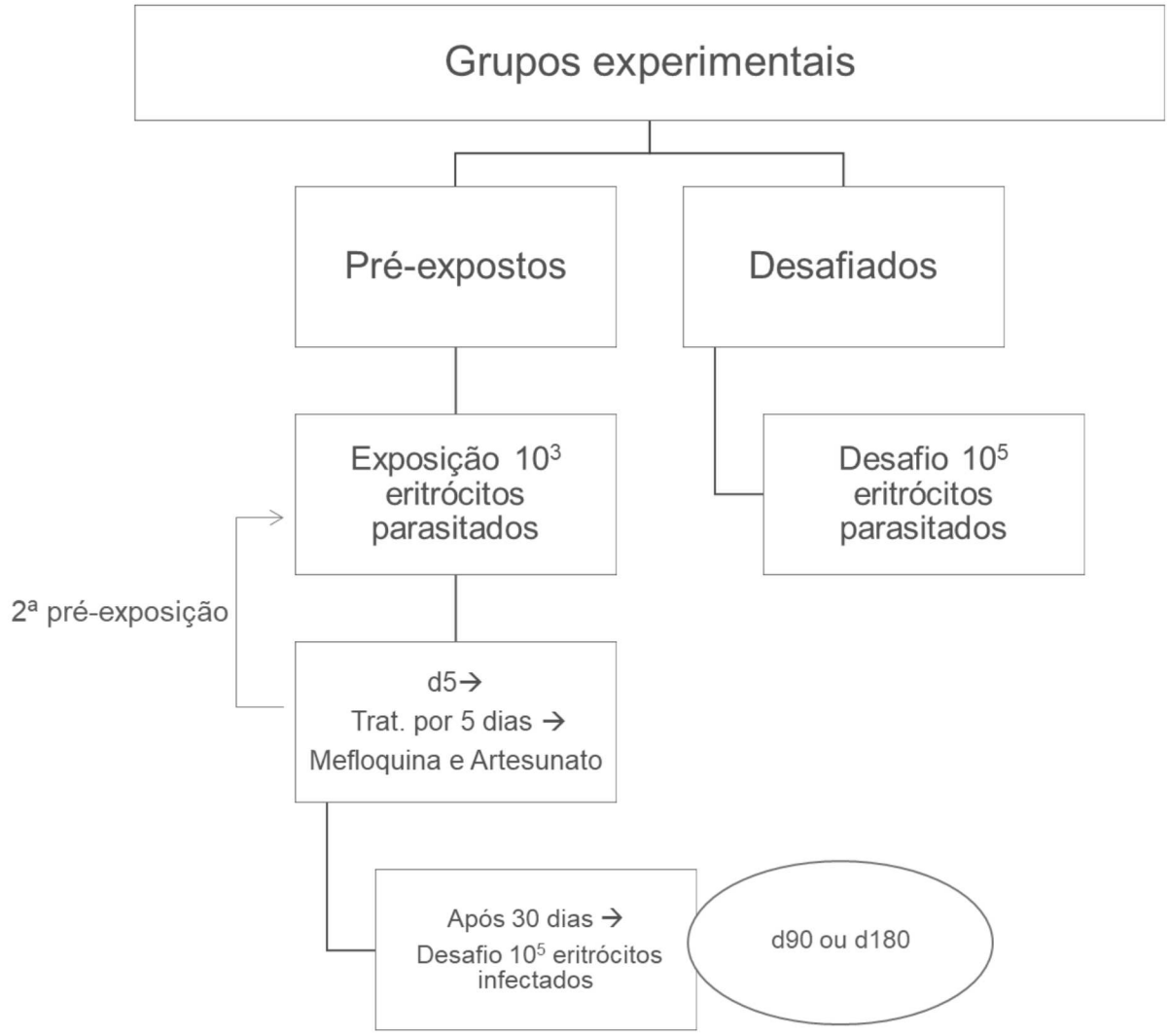


Figura 6 Esquematização dos processos de exposição aos parasitos.

d = dias após exposição; i.p. = intraperitoneal.

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

A determinação dos níveis plasmáticos de anticorpos IgG parasito-específicos nos animais foi realizada por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). Para tal, extrato proteico total oriundo de parasitos obtidos a partir de sangue de animais foi utilizado como antígeno. Para produção de antígeno de *P. berghei* NK65 utilizou-se animais cuja parasitemia estivesse entre 15-30% e entre 6-8% no caso de *P. berghei* ANKA. Após anestesia (solução fisiológica de NaCl contendo Xilasina 1% e Quetamina 5%), o sangue, coletado com anticoagulante por punção da veia braquial, foi centrifugado a 300g durante 10 minutos à temperatura ambiente. O

plasma foi desprezado e as hemácias lavadas usando-se meio RPMI1640 (GIBCO) incompleto. Após centrifugação a 300g durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 10 mL de PBS. Para a lise dos eritrócitos, foi adicionada à suspensão, 60 µL de saponina a 1%, seguindo-se incubação à temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse tempo, foram acrescentados 10 mL de PBS, seguindo-se centrifugação a 300g, durante 10 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 20mL de PBS, seguindo-se nova centrifugação a 300g, durante 10 minutos a 4ºC. Ao final de duas lavagens, o sobrenadante foi descartado sendo, então, acrescentados ao sedimento dois volumes de tampão TEM-Triton X-100 (1 mL de tris-base -1M - pH8.0); contendo 10 µL (2%) de inibidores de proteases (iodacetamida, Tosilina Clorometil Cetona-TLCK, Fluoreto de Fenilmetilsulfonil-PMSF e aprotinina; SIGMA – ALDRICH). Após 15 minutos de incubação em gelo, a amostra foi centrifugada a 300g, durante 10 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi coletado e a concentração proteica determinada pelo método de Lowry (LOWRY, 1951). O material foi distribuído em criotubos e criopreservado em nitrogênio líquido até o uso.

4.4.1 Detecção de anticorpos IgG totais

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

na diluição de 1:2500. Após incubação por 1h a 37ºC e lavagem, foram adicionados 50µl/poço de solução de TMB (Becton Dickinson - BD), seguindo-se nova incubação por 10 min em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A reação enzimática foi interrompida utilizando-se 30µL/poço de solução de ácido sulfúrico (1:20). A densidade ótica (DO) foi determinada em um leitor de placas de ELISA (Costar) em comprimento de onda de 450 nm (DO 450). Para determinação do *cut-off* foram utilizados soros provenientes de seis animais nunca expostos aos parasitos da malária, sendo o valor do mesmo definido como média das absorbâncias acrescidas de três desvios padrões.

4.4.2 Detecção de anticorpos das subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3

Os testes de ELISA para determinação das taxas de anticorpos IgG das subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 foram realizados de acordo com o protocolo previamente padronizado no laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Juiz de Fora. Para tal, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 1µg de antígeno bruto de *P. berghei* NK65 ou *P. berghei* ANKA diluídos 50µL de solução tampão carbonato, seguindo-se incubação a 4ºC por 12 a 16 horas. Então, as placas foram lavadas com PBS+Tween 0,05% e secas em papel absorvente. Em seguida, adicionou-se aos poços 150 µL de solução PBS+Tween 0,05% contendo 5% de caseína, seguindo-se incubação por 2h, a 37º C. Após 4 lavagens com PBS+Tween 0,05% e secagem em papel absorvente, 50µL de uma solução de PBS contendo 5% de caseína e amostras de soro na diluição de 1:100 foram adicionados aos poços seguindo-se nova incubação a 4º, por 12 a 16 horas. Ao final desse período, as placas foram lavadas 4 vezes e secas em papel absorvente, seguindo-se adição de 50µL de anticorpo anti-IgG1 ou anti-IgG2a biotinilado (1:8000), anti-IgG2b ou anti-IgG3 (1:6000) e incubação por 1h em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após incubação por 1h a 37ºC e lavagem, foram adicionados 50µL por poço de solução de TMB (Becton Dickinson - BD), seguindo-se nova incubação por 10 min em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A reação enzimática foi interrompida utilizando-se 50 µL/poço de solução de ácido sulfúrico a 2N. A densidade ótica (DO) foi determinada em um leitor de placas de ELISA (Costar) em comprimento de onda de 492nm (DO 492). Para determinação do *cut-off* foram utilizados soros de seis

animais nunca expostos aos parasitos da malária, sendo o valor do mesmo definido como média das absorbâncias acrescidas do valor de três vezes o desvio padrão.

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

4.5 Procedimentos experimentais após o desafio com PbA ou PbN

4.5.1 Curva de parasitemia

Para avaliar o efeito das exposições no desenvolvimento parasitário (seja por desafio homólogo ou heterólogo), a parasitemia dos animais foi acompanhada diariamente do 5º ao 10º dia após o desafio e, em dias alternados até o 20º dia, nos animais não eutanasiados. Para tal, a carga parasitária, de animais infectados por *P. berghei* NK65, foi aferida através da retirada de uma gota de sangue coletada a partir da veia caudal, seguindo-se esfregaço sanguíneo, fixação com metanol e coloração pelo método de Giemsa. Os níveis de parasitemia foram definidos pela porcentagem do número de hemácias parasitas em um total de 1000 hemácias avaliadas, realizadas através de microscopia óptica.

Os níveis de parasitemia de camundongos infectados com P. berghei ANKA foram definidos pela porcentagem do número de hemácias contendo parasitos transfectados com proteína verde (GFP) em um total de 10 000 eventos durante a aquisição em citômetro de fluxo (FACSCANTO II). Para isso, 2µL de sangue da veia caudal foram coletados e misturados em 1mL de tampão de citometria (tampão fosfato a 10% de soro fetal bovino – GIBCO). A estratégia utilizada para análise da parasitemia está expressa na figura 7.

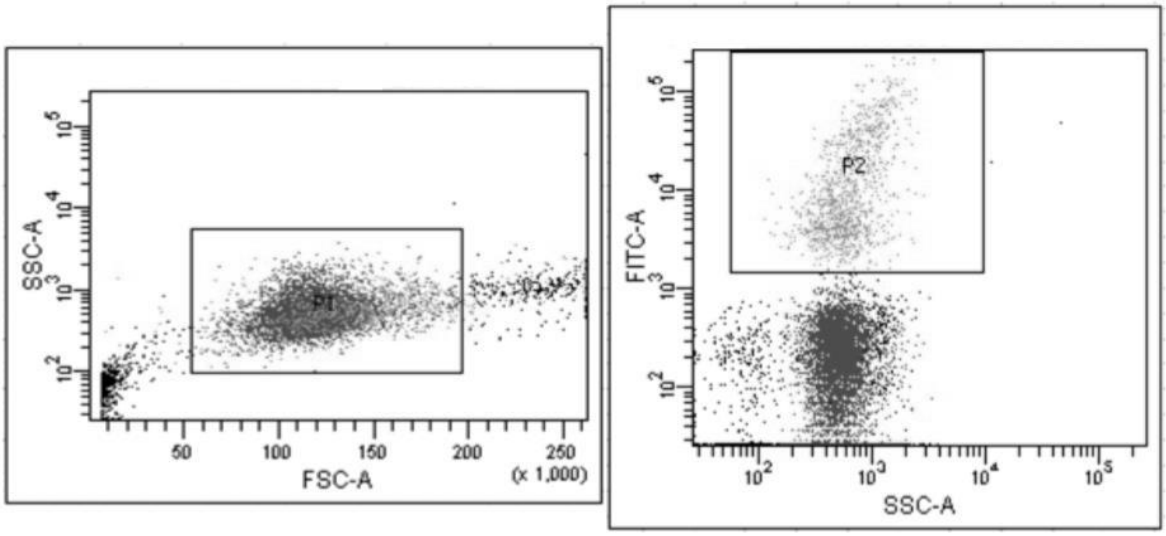


Figura 7 Estratégia de análise dos eritrócitos infectados por *P. berghei* ANKA marcado com GFP

P1= designa a população eritrócitos totais. P2= designa a população de eritrócitos que contêm parasitos marcados pela proteína verde fluorescente (GFP).

4.5.2 Curva de mortalidade

Para avaliar o efeito das exposições prévias ao parasito causador da malária na sobrevivência, após o desafio os animais foram observados diariamente até o 20º dia seguindo-se as seguintes recomendações: 1) avaliação a cada 24 horas se na ausência de sinais neurológicos; 2) avaliação em intervalos de tempo inferior a 24 horas podendo alcançar intervalos de até duas horas entre as observações a depender do escore clínico (item 4.5.3).

4.5.3 Escore Clínico

Os danos neurológicos causados pela MC experimental induzida nos camundongos C57BL/6 foram mensurados através de escore clínico descrito por Carrol e colaboradores (2010). Foram observados parâmetros relacionados à coordenação, comportamento exploratório, força e tônus muscular, reflexo de autopreservação e higiene (Tabela 2). Os animais foram pontuados com 0 a 2 pontos em cada parâmetro - foram atribuídos 2 pontos aos animais que desempenharam plenamente a atividade observada, 1 ponto aos animais que desempenharam parcialmente a atividade observada e 0 ponto para os animais que não realizaram a

atividade proposta- totalizando 20 pontos atribuídos aos animais sem nenhum dano neurológico.

Aos animais que foram atribuídos 20 pontos, procedeu-se a observação após 24 horas enquanto os animais que apresentavam escore clínico entre 16 e 19 pontos foram observados novamente dentro de 12 horas. Seguindo-se essa estratégia, os animais com escore clínico entre 11 e 15 pontos foram observados a cada 6 horas, quando o escore atribuído ficou entre 6 e 10 pontos, os animais foram avaliados em intervalos de 2 horas e animais com escore clínico menor ou igual a 5 pontos foram eutanasiados.

Além da análise do escore clínico, os animais infectados com *P. berghei* NK65 foram eutanasiados quando apresentaram níveis de parasitemia maiores que 50% e sinais clínicos relacionados a anemia, como fraqueza e letargia.

Tabela 2 Parâmetros avaliados no Escore Clínico

Coordenação
Marcha
Balanço/Equilíbrio
Comportamento exploratório
Desempenho Motor
Força e Tônus muscular
Posição do corpo
Força dos membros
Reflexo de autopreservação
Fuga de toque
Reflexo do pavilhão auricular
Reflexo plantar
Agressão
Higiene
Grooming

4.5.4 Eutanásia

Após o desafio experimental, os animais que apresentaram o escore clínico igual ou menor que 5 foram pesados e eutanasiados. Para isso, foram anestesiados, via i.p., com 100µL de solução fisiológica contendo Xilazina 1% (5mg/kg) e Quetamina 5% (90mg/kg), procedendo-se a perfusão cardíaca com 40mL de PBS. A seguir, o cérebro foi removido, sendo uma fração desse órgão fixada em paraformaldeído 4% para posterior desidratação, diafanização, inclusão e análise histológica. A outra

fração foi armazenada em soro fetal bovino (GIBCO), em freezer -80ºC para posterior extração e análise dos níveis de IL-10, IFN-ɣ e TNF-α por ELISA. O baço foi pesado em balança de precisão para correlação entre a massa do órgão e o perfil clínico desenvolvido. O órgão foi, então, armazenado em tubo de 50mL contendo 10mL de meio RPMI1640 (GIBCO) + 5% de soro fetal bovino (GIBCO) e mantido em recipiente contendo gelo até o processamento para marcação e aquisição dos esplenócitos.

4.5.5 Processamento do baço e marcação dos esplenócitos para análise fenotípica

Para isolamento dos esplenócitos, os baços foram macerados em cellstrainner (BD 70µm) adicionando-se 8mL de meio RPMI1640 (GIBCO) +5% de soro fetal bovino (GIBCO). O produto da maceração foi centrifugado por 5 minutos a 300g a 4ºC. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foi realizada nova lavagem. Foram, então, adicionados 5mL de solução tampão ACK para lise de eritrócitos, ao final de 4 minutos foram adicionados 10mL de meio RPMI1640 (GIBCO) +5% de soro fetal bovino (GIBCO) para neutralização da reação de lise. O macerado foi centrifugado por 5 minutos a 300g, a 4ºC, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ajustado para 1mL utilizando-se meio RPMI RPMI1640 (GIBCO) +5% de soro fetal bovino (GIBCO). As células viáveis foram contadas utilizando-se Câmara de Neubauer e solução contendo Azul de Tripan (Sigma-Aldrich) e, então, ajustadas para $5x10^6$ células/mL. Em uma placa de 96 poços, foram plaqueados 5 poços com 200µL da solução de células. Para cada animal eutanasiado foram plaqueados 5 poços, sendo um poço para células sem marcação os outros quatro poços para os painéis de anticorpos definidos previamente.

A placa foi centrifugada por 10 minutos a 240g a 4ºC, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 25µL de solução contendo os anticorpos marcados (Biolegend) com Isotiocianato de fluoresceína (FITC) anti-CD45 (1:1200), anti-CD4 (1:1200); marcados com ficoeritrina (PE) anti-CD21 (1:400), anti-CD8 (1:400); marcados com proteína piridina de clorofila (PerCP) anti-CD19 (1:400), anti-CD3 (1:200), marcados com aloficocianina (APC) anti-IgM (1:100). Após incubação de 1h a 4ºC e protegida da luz, a placa foi novamente centrifugada, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 150µL de paraformaldeído tamponado a 4% (SIGMA

– ALDRICH)(TABELA 3). Após a placa ser incubada por 20 minutos a 4ºC protegida da luz, procedeu-se nova centrifugação; o sobrenadante foi, então, descartado e as células marcadas foram ressuspendidas em 300µL de Tampão de citometria (PBS contendo 5% de soro fetal bovino (GIBCO) e 0,5% de azida de sódio – VETEC). Os esplenócitos foram adquiridos em FACS CANTOII (Becton Dickinson), na ordem de 100 000 eventos, utilizando o software *Cell Quest* e os dados foram analisados utilizando o software FlowJo versão 10.0. O número de células foi calculado levando-se em consideração a quantidade de células recuperadas no momento do processamento.

Tabela 3 Anticorpos utilizados na análise fenotípica dos esplenócitos dos animais experimentais, agrupados segundo os fluorocromos.

Fluorocromo	Clone
FITC	
CD45	30-F11
CD4	GK1.5
PE	
CD21	7E9
CD8	53-6.7
PerCP	
CD19	6D5
CD3	145-2C11
APC	
IgM	RMM-1

A estratégia de análise para a delimitação das populações celulares dos esplenócitos estão descritas na figura 4.

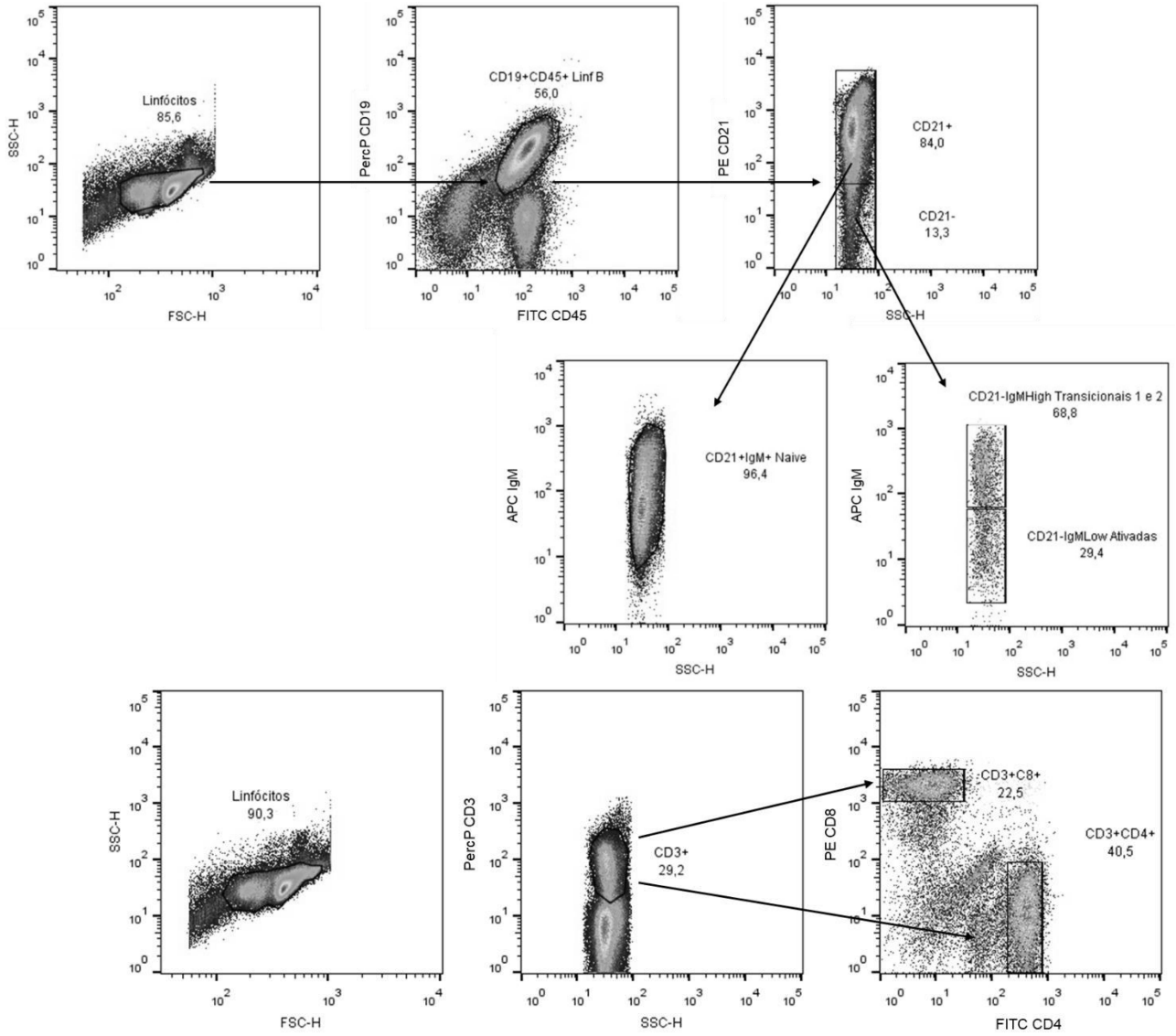


Figura 8 Estratégia de análise para marcação fenotípica esplenócitos

(A) Linfócitos B, células marcadas com anticorpos anti-CD19 (PerCP) e anti-CD45 (FITC), posteriormente anti-CD21(PE) e anti-IgM (APC); (B) Linfócitos T, células marcadas com anticorpos anti-CD3 (PerCP), posteriormente anti-CD4(FITC) e anti-CD8 (PE).

4.5.6 Análise histológica

Para investigar o impacto das exposições prévias no tecido nervoso foram feitos cortes histológicos a partir do cérebro de cada animal experimental. Nos animais que desenvolveram ou não MC, sejam expostos previamente ou não, foi investigada a ocorrência de adesão endotelial de hemácias parasitadas e de processo inflamatório (extravasamento de hemácia, infiltração linfocitária). Para isso, uma fração do cérebro

coletado foi fixado em solução de paraformaldeído a 4%, pH 7.2-7.4 por 24 h e posteriormente transferidos para uma solução álcool 70%. Então, os tecidos fixados foram acondicionados em cassetes histológicos e desidratados pela imersão em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90%, absoluto e 50% álcool/ 50% xilol), por 30 minutos em cada solução. A diafanização foi feita através da utilização de duas imersões em xilol por 20 minutos cada. Finalmente, o órgão foi impregnado e incluído em parafina. Cada bloco contendo o órgão foi submetido à microtomia e as lâminas foram submetidas à coloração com Hematoxilina-Eosina.

4.5.6.1 Coloração de Hematoxilina-eosina

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

4.5.6.2 Imunohistoquímica

Para avaliar a expressão de linfócitos T helper (CD4+), citotóxicos (CD8+) e linfócitos B (CD19+) no tecido cerebral dos animais imunizados, os cortes foram depositados sobre lâminas silanizadas. Os cortes foram então desparafinados em banhos de 1-2 minutos em xilol 100%, seguindo-se 6 banhos em etanol absoluto e,

finalmente 2 banhos em etanol 95%. Então, os cortes foram reidratados em 3 banhos de água destilada. Para recuperação antigênica, as lâminas foram imersas, e mantidas por 20 minutos, em recipiente contendo tampão citrato (pH 6.0), aquecido previamente a 95°C, seguindo-se resfriamento por 15 minutos em temperatura ambiente e lavagem em água destilada em agitação. Para o bloqueio da peroxidase endógena foram realizados dois banhos, de 15 minutos cada, em de solução de água destilada contendo 10% de peróxido de hidrogênio. Em seguida as lâminas foram lavadas 3 vezes em água destilada. As lâminas foram, então, lavadas em tampão TRIS Salino (TBS) (0,065g de TRIS, 8g de cloreto de sódio, 500µL PBS de TWEEN 20 diluídos em 1000mL de água destilada) e secas em papel absorvente. Foram acrescidos anticorpos monoclonais primários anti-CD4, Anti-CD8 ou anti-CD19 (1:100) (SANTA CRUZ Biotechnology), diluídos em tampão TBS. As lâminas foram mantidas em câmara umidificada por 24 horas, à 4°C. Seguiu-se lavagens das lâminas utilizando-se TBS/TWEEN20 e secagem das lâminas em papel absorvente, os cortes foram, então, incubados com anticorpo secundário biotinilado, diluído em tampão TBS/TWEEN20, por 1 hora, à temperatura ambiente. Após a incubação, as lâminas foram lavadas com tampão TBS/TWEEN20 e secas com papel absorvente. As lâminas foram incubadas com solução contendo estreptavidina-peroxidase por 30 minutos, à temperatura ambiente. A revelação foi feita a partir da incubação dos cortes utilizando diaminobendizina (DMB) e peróxido de hidrogênio. Procedeu-se a lavagem por 3 vezes em água corrente e contracoradas com hematoxilina de Harris por 30 segundos, quando foram, novamente, lavadas em água corrente. As lâminas foram montadas utilizando-se resina (Enthelan) e lamínulas.

4.5.7 Extração de citocinas *in loco*

Para a extração de citocinas a partir de tecido cerebral foram preparados 100mL de solução de extração, contendo: NaCl 0,4M; tween 20 0,05%; albumina de soro bovino 0,5%; fluoreto de fenilmetilsufonila (PMSF) 0,1 mM; cloreto de benzetônio 0,1mM; EDTA 10 mM; 0,002% de aprotinina e água ultrapura ou destilada quantidade suficiente para (q.s.p.) 100mL. Para cada 100mg de tecido foram utilizados 1mL do tampão de extração, seguindo-se homogeneização e centrifugação a 300g por 10 minutos a 4ºC. O sobrenadante oriundo da centrifugação foi armazenado em freezer

-80ºC para posterior análise pelo método de ELISA. No momento do uso, as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 300g por 15 minutos para coleta do sobrenadante.

4.5.8 Detecção dos níveis de citocinas *in loco*

Ensaios de ELISA para determinação *in loco* dos níveis de IFN-γ, TNF-α e IL-10 foram realizados de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (Becton Dickson). Para tal, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100µl/poço de tampão de revestimento contendo os anticorpos de captura de cada citocina de interesse (IL-10 - 1:1000; TNF-α - 1:250; IFN-ɣ - 1:250), seguindo-se incubação a 4°C por 18 horas. Então, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem, secas em papel absorvente, bloqueadas com 200µl/poço de solução diluente e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Para determinar a concentração em pg/mL de cada citocina presente no homogenato, curvas padrões foram incluídas em cada placa nas diluições recomendadas pelo fabricante. As amostras foram, então, adicionadas às placas em duplicata (100µL/poço), seguindo-se incubação a 4ºC por 18 horas. Após esse período, as placas foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem e secas em papel absorvente. Então, 100µL de solução de solução diluente contendo os anticorpos de detecção foram adicionados a cada poço, seguindo-se incubação por 1 hora a temperatura ambiente. Após lavagem por 5 vezes com tampão de lavagem, 100µL de Avidin-HRP diluída em solução diluente foram acrescentados a cada poço, seguindo-se nova incubação por 30 minutos. Finalmente, após lavagem das placas (5 – 7 vezes) foram adicionados 100µL de solução substrato em cada poço, seguindo-se incubação por 15 minutos à temperatura ambiente. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 50µL de solução de parada em cada poço. A densidade ótica (DO) foi determinada em um leitor de placas de ELISA em comprimento de onda de 450nm (DO 450).

4.5.9 Avaliação da permeabilidade vascular da barreira hematoencefálica

Para demonstrar a alteração ou integridade da permeabilidade vascular de camundongos C57BL/6 pré-expostos aos parasitos e posteriormente infectados com

P. berghei ANKA, que apresentaram ou não sinais de danos neurológicos foram anestesiados, com solução via i.p., com 100µL de solução fisiológica contendo Xilazina 1% (5mg/kg) e Quetamina 5% (90 mg/kg), e então foram inoculados via intravenosa (i.v.) com 100µL de solução fisiológica de Azul de Evans a 1% (SIGMA – ALDRICH). Decorrida uma hora após a inoculação, os animais foram eutanasiados com dose anestésica aumentada e procedeu-se perfusão cardíaca com 10mL de PBS. Então, a pele da porção superior da cabeça foi retirada a fim de expor a calota craniana para análise macroscópica do espalhamento do corante. Posteriormente o cérebro foi retirado para análise. A intensidade de marcação do tecido pelo corante azul de Evans foi documentada tanto no cérebro envolto quanto livre da calota.

5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

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

6 RESULTADOS

6.1 Padronização da concentração de eritrócitos parasitados por PbA para indução de MC em camundongos C57BL/6

Visto que variadas concentrações de hemácias parasitadas por *P. berghei* ANKA (PbA) têm sido utilizadas para o estabelecimento do quadro de MC murina nós, inicialmente, avaliamos a influência de tais variações na dinâmica de desenvolvimento desse quadro. Para tal, com base na literatura (ONWUAMAH, AGOMO e ODEIGAH, 2010; PINZON-CHARRY et al., 2010) foram testados os inóculos de 10^5, 10^6 e 5 x 10^6 células parasitadas. A partir do 4º dia após a infecção, os animais foram avaliados diariamente, quanto ao perfil clínico, parasitemia e sobrevivência. Observou-se que independentemente da concentração de células parasitadas utilizadas, os animais infectados com PbA desenvolveram sinais clínicos sugestivos de MC entre o quinto e o sétimo dia após a infecção (FIGURA 9A). Entre os sinais clínicos mais evidentes destacaram-se o comprometimento do equilíbrio, da marcha, da movimentação, da higiene, dos reflexos auricular e plantar. Após o óbito, a presença de áreas hemorrágicas na calota craniana corroborou o desenvolvimento de MC (FIGURA 10). Em relação a sobrevida, houve diferença significativa no tempo de vida dos animais em função do inóculo (FIGURA 9C, $p<0,001$). Nesse caso, os animais que receberam 10^5 eritrócitos parasitados tiveram sobrevida ligeiramente superior aos inoculados com 10^6 ou 5 x 10^6 eritrócitos parasitados. No entanto, todos os animais morreram dentro do período esperado para o óbito decorrente de MC (FIGURA 9C).

Conforme esperado, na comparação entre os três grupos, a parasitemia média diária (FIGURA 9B) foi dependente do inóculo; no dia 6 após o desafio, as médias foram de 8%, 10,3% e 14,5% para os grupos que receberam 10^5, 10^6 e 5 x 10^6 eritrócitos parasitados, respectivamente

Devido a linearidade dos dados analisados conjuntamente, optou-se por dar continuidade aos experimentos utilizando o inóculo de 10^5 células parasitadas. Esse é o mesmo já utilizado por nosso grupo em estudos anteriores.

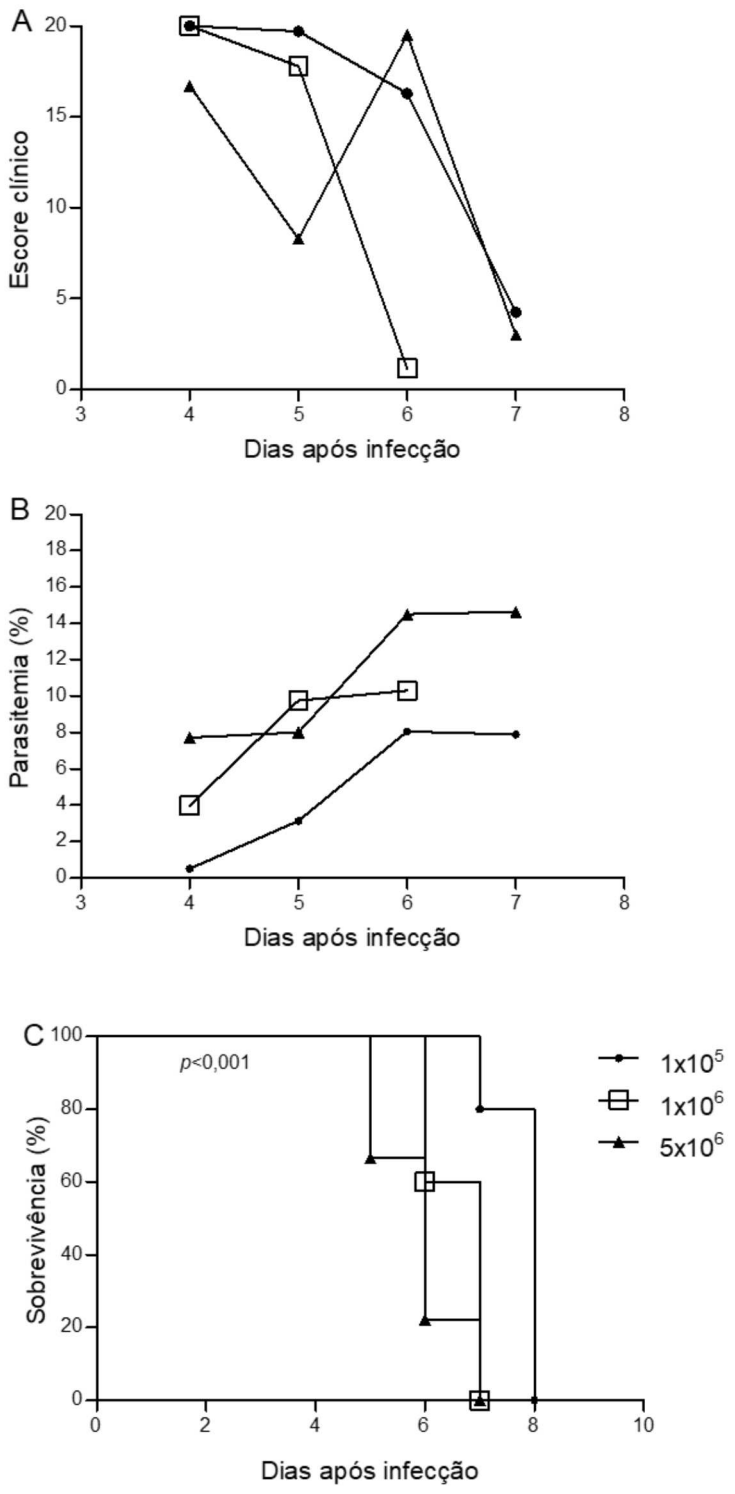


Figura 9 Avaliação de diferentes concentrações de hemácias parasitadas por PbA para indução de MC em camundongos C57BL/6.

(A) Escore Clínico; (B) Sobrevivência; (C) Parasitemia média diária (%). n = 10. Escore clínico e porcentagem de parasitemia: ANOVA de 1 via, pós-teste de Bonferroni, p <0,05. Percentual de sobrevivência: Teste do Qui-quadrado, p<0,001.

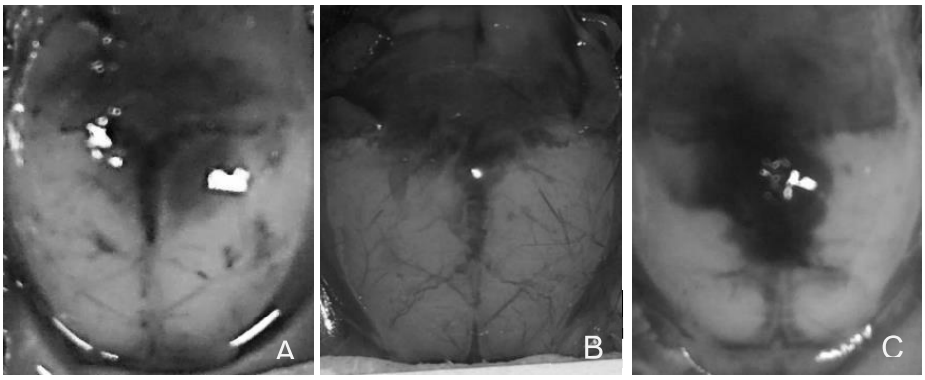


Figura 10 - Fotografias representativas da calota craniana de animais que receberam diferentes concentrações de inóculos.

Observe a grande extensão de áreas hemorrágicas para todas as concentrações de parasitos utilizados.

(A) 10^5 hemácias parasitadas; (B) 10^6 hemácias parasitadas; (C) 5 x 10^6 hemácias parasitadas.

6.2 Desenvolvimento de MC em animais desafiados com PBA após 30, 90 e 180 da exposição prévia a parasito homólogo e heterólogo

Para avaliar o papel da exposição prévia a parasitos vivos, de fase sanguínea, de PbA e PbN na proteção contra a MC induzida por PbA em camundongos C57BL/6 foram avaliados o perfil clínico, taxa de sobrevivência e parasitemia apresentados pelos animais experimentais.

Inicialmente, as infecções com PbA foram realizadas 30 dias após 1ª ou 2ª exposição ao parasito homólogo ou heterólogo. Os dados obtidos a partir do 4º dia do desafio experimental nos permitiram observar que 100% dos animais desafiados com PbA, porém sem qualquer exposição prévia a parasito homólogo ou heterólogo, sucumbiram ao óbito entre o 7º e o 10º dia da infecção, período considerado crítico para o desenvolvimento de para MC. Dentre os animais que foram previamente expostos 1 ou 2 vezes a PbA e que foram posteriormente desafiados com a cepa homóloga, 22% e 21% se mostraram protegidos da MC, respectivamente, permanecendo vivos até o final do seguimento (20º dia; FIGURA 11.A e 11A.3). Quando, porém, os animais foram expostos previamente 1 ou 2 x à infecção por PbN, a frequência de proteção contra a MC observada no 12º dia após desafio com PbA foi

de 43% e 54%, respectivamente (FIGURA 11 A.4). Ao final do seguimento, 37% e 41% dos animais, respectivamente, ainda permaneciam vivos.

A análise dos sinais clínicos e da parasitemia sanguínea nos animais que foram a óbito entre o 7º e o 10º dia, sugere, conforme esperado, que a morte foi decorrente de MC. Nesse caso, os animais se mostraram debilitados fisicamente, como estimado pela medida de escore clínico inferior a 5 pontos (FIGURA 12.A), e parasitemia média inferior a 6% ao longo dos dias (FIGURA 11 A.3, B.3, C.3). Por outro lado, animais previamente expostos, 1 ou 2x, a PbA ou PbN que resistiram ao período crítico de desenvolvimento de MC desenvolveram hiperparasitemia (pico de 38% e 40,5% para animais expostos previamente a 1 e 2x a PbA e 25% e 13,6%% para animais previamente expostos a PbN), sendo a anemia a principal causa dos óbitos ocorridos até o final do seguimento (FIGURA 11 A.3, A.4). Essa observação é reforçada pela análise do perfil clínico desses animais, o qual manteve-se superior a 13 pontos ao longo do acompanhamento.

Interessantemente, 10% dos animais expostos 2x a PbA, 6% dos animais expostos 1x a PbN e 26% dos animais expostos 2X a PbN apresentaram níveis de parasitemia abaixo de 1% desde início da infecção, tendo sido eutanasiados no 30º dia após o desafio (dados não mostrados).

Visto que a exposição prévia a *P. berghei* ANKA e NK65 mostrou-se capaz de induzir proteção contra o desenvolvimento de MC, a persistência dessa proteção foi avaliada desafiando-se animais C57BL/6 com PbA nos dias 90 e 180 após a última exposição ao parasito homólogo e heterólogo. Como observado nos gráficos 11B.1 e 11B.2, animais previamente expostos a PbA e PbN e desafiados 90 dias depois com PbA também foram protegidos contra o desenvolvimento de MC. Especificamente, os melhores resultados foram observados para animais que foram repetidamente expostos a infecção malárica. Nesse caso, 50% dos camundongos expostos 2x a PbA ultrapassaram o período crítico para doença permanecendo vivos até o 20º dia do seguimento. Esses animais, contudo, desenvolveram hiperparasitemia, com pico médio de 35% no 18º dia (FIGURA 11B.3). Contudo, dos animais expostos previamente 2X a PbN, 86% foram protegidos da MC, sendo que os 72% que permaneceram vivos até final do seguimento apresentaram baixa parasitemia sanguínea (parasitemia média = 0,2% no 20º dia) durante todo o período do acompanhamento (FIGURA 11B.4). Interessantemente, 14% dos animais pré-expostos 1x a PbA ou PbN também foram protegidos contra danos neurológicos

(FIGURA 12B) sendo a parasitemia média entre os dias 12 e 20 do seguimento de 5,8 % e 16,4%, respectivamente (FIGURA 11B.3 e 11B.4). O efeito positivo das exposições prévias na proteção contra a MC é refletido na análise do perfil clínico dos animais (FIGURA 12).

Enquanto os animais desafiados 30 e 90 dias após exposição prévia a infecção malárica apresentaram taxas de proteção contra a MC que variaram entre 14% a 85%, a depender da cepa de parasito utilizada e número de infecções prévias, essa proteção não ultrapassou 22% nos desafios de 180 dias (FIGURA 12C). Surpreendentemente, todos os animais que foram expostos 2x ao parasito homólogo ao utilizado no desafio experimental apresentaram sinais clínicos indicativos de MC sucumbindo ao óbito entre os dias 9 e 10 do seguimento (FIGURA 11C.1). Tais sinais incluíram dificuldade de coordenação, redução do comportamento exploratório, força e tônus muscular, perda de reflexo de autopreservação e de higiene. Todos os animais que desenvolveram MC, independentemente se pré-expostos ou não a infecção, apresentaram, ligeiramente antes do óbito, nítida debilidade clínica (escore clínico mensurado em < 5 pontos), mesmo que na presença de baixa parasitemia sanguínea (média de 3,9; no dia 10; FIGURA 11C.3 e 11C.4). Interessantemente, 76% (n=9) dos animais pré-expostos 2x a PbN apresentaram queda súbita do seu estado clínico entre o 7º e o 8º dia da infecção (FIGURA 13) ao passo que aqueles, que foram protegidos da MC (pré-expostos 1 ou 2 x a PbN), mantiveram-se bem clinicamente (escore clínico médio de 19 pontos), sendo capazes de controlar os níveis de parasitemia sanguínea por todo o período do seguimento.

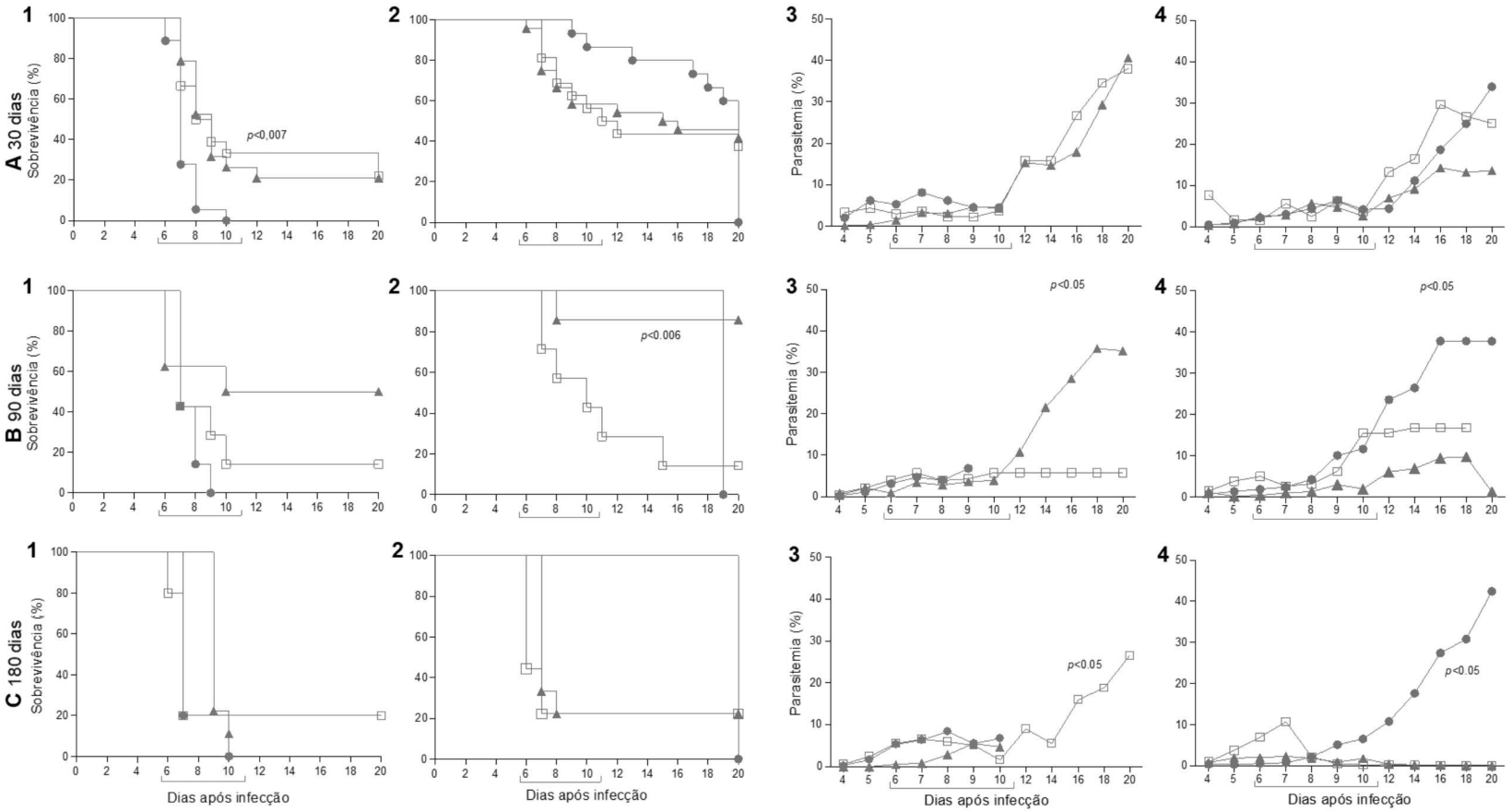


Figura 11 Efeito da exposição prévia de camundongos C57BL/6 a *P. berghei* ANKA e *P. berghei* NK65 na proteção contra a MC, considerando-se desafio experimental nos dias 30, 90 e 180.

(A1) Sobrevivência Desafio homólogo dia 30; (A2) Sobrevivência Desafio heterólogo dia 30; (A3) Parasitemia Desafio homólogo dia 30; (A4) Parasitemia Desafio heterólogo dia 30; (B1) Sobrevivência Desafio homólogo dia 90; (B2) Sobrevivência Desafio heterólogo dia 90; (B3) Parasitemia Desafio homólogo dia 90; (B4) Parasitemia Desafio heterólogo dia 90; (C1) Sobrevivência Desafio homólogo dia 180; (C2) Sobrevivência Desafio heterólogo dia 90; (C3) Parasitemia Desafio homólogo dia 180; (C4) Parasitemia Desafio heterólogo dia 180. Grupos de Desafio dia 30: Desafio PbA e 1 exp PbA, n=18; 2 exp PbA, n=19; Desafio PbN, n=11; 1 exp PbN, n=17; 2 exp PbN= n=24. Grupos de Desafio 90 dias: Desafio PbA e 1 exp PbA, 2 exp PbA, n=10; Desafio PbN, 1 exp PbN, 2 exp PbN= n=9. Grupos de Desafio 180 dias: Desafio PbA e 1 exp PbA, 2 exp PbA, n=10; Desafio PbN, 1 exp PbN, 2 exp PbN= n=9.

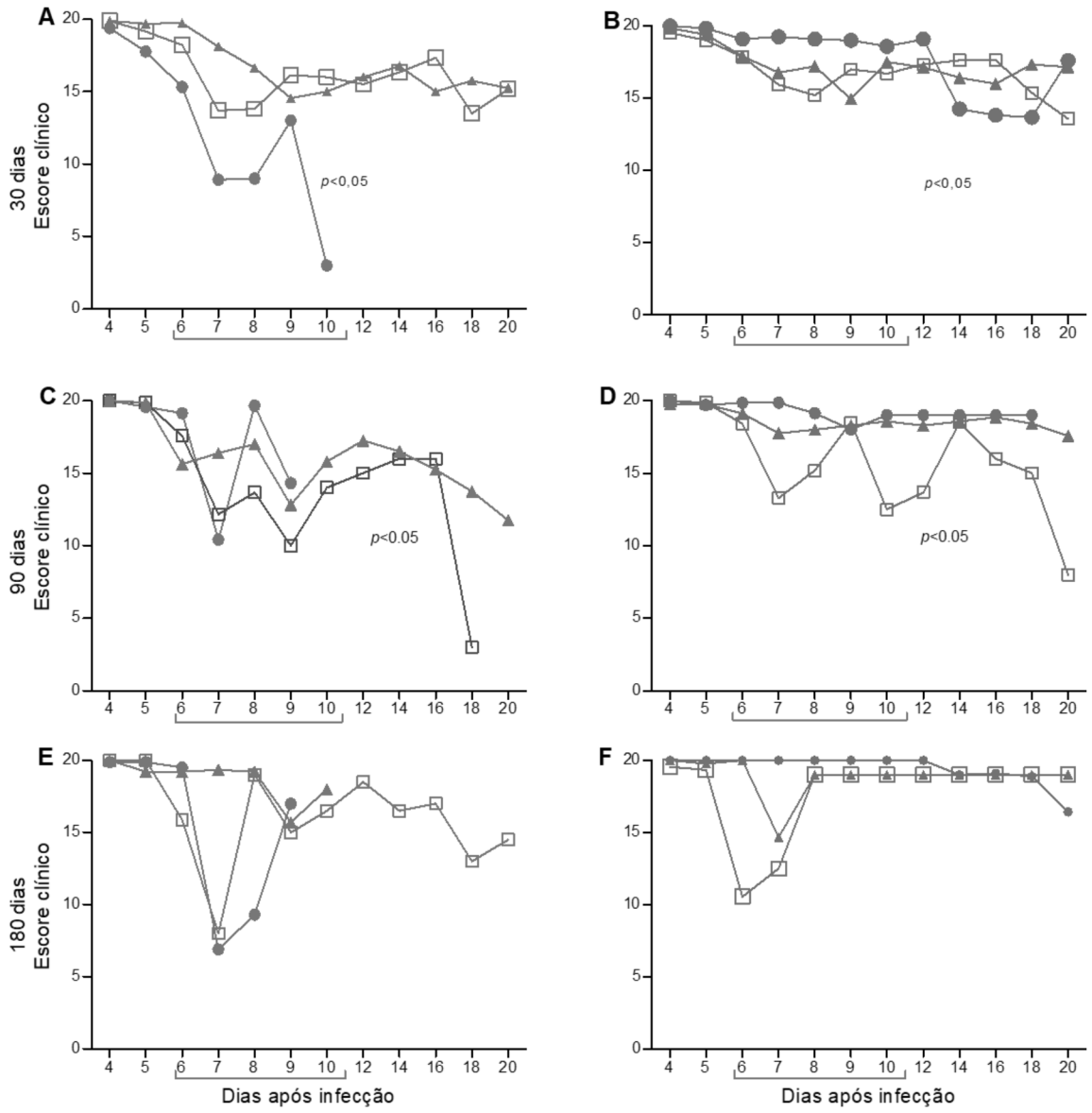


Figura 12 Efeito da exposição prévia de camundongos C57BL/6 a *P. berghei* ANKA ou *P. berghei* NK65 nos sinais clínicos de MC, considerando-se desafio experimental nos dias 30, 90 e 180.

(A)Desafio homólogo dia 30, (B) Desafio heterólogo dia 30; (C) Desafio homólogo dia 90 (D) Desafio heterólogo dia 90 (E) Desafio homólogo dia 180 (F) Desafio heterólogo dia 180. Grupos de Desafio 30 dias: Desafio Pba e 1 exp PbA, n=18; 2 exp PbA, n=19; Desafio PbN, n=11; 1 exp PbN, n=17; 2 exp PbN= n=24. Grupos de Desafio 90 dias: Desafio Pba ,1 exp PbA, 2 exp PbA, Desf PbN, 1 exp PbN, 2 exp PbN n=7; 2 exp PbA n=8. Grupos de Desafio 180 dias: Desafio Pba e 1 exp PbA, 2 exp PbA, n=10; Desafio PbN, 1 exp PbN, 2 exp PbN =9.

● → Desafio PbA □ →1 exp PbA ▲→2 exp PbA
● → Desafio PbN □ →1 exp PbN ▲→2 exp PbN

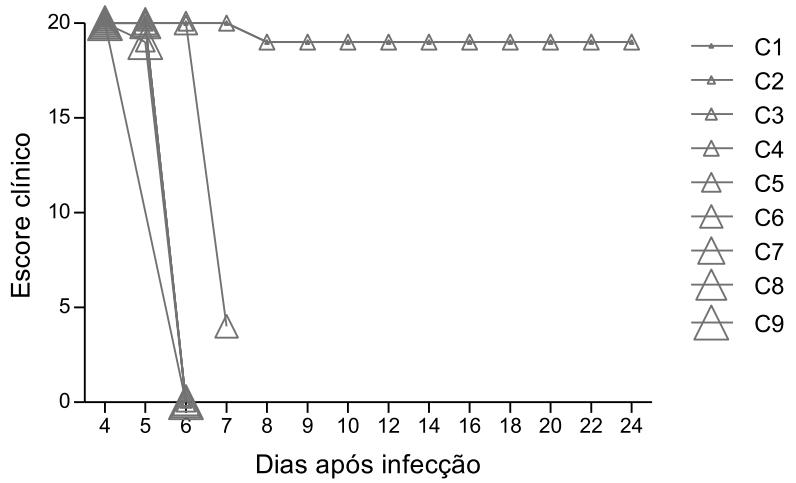


Figura 13 Perfil clínico de camundongos C57BL/6 pré-expostos 2 x a infecção malárica por *P. berghei* NK65 e desafiados no dia 180 com *P. berghei ANKA* 180. n=9

Resumidamente, o perfil clínico, frequência média de parasitemia e taxas de sobrevivência observado ao final do seguimento e em razão do número de exposição prévia aos parasitos da malária são apresentados na tabela 3.

Tabela 4 Perfil clínico, frequência média de parasitemia e taxas de sobrevivência observado ao final do seguimento e em razão do número de exposição prévia aos parasitos da malária

Parâmetros (Média)	30 dias				90 dias				180 dias			
	PbA		PbN		PbA		PbN		PbA		PbN	
	1x	2x	1x	2x	1x	2x	1x	2x	1x	2x	1x	2x
Escore clínico	17	18	17	17	15	16	15	19	16	19	18	19
Parasitemia (%)	8,7	5,5	9,2	5,1	3,8	10,3	5,9	2,7	10,7	0,7	1,5	0,9
Sobrevivência (%)	22	21	37	41	14	50	14	86	20	10	22	22

6.3 Análise macroscópica da calota craniana e microscópica do tecido encefálico dos animais que desenvolveram ou não MC após exposição prévia a parasito homólogo ou heterólogo

A figura 14 é composta por imagens representativas da calota craniana dos animais desafiados com PbA nos dias 30, 90 e 180 após última infecção malárica experimental, segundo o desfecho clínico final de MC ou MCØ (ou seja, que não

desenvolveram MC). Conforme esperado, extensas áreas de hemorragia foram observadas nos animais com MC, independentemente do momento do desafio, enquanto animais MC∅ apresentaram a calota craniana com aspecto similar ao dos animais não infectados (Controle) ou desafiados com PbN, cepa que não induz MC. Então, para comprovar que essas hemorragias nos animais MC estavam associadas ao rompimento da barreira hematoencefálica e que, ao contrário, ela permanecia integra nos animais MC∅, o corante azul de Evans foi injetado i.v. em animais apresentando ou não sinais de danos neurológicos. Como visualizado na figura 16, os cérebros de camundongos MC exibiram coloração azul distribuída no tecido, indicativa de vazamento vascular, o que não foi observado nos cérebros de camundongos MC∅ (Figura 14).

Já a análise histológica do encéfalo, independentemente do momento em que se realizou o desafio experimental, demonstrou que a presença de vasos sanguíneos congestos devido ao acúmulo de eritrócitos e de células inflamatórias em sua luz e as hemorragias teciduais foram frequentes em animais MC, porém não ocorreram em animais MC∅. (FIGURA 16).

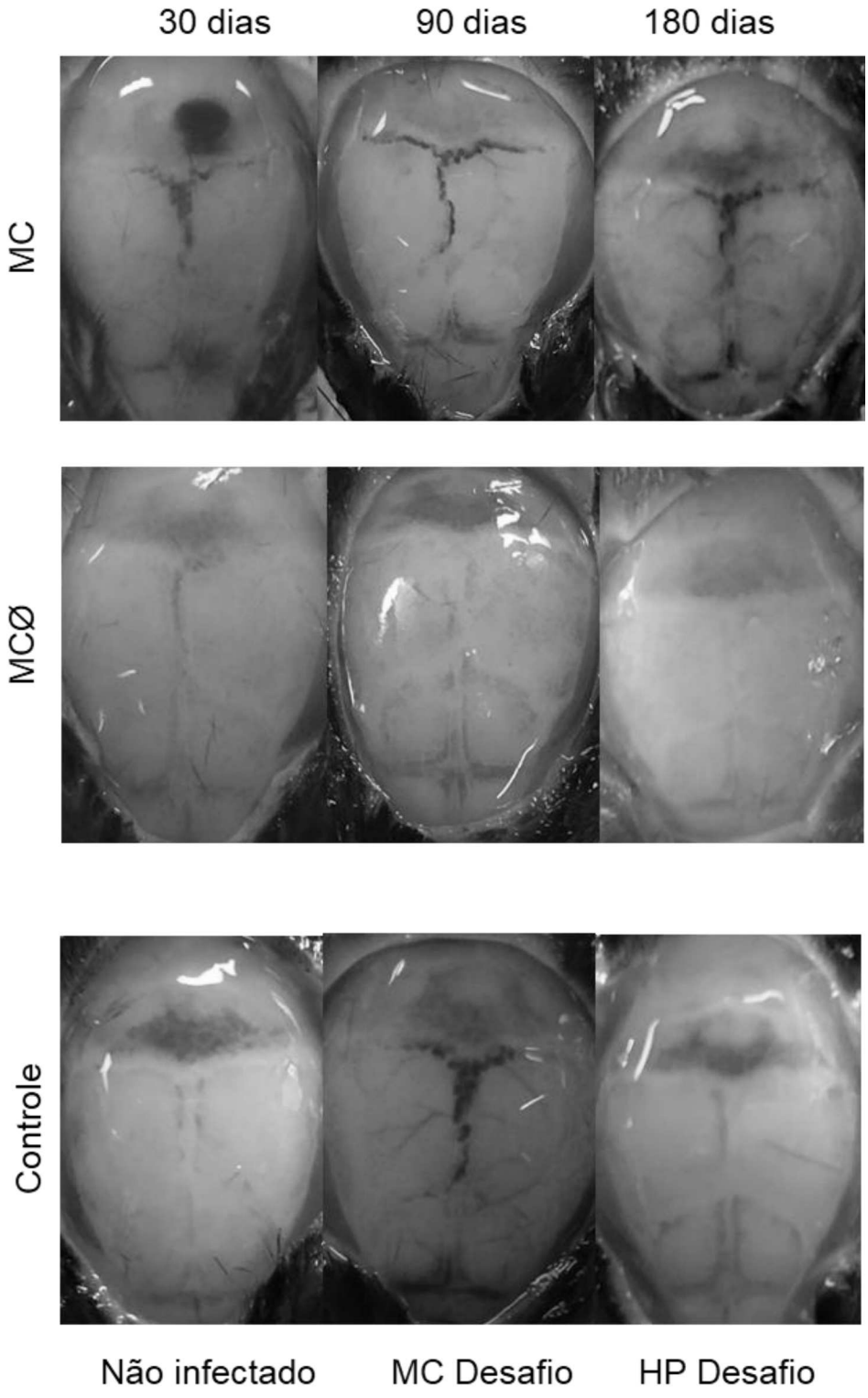


Figura 14 Fotografias representativas da calota craniana dos animais, considerando-se perfil clínico e desafio experimental nos dias 30, 90 e 180.

Controle = não infectado; MCØ = designa os grupos que foram à óbito, mas não em decorrência de malária cerebral; HP = designa os grupos que foram à óbito em decorrência do desenvolvimento de hiperparasitemia; MC = designa os grupos que foram à óbito em decorrência do desenvolvimento de malária cerebral; 30 dias = desafio no dia 30 após última exposição; 90 dias = desafio do dia 90 após última exposição; 180 dias = desafio no dia 180 após última exposição.

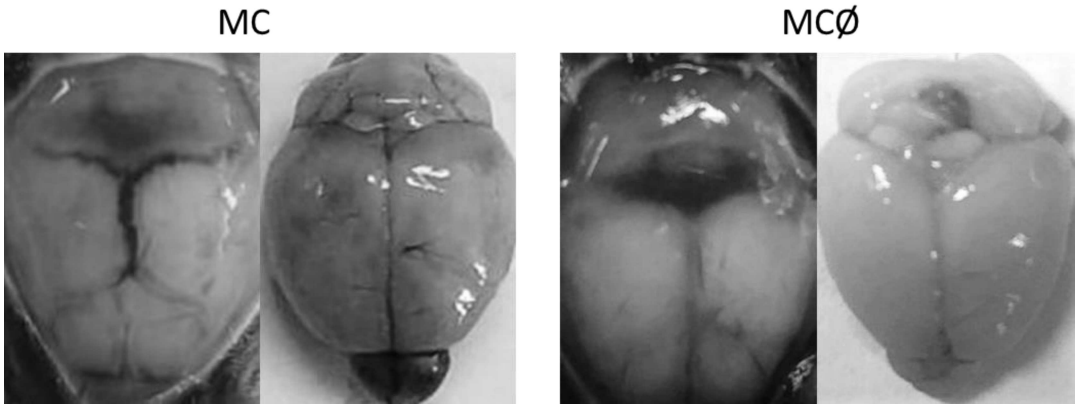


Figura 15 Fotografias representativas das calotas cranianas e dos cérebros submetidos a coloração de Azul de Evans.

MCØ = designa o animal que foi à óbito, mas não em decorrência de malária cerebral; MC = designa o animal que foi à óbito em decorrência do desenvolvimento de malária cerebral.

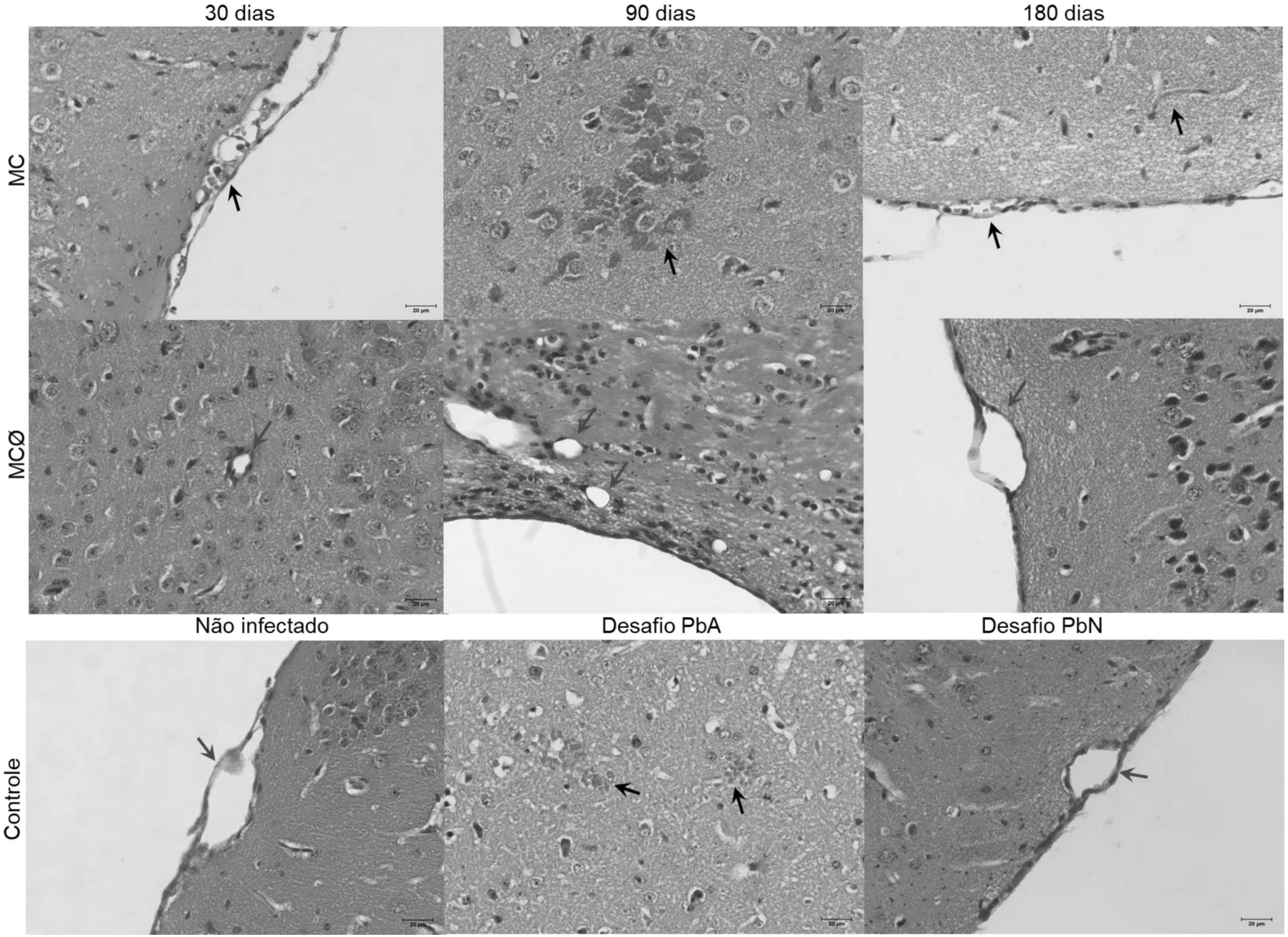


Figura 16 Fotomicrografias representativas de secções do cérebro de animais, considerando-se perfil clínico e desafio experimental nos dias 30, 90 e 180.

Controle = não infectado; MCØ = designa os grupos que foram à óbito, mas não em decorrência de malária cerebral; HP = designa os grupos que foram à óbito em decorrência do desenvolvimento de hiperparasitemia; MC = designa os grupos que foram à óbito em decorrência do desenvolvimento de malária cerebral; 30 dias = desafio no dia 30 após última exposição; 90 dias = desafio do dia 90 após última exposição; 180 dias = desafio no dia 180 após última exposição.
Aumento 400X; Setas vermelhas indicam livres; Setas pretas indicam áreas hemorrágicas ou vasos sanguíneos congestos.

6.3.1 Relação entre perfil clínico apresentado pelos animais pré-expostos a infecção malárica por PbA e PbN e níveis de anticorpos séricos, níveis de citocinas anti- e pró-inflamatórias, índice esplênico e perfil fenotípico de células esplênicas

Visto que animais C57BL/6 foram protegidos da MC induzida por PbA quando pré-expostos a parasitos homólogos ou heterólogos, nós, então, buscamos investigar a participação de parâmetros imunológicos específicos nessa proteção.

Os resultados são apresentados nos subitens 6.3.1.1, 6.3.1.2, 6.3.1.3, e 6.3.1.4, a seguir.

6.3.1.1 Associação entre anticorpos IgG e perfil clínico apresentado pelos animais desafiados com PbA 30, 90 e 180 dias após pré-exposição aos parasitos da malária.

Para demonstrar que a exposição prévia de camundongos C57BL/6 a parasitos vivos de fase sanguínea de PbA e PbN são capazes de induzir resposta imune humoral, uma amostra de sangue foi coletada da veia caudal de todos os animais recebidos do CBR/UFJF, para realização de ensaio imunoenzimático a partir do soro obtido. Como esperado, antes das infecções experimentais todos os animais foram negativos para anticorpos IgG total parasito-específico (Figura 17).

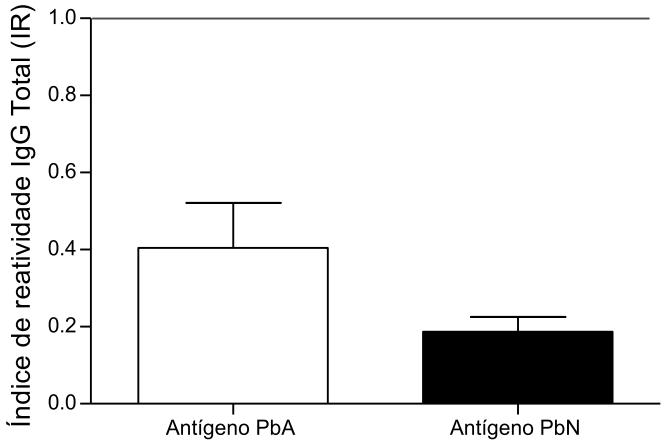


Figura 17 Índice de reatividade de anticorpos IgG total em animais C57BL/6 não expostos a infecção malárica.

A linha vermelha indica o limite para soroconversão, IR>1 indica soroconversão.

Para a análise da soroconversão e de reatividade cruzada de anticorpos, os grupos experimentais foram divididos considerando-se a cepa de *P. berghei* (ANKA ou NK65) utilizado nas exposições prévias e o desfecho observado após o desafio com PbA (MC ou MCØ). Os resultados podem ser visualizados nas figuras 18, 19 e 20. De maneira geral, independentemente do tempo decorrido até o desafio foi possível fazer três observações mais amplas: 1) para todos os isótipos a soroconversão foi dependente da exposição prévia a malária ou a uma infecção persistente, como aquela verificada para os animais somente desafiados com PbN; 2) soro proveniente de animais expostos a PbA e a PbN foi capaz de reconhecer antígeno homólogo e heterólogo, independentemente do isótipo pesquisado, sugerindo reatividade cruzada de anticorpo; 3) independentemente do IR verificado para os isótipos pesquisados nos grupos pré-expostos em relação aos animais somente desafiados não houve, em qualquer dos tempos de desafio, uma relação clara entre os IR e o perfil clínico dos animais.

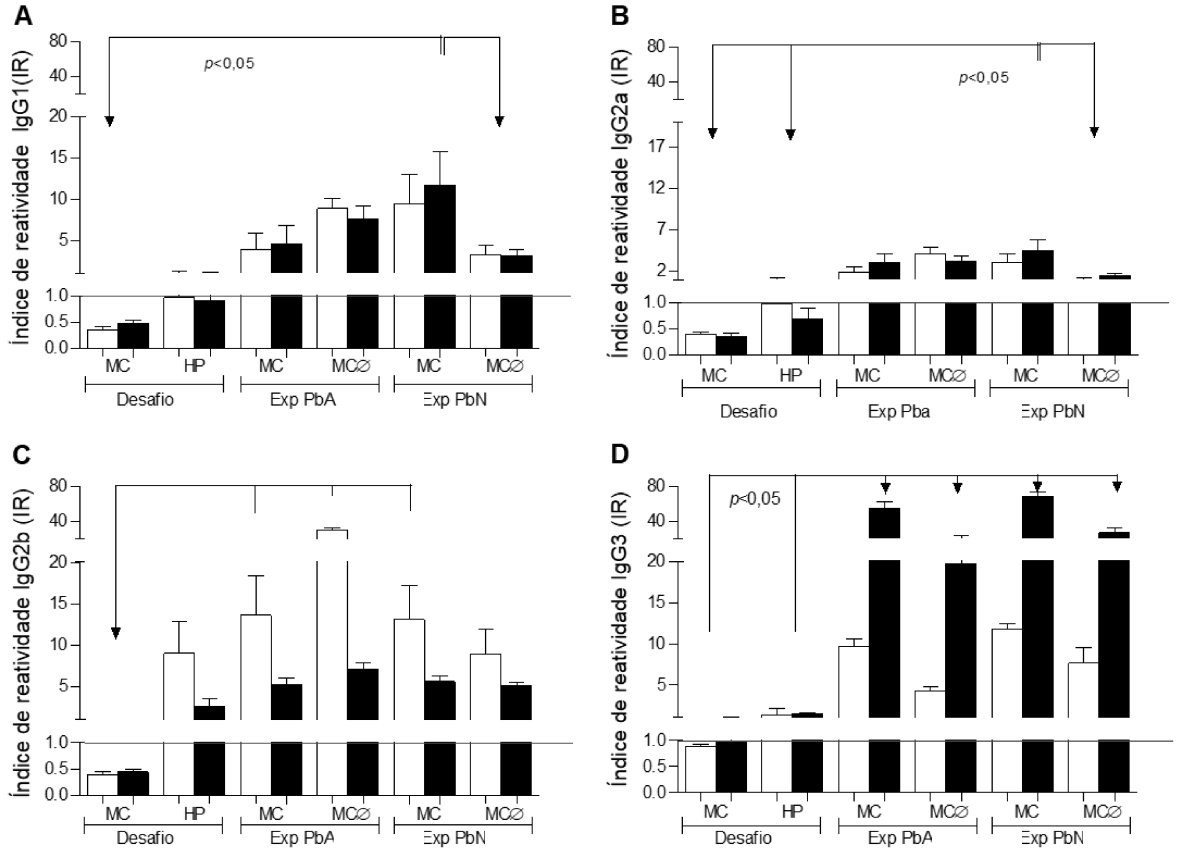


Figura 18 Índice de reatividade de anticorpos IgG total e subclasses, considerando-se perfil clínico e tipo de exposição prévia, em animais desfiados no dia 30 após última exposição.

(A)Índice de reatividade IgG1 (B) Índice de reatividade IgG2a (C) Índice de reatividade IgG2b (D) Índice de reatividade IgG3 HP = designa o grupo que foi à óbito em decorrência de hiperparasitemia após desafio com PbN; MC = designa os grupos que foram à óbito em decorrência do desenvolvimento de malária cerebral; MCØ = designa os grupos que foram à óbito, mas não em decorrência de malária cerebral; Exp PbA = Grupos expostos previamente 1 ou 2 vezes a *Plasmodium berghei* ANKA; Exp PbN = Grupos exposto previamente 1 ou 2 vezes a *Plasmodium berghei* NK65. .* ANOVA 1 via, pós-teste Bonferroni, $p<0,05$.

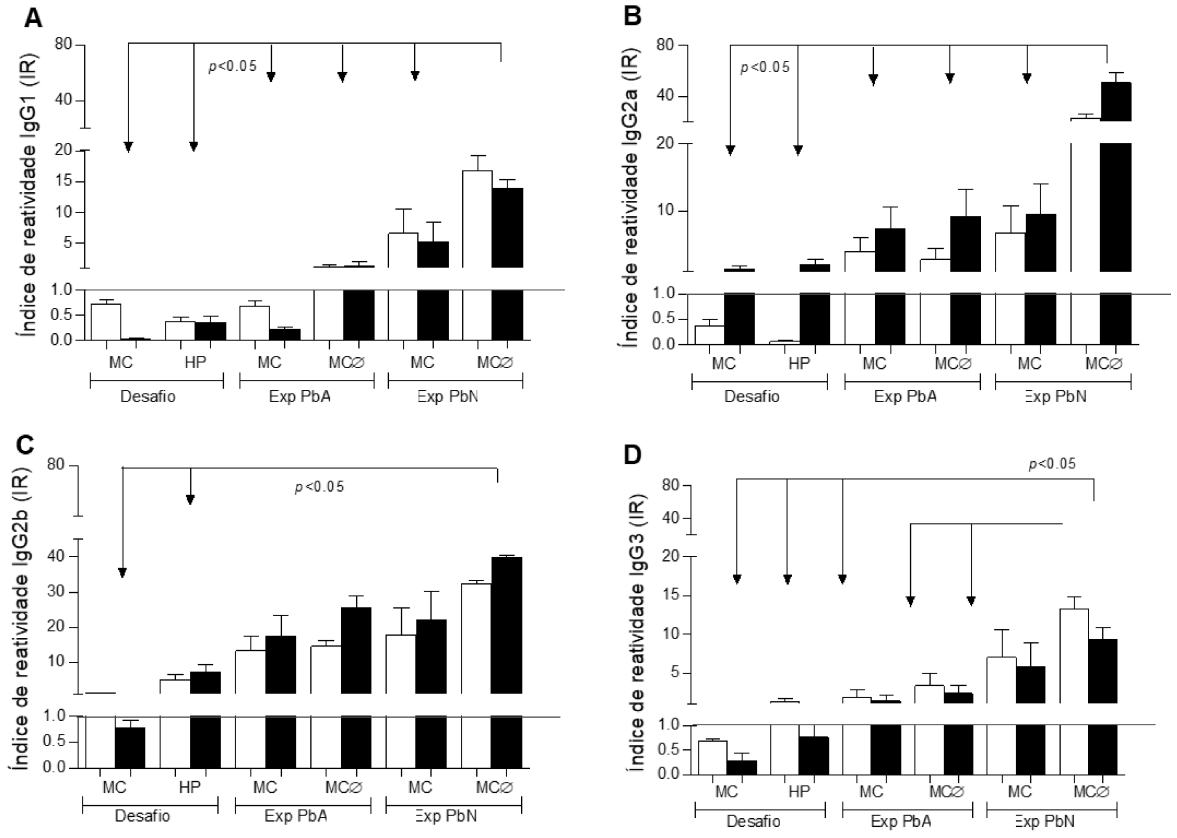


Figura 19 Índice de reatividade de anticorpos IgG total e subclasses, considerando-se perfil clínico e tipo de exposição prévia, em animais desfiados no dia 90 após última exposição.

(A)Índice de reatividade IgG1 (B) Índice de reatividade IgG2a (C) Índice de reatividade IgG2b (D) Índice de reatividade IgG3 HP = designa o grupo que foi à óbito em decorrência de hiperparasitemia após desafio com PbN; MC = designa os grupos que foram à óbito em decorrência do desenvolvimento de malária cerebral; MCØ = designa os grupos que foram à óbito, mas não em decorrência de malária cerebral; Exp PbA = Grupos expostos previamente 1 ou 2 vezes a *Plasmodium berghei* ANKA; Exp PbN = Grupos exposto previamente 1 ou 2 vezes a *Plasmodium berghei* NK65. .* ANOVA 1 via, pós-teste Bonferroni, $p<0,05$.

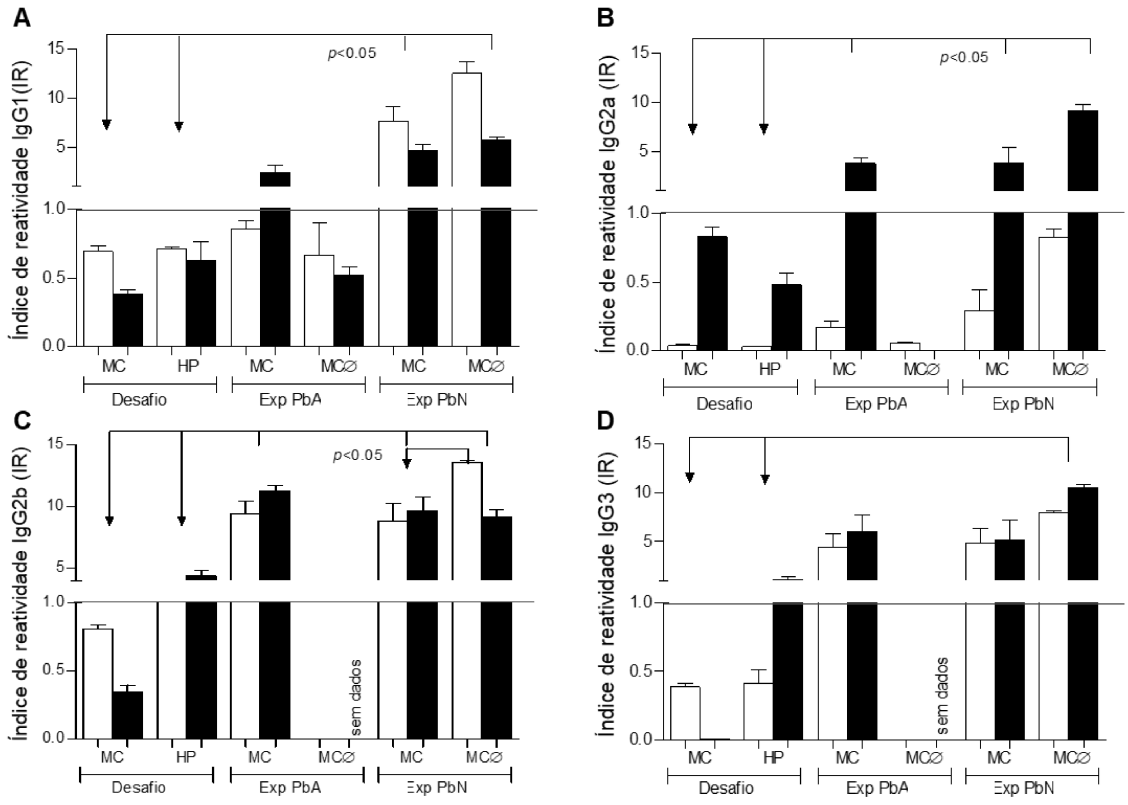


Figura 20 Índice de reatividade de anticorpos IgG total e subclasses, considerando-se perfil clínico e tipo de exposição prévia, em animais desfiados no dia 180 após última exposição.

(A)Índice de reatividade IgG1 (B) Índice de reatividade IgG2a (C) Índice de reatividade IgG2b (D) Índice de reatividade IgG3 HP = designa o grupo que foi à óbito em decorrência de hiperparasitemia após desafio com PbN; MC = designa os grupos que foram à óbito em decorrência do desenvolvimento de malária cerebral; MCØ = designa os grupos que foram à óbito, mas não em decorrência de malária cerebral; Exp PbA = Grupos expostos previamente 1 ou 2 vezes a *Plasmodium berghei* ANKA; Exp PbN = Grupos exposto previamente 1 ou 2 vezes a *Plasmodium berghei* NK65. .* ANOVA 1 via, pós-teste Bonferroni, $p<0,05$.

6.3.1.2 Níveis de citocinas pró (TNF-α e IFN –ɣ) e anti-inflamatória (IL-10) de acordo com o perfil clínico dos animais imunizados e desafiados 30, 90 e 180 dias após a última imunização

Considerando que resposta imune humoral pareceu não influenciar o prognóstico da infecção, nós a seguir investigamos essa relação com os níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias detectadas no cérebro dos animais. Os resultados encontram-se ilustrados na figura 21.

Pelos dados, observa-se que no cérebro de animais pré-expostos a PbA ou PbN e desafiados após 30 dias, os níveis da citocina pró-inflamatória IFN-ɣ (FIGURA 22B) e da citocina IL-10 (FIGURA 21A) que nesse modelo de infecção desempenha papel anti-inflamatório, se mantiveram semelhantes entre os grupos. Observa-se ainda que independente dos óbitos dos animais serem decorrentes de MC ou não (MCØ), os níveis dessas citocinas foram semelhantes entre si e ao grupo controle (não infectado). A citocina TNF-α apresentou-se ligeiramente diminuída em animais expostos previamente a PbN que não desenvolveram MC (MCØ) quando comparados aos animais que desenvolveram MC (FIGURA 21C).

Os grupos desfiados 90 dias depois da exposição apresentaram aumento nos níveis de IL-10 em comparação aos grupos Controle (sem tratamento) e grupos somente desafiados com PbA ou PbN (MC Desafio PbA e HP Desafio PbN) (FIGURA 21D). No entanto, esse aumento parece não estar relacionado com o desenvolvimento de um ou outro espectro clínico da doença, uma vez que animais que desenvolveram MC ou não apresentaram níveis semelhantes entre si de IL-10.

Em relação aos níveis de TNF-α e IFN-ɣ, citocinas com papel pró-inflamatório, esses não se mostraram distintos nem na comparação entre os grupos pré-expostos, ou mesmo na comparação com os grupos Controle (sem tratamento) ou somente desafiados (MC Desafio PbA, HP Desafio PbN) (Figura 21E e F).

Do mesmo modo, nos grupos que foram desafiados 180 dias após a última exposição, foi observado que as concentrações de TNF-α e IFN-ɣ, bem como de IL-10 não apresentaram diferenças significativas na comparação entre os grupos que desenvolveram os diferentes perfis clínicos da doença (MC ou MCØ) (FIGURA 21G, H e I). O mesmo ocorreu quando a comparação foi realizada entre os animais pré-

expostos e os grupos Controle (sem tratamento) ou que foram somente desafiados (MC Desafio PbA).

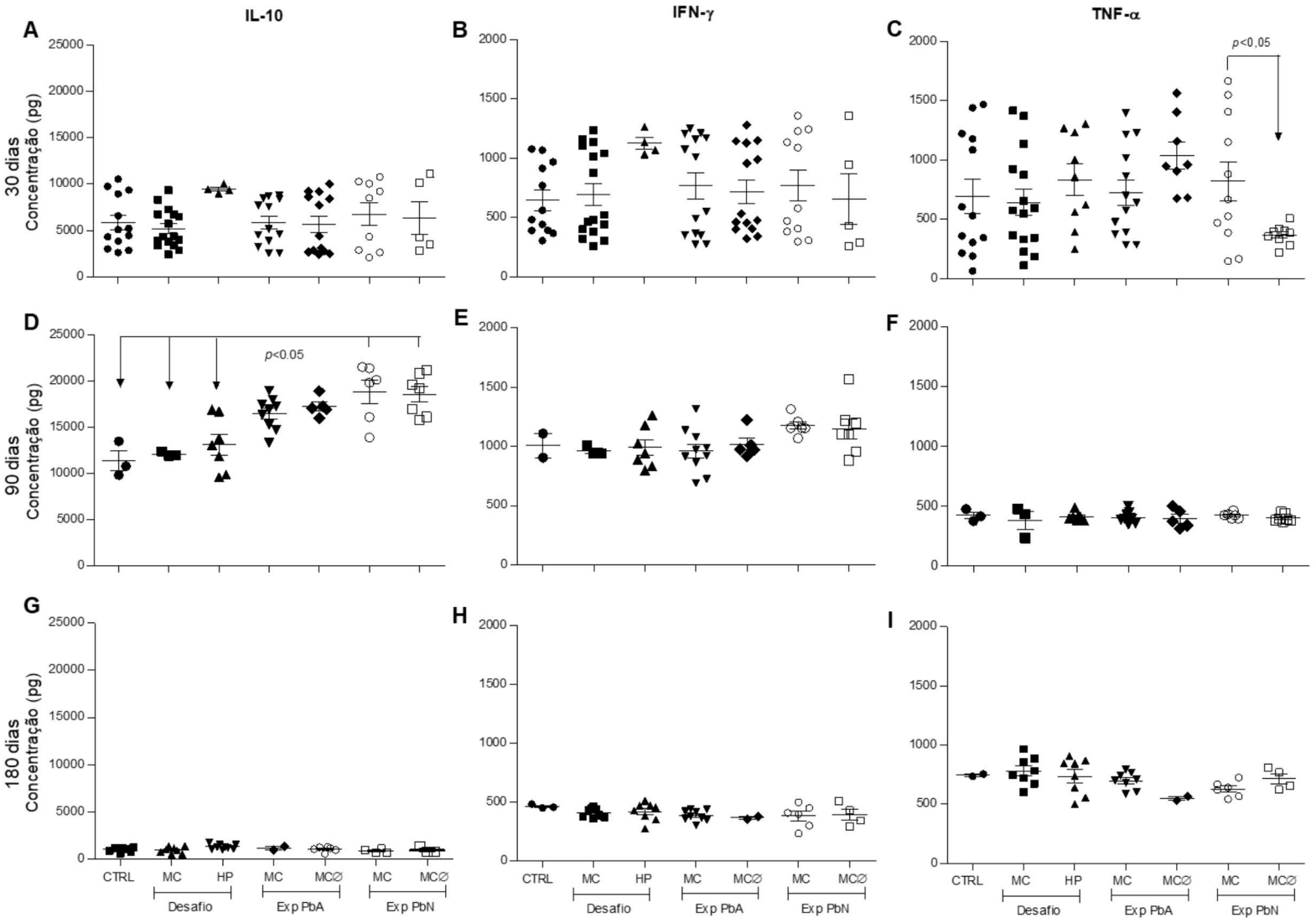


Figura 21 Níveis de citocinas anti-inflamatória (TNF-α e IFN-ɣ) e pró-inflamatória (IL-10) determinadas no cérebro, considerando-se o perfil clínico e o tipo de exposição, em animais desafiados nos dias 30, 90 e 180 após a última exposição.

(A)IL-10, Desafio dia 30; (B) TNF-α, Desafio dia 30; (C) IFN-ɣ, Desafio dia 30; (D) IL-10, Desafio dia 90; (E) TNF-α, Desafio dia 90; (F) IFN-ɣ, Desafio dia 30; (G) IL-10, Desafio dia 180; (H) TNF-α, Desafio dia 90 (I) IFN-ɣ, Desafio dia 30
HP = designa o grupo que foi à óbito em decorrência de hiperparasitemia após desafio com PbN; MC = designa os grupos que foram à óbito em decorrência do desenvolvimento de malária cerebral; MCØ = designa os grupos que foram à óbito, mas não em decorrência de malária cerebral; Exp PbA = Grupos expostos previamente 1 ou 2 vezes a *Plasmodium berghei* ANKA; Exp PbN = Grupos exposto previamente 1 ou 2 vezes a *Plasmodium berghei* NK65. * ANOVA 1 via, pós-teste Bonferroni, $p<0,05$.

6.3.1.3 Avaliação do índice esplênico em animais imunizados e não imunizados

Uma vez que infecções maláricas repetidas geralmente levam a esplenomegalia e considerando-se, ainda, o baço como um importante órgão do sistema imunológico, o efeito das exposições a parasitos vivos no aumento desse órgão também foi investigado. Para tal, no momento da eutanásia, o baço foi retirado, limpo em relação a excesso de gordura, lavado em solução salina e pesado em balança de precisão. Os resultados foram calculados e expressos como índice esplênico, que consiste na relação entre peso do baço e o peso dos animais (LOPES et al., 2015).

Para os desafios realizados no dia 30 e 90, os resultados para os índices esplênicos foram similares. Em geral, observou-se que animais que desenvolveram MC, independentemente se pré-expostos (a PbA ou PbN) ou não a infecção malárica, apresentaram o baço ligeiramente aumentado em relação ao controle não exposto (30 dias – 7 vezes; 90 dias – 6 vezes em relação ao controle). Porém, esse aumento não foi significativo ($p > 0,05$) (FIGURA 22A). Ao contrário, observou-se que nos animais protegidos da MC esse aumento foi significativo ($p<0,05$) em relação àqueles pré-expostos ou não que desenvolveram MC e ao controle não exposto. Nesse caso, os índices foram 12 e 8 vezes superiores ao controle não infectado para animais pré-expostos a PbA e PbN, respectivamente, nos grupos que foram desafiados no dia 30; e 4 e 10 vezes maiores que o grupo controle não infectado, nos grupos expostos a PbA e PbN, no dia 90 após a exposição (FIGURA 22B). Esses valores foram, no entanto, similares ao observado para o baço dos animais desafiados com PbN, sugerindo que a hiperparasitemia modula a esplenomegalia observada.

Já no experimento de 180 dias observou-se que animais do grupo pré-exposto a PbN, que foram protegidos da MC, tenderam a apresentar IE superior ao apresentado por animais que evoluíram para o quadro grave da infecção (Figura 22C). Contudo, esse resultado pode ser somente reflexo do n reduzido de animais nesse grupo. A falta de dados para o grupo MC∅ pré-exposto a PbA traz limitações a análise dos resultados.

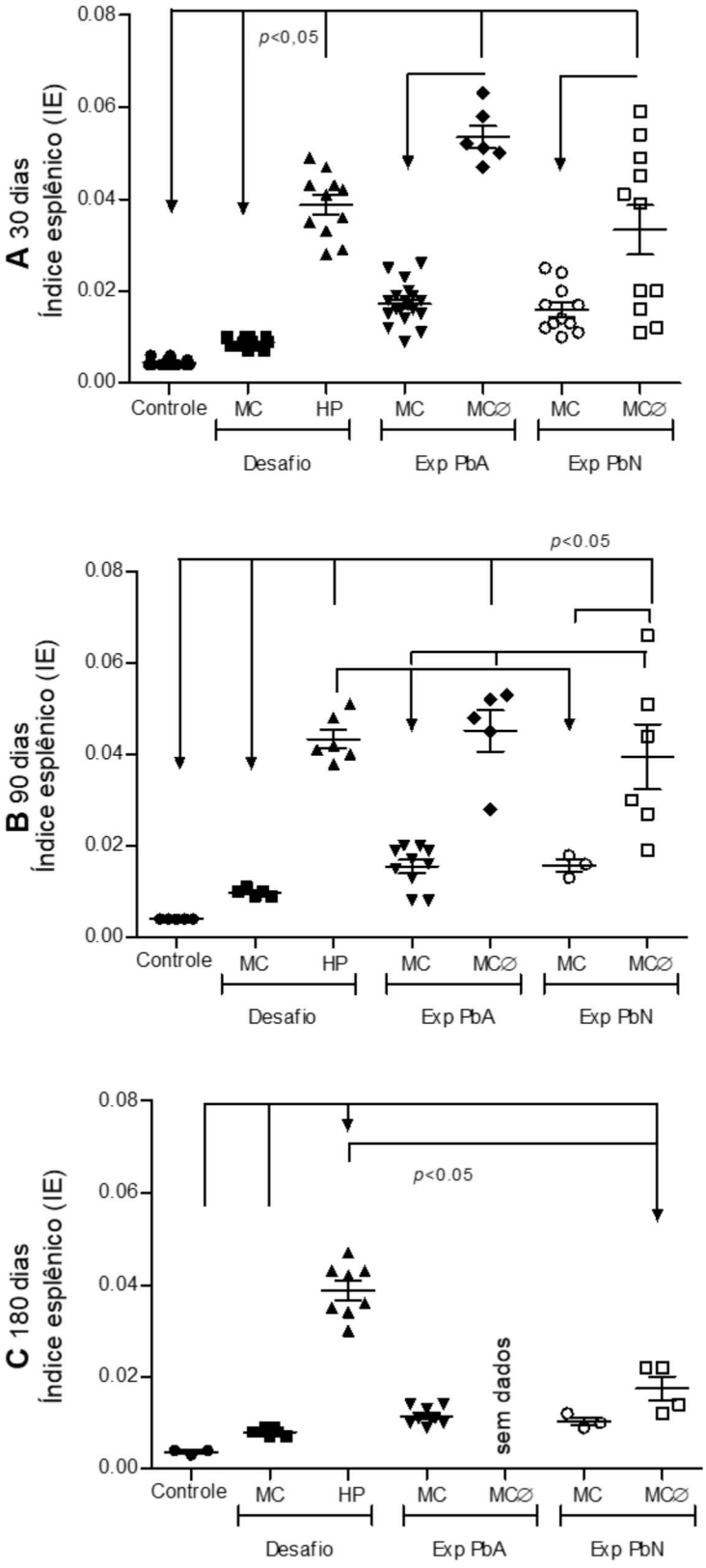


Figura 22 Índice esplênico no momento da eutanásia, considerando-se p perfil clínico e o tipo de exposição, em animais desafiados nos dias 30, 90 e 180 após a última exposição.

(A)Desafio no dia 30 após última exposição; (B) Desafio no dia 180 após última exposição; (C) Desafio no dia 180 após última exposição HP = designa o grupo que foi à óbito em decorrência de hiperparasitemia após desafio com PbN; MC = designa os grupos que foram à óbito em decorrência do desenvolvimento de malária cerebral; MCØ = designa os grupos que foram à óbito, mas não em decorrência de malária cerebral; Exp PbA = Grupos expostos previamente 1 ou 2 vezes a *Plasmodium berghei* ANKA; Exp PbN = Grupos exposto previamente 1 ou 2 vezes a *Plasmodium berghei* NK65. .* ANOVA 1 via, pós-teste Bonferroni, $p<0,05$.

6.3.1.4 Análise fenotípica de esplenócitos de animais que desenvolveram ou não malária cerebral após terem sido pré-expostos a infecção experimental

Como intuito de avaliar as frequências de linfócitos T helper ($CD3^+CD4^+$), T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$) e B ($CD19^+CD45^+$) no baço dos animais que sofreram infecções prévias de malária em função do perfil clínico apresentado após desafio experimental (MC ou MCØ), o órgão foi retirado no momento da eutanásia e processado para fenotipagem celular. Essa análise foi realizada somente com os animais desafiados 30 dias após última exposição aos parasitos.

Em relação aos linfócitos esplênicos T $CD4^+$, observou-se que animais somente desafiados com PbN (HP Des) apresentaram uma redução na frequência (média de 8,31%; $p<0,05$) tanto em relação aos animais controles (não infectado, média de 44,37%; $p<0,05$) quanto em relação aos somente desafiados com PbA (MC Des – média de 43,67%; $p<0,05$) e aos previamente expostos que desenvolveram (MC Exp – média de 42%; $p<0,05$) ou não MC (MCØ Exp – média de 33, 86%; $p<0,05$) (FIGURA 23A).

Por outro lado, quando se analisou o compartimento de linfócitos T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$) (FIGURA 23B) observou-se que em relação aos animais controles, a frequência dessas células estava significativamente reduzida nos camundongos que não desenvolveram MC, independentemente se pré-expostos ou não (HP Des e MCØ Exp).

Esse mesmo comportamento foi observado para linfócitos B totais $CD19^+CD45^+$ (FIGURA 23C, média de 0,15% e 8,12% para HP Des e MCØ, respectivamente; $p<0,05$), B naive (FIGURA 23D, média de 0,02% e 0,38% para HP Des e MCØ, respectivamente; $p<0,05$) e B ativadas (FIGURA 23F, média de 0,095% e 0,089% para HP Des e MCØ, respectivamente; $p<0,05$). Na análise do perfil fenótipo de linfócitos B esplênicos ativados chama a atenção o fato do subtipo ativado estar significativamente elevado nos animais que desenvolveram MC após exposição (MC Exp – 9,35%) em relação aos animais controle (não infectado, 2,5%) ($p<0,05$) (FIGURA 23E).

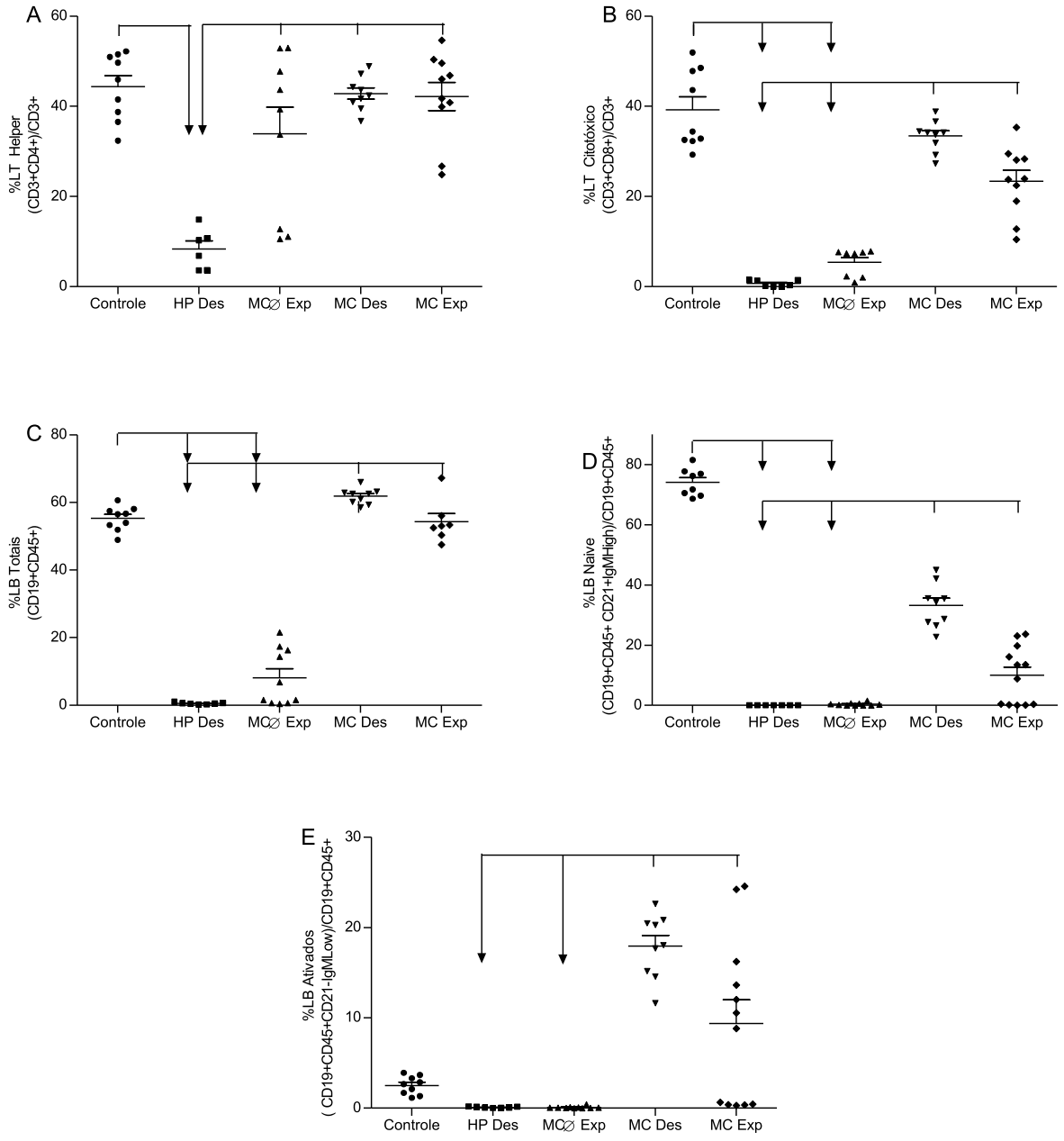


Figura 23 Perfil fenotípico de esplenócitos dos animais de acordo com perfil clínico de animais desafiados no dia 30 após última exposição

(A) Linfócitos T Helper (CD3+CD4+); (B) Linfócitos T Citotóxicos (CD3+CD8+); (C) Linfócitos B Totais (CD19+CD45+); (D) Linfócitos B Naive ("CD19+CD45+ CD21+IgMHigh"); (E) Linfócitos B Ativados (CD19+CD45+CD21-IgMLow).

HP = designa o grupo que foi à óbito em decorrência de hiperparasitemia após desafio com PbN; MC = designa os grupos que foram à óbito em decorrência do desenvolvimento de malária cerebral; MCØ = designa os grupos que foram à óbito, mas não em decorrência de malária cerebral; Exp PbA = Grupos expostos previamente 1 ou 2 vezes a *Plasmodium berghei* ANKA; Exp PbN = Grupos exposto previamente 1 ou 2 vezes a *Plasmodium berghei* NK65. * ANOVA 1 via, pós-teste Bonferroni, $p<0,05$.

6.3.2 Avaliação da presença de linfócitos T helper ($CD4^+$), T citotóxicos ($CD8^+$) e linfócitos B ($CD19^+$) no cérebro de animais desafiados 30 dias após pré-exposição a malária

Visto que, independentemente ou não de uma pré-exposição aos parasitos da malária, não houve diferença nos níveis de anticorpos séricos e níveis de citocinas detectados *in loco* nos animais que desenvolveram ou não MC e, considerando ainda que, animais pré-expostos a infecção que não desenvolveram MC apresentaram frequência reduzida de determinadas populações celulares em relação àqueles que evoluíram para o quadro grave, decidiu-se por avaliar qualitativamente a presença de linfócitos T helper ($CD4^+$), linfócitos T citotóxicos ($CD8^+$) e linfócitos B ($CD19^+$) no tecido nervoso. Utilizando-se a técnica de imunohistoquímica foi possível observar que, animais controle (sem tratamento) não apresentaram no tecido nervoso marcação positiva para nenhum dos tipos celulares pesquisados (FIGURAS 24A, 24B e 24C). No mesmo sentido, animais pré-expostos que não desenvolveram MC apresentaram pouca ou nenhuma marcação para esses tipos celulares (FIGURAS 25G, 25H e 25I). Por outro lado, notou-se a presença marcante de todos os linfócitos avaliados no encéfalo dos animais que desenvolveram o quadro grave da doença neurológica (FIGURAS 25D, 25E e 25F). Torna-se ainda necessária uma análise qualitativa cuidadosa do material coletado a fim de se definir qual (is) dos subtipos celulares seria(m) prevalente(s) em função do desfecho clínico observado.

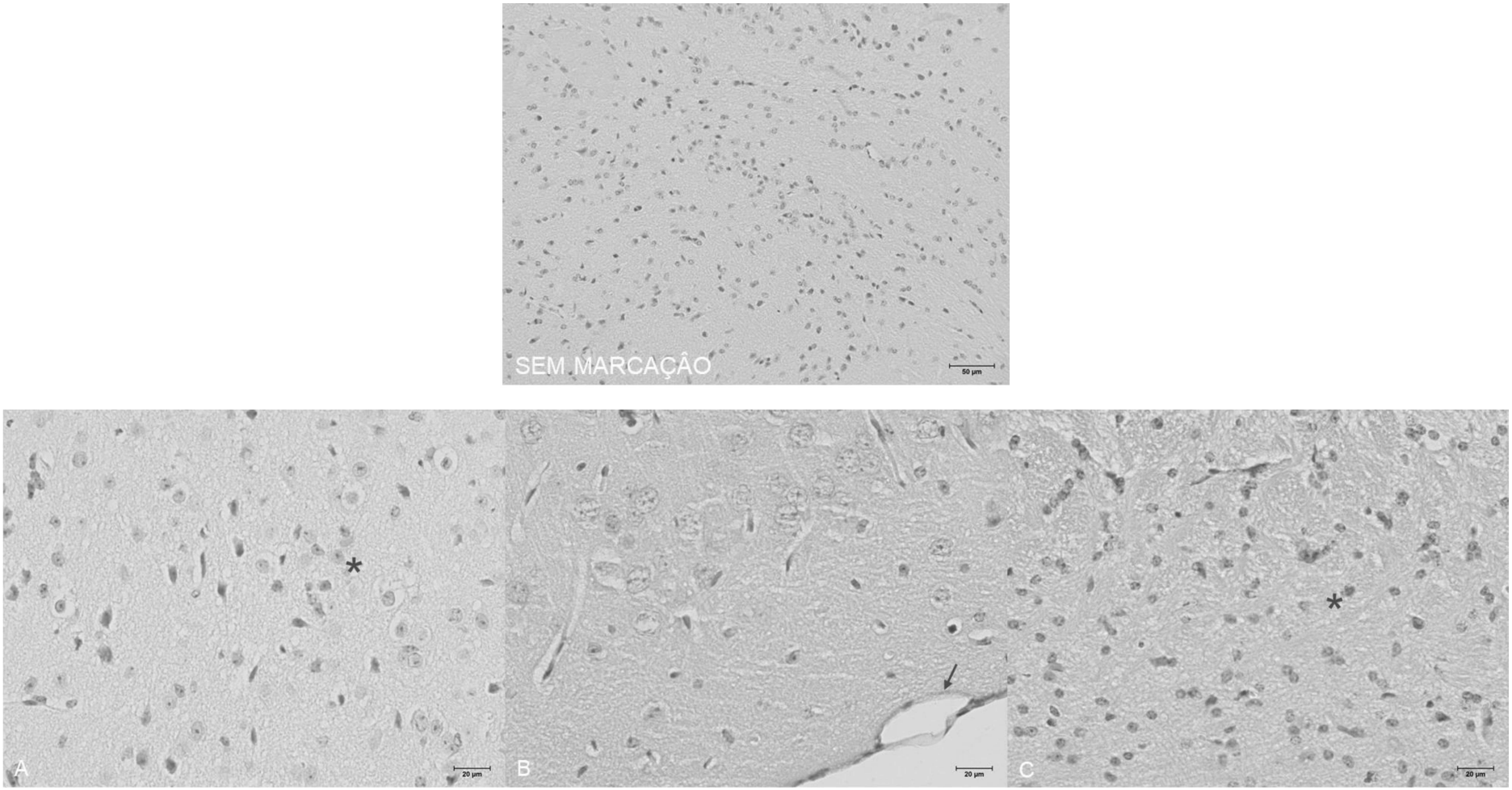


Figura 24 Marcação de linfócitos B, T helper e T citotóxicos por imuno-histoquímica no tecido cerebral de camundongos.

Sem Marcação: Lâmina de controle negativo.

Grupo Controle (Sem tratamento): (A) Anticorpo anti-CD4; (B) Anticorpo anti-CD8; (C) Anticorpo anti-CD19

Aumento 400X, 20µm; Asteriscos e setas vermelhas indicam tecido ou vasos sanguíneos sem marcação; Setas pretas indicam tecido ou vasos sanguíneos com marcação.

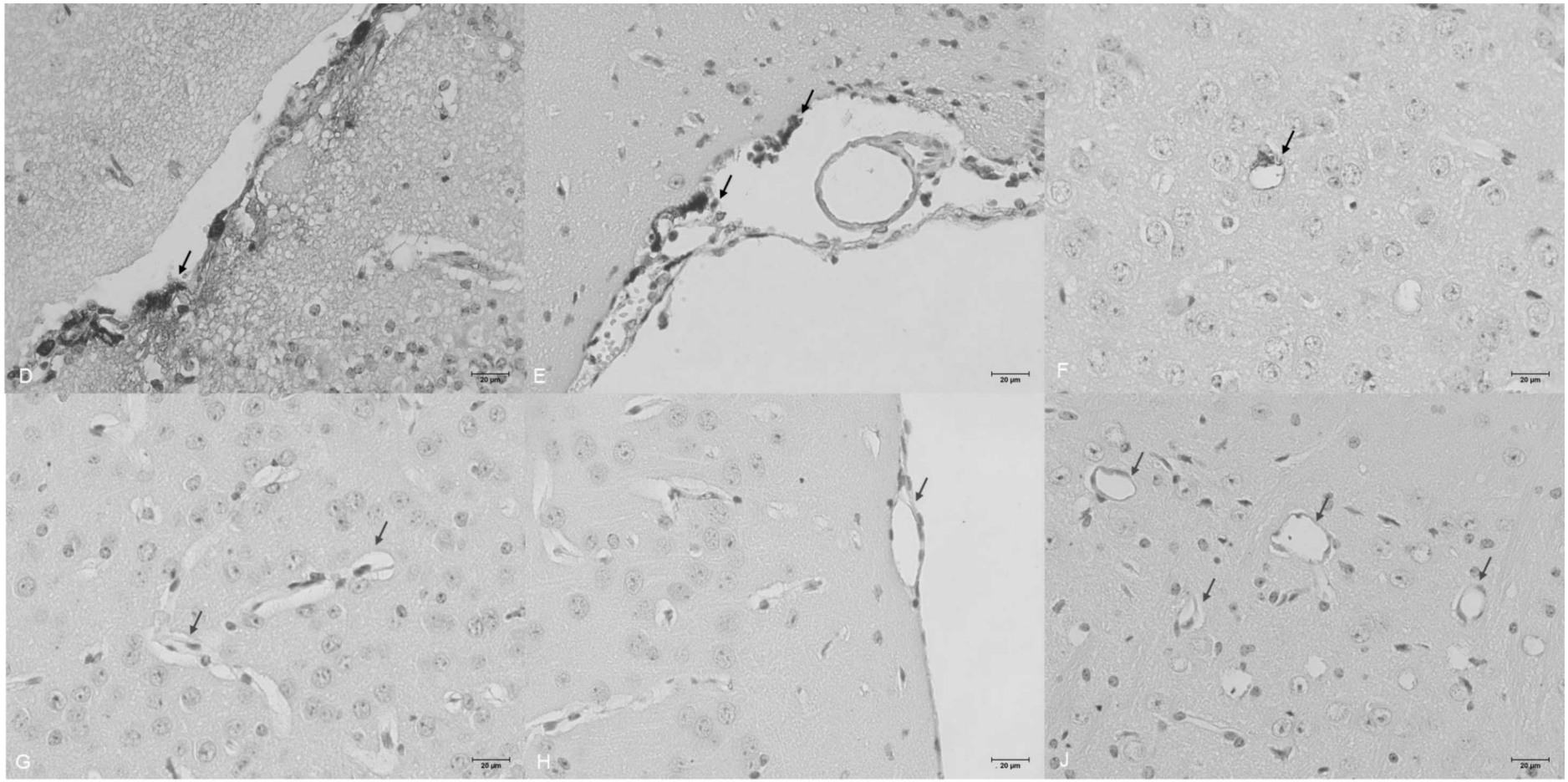


Figura 25 Marcação de linfócitos B, T helper e T citotóxicos por imuno-histoquímica no tecido cerebral de camundongos (Continuação Figura 25)

Malária cerebral: (D) Anticorpo anti-CD4; (E) Anticorpo anti-CD8; (F) Anticorpo anti-CD19

Não malária cerebral: (G) Anticorpo anti-CD4; (H) Anticorpo anti-CD8; (I) Anticorpo anti-CD19

Aumento 400X, 20µm, Asteriscos e setas vermelhas indicam tecido ou vasos sanguíneos sem marcação; Setas pretas indicam tecido ou vasos sanguíneos com marcação.

7 DISCUSSÃO

Considerando que, na atualidade, a malária ainda é considerada um grande problema de saúde mundial e que, ainda, muitos estudos apontam que a exposição natural (DRUILHE e KHUSMITH, 1987; FARRINGTON et al., 2017; SIMMONS et al., 2017; BOYLE et al., 2019) ou experimental a malária (ROESTEMBERG et al., 2011; MORDMÜLLER et al., 2017; SCHATS, 2019; MUELLER et al., 2005; LOVEGROVE et al., 2008) geram resposta imunológica e proteção contra a doença, a busca pela elucidação dos mecanismos participantes dessa resposta têm despertado grande interesse, a fim de contribuir para a futura confecção de uma vacina eficaz e segura contra a malária. Um dos pilares para o desenvolvimento de um protótipo ideal é sua capacidade de responder a diversas espécies e linhagens do causador da doença, o que se mostra um dos principais desafios na confecção da vacina antimalárica ideal. Diante disso, esse estudo objetivou avaliar o impacto das exposições a cepa menos virulenta no desenvolvimento da MC experimental. A análise da ocorrência de imunidade antimalárica transcendente a cepa em camundongos expostos a parasitos vivos de fase sanguínea de *P. berghei cepa* NK65 foi realizada através de parâmetros parasitológicos e imunológicos, da avaliação dos perfis histopatológicos, do perfil de resposta humoral e celular apresentado pelos animais, frente ao desafio com *P. berghei* ANKA.

7.1 Concentração de eritrócitos parasitados para indução de MC experimental murina

Pesquisas que envolvem o estudo da MC experimental vêm sendo realizados há décadas, através da utilização de primatas não humanos e modelos murinos, buscando elucidar os mecanismos envolvidos na síndrome da MC (DE SOUZA et al., 2009). A utilização desses modelos é de grande importância, visto que por questões éticas os estudos em seres humanos somente podem ser realizados *post mortem,* o que limita a geração de conhecimento acerca do desenvolvimento da MC (GHAZANFARI et al., 2018).

Atualmente, modelos murinos para MC experimental são amplamente utilizados, uma vez que esses animais são de fácil manutenção, apresentam ciclo reprodutivo relativamente rápido e permitem o isolamento de genes de interesse em novas gerações (TORRE et al., 2018). Um modelo murino já bem estabelecido para a MC experimental é o que utiliza camundongos das linhagens C57BL/6 infectados via intraperitoneal ou via intravenosa por P*. berghei* ANKA. Entretanto, a concentração do inóculo utilizada no estabelecimento da MC experimental, bem como a porcentagem de animais que desenvolvem MC, variam entre os grupos de pesquisa que utilizam tal modelo (REST, 1982; LACKNER et al., 2006; FRANKE-FAYARD et al., 2005; LOVEGROVE at el., 2008, BASIR et al., 2012).

Diante disso, nosso primeiro passo para realização dos ensaios de exposição prévia aos parasitos foi estabelecer a concentração de eritrócitos parasitados mais eficaz na indução da MC experimental. Para tal, foram utilizadas 3 concentrações de eritrócitos parasitados por PbA, 10^5, 10^6 e $5x10^6$. Em nossas observações, todos os inóculos usados geraram MC em 100% dos animais, porém, os animais que foram inoculados com $5x10^5$ e 10^6 eritrócitos parasitados apresentaram queda brusca do estado clínico, chegando ao óbito de forma abrupta. Diferentemente do que foi observado por Amani e colaboradores (1998), que utilizando inóculo de 10^6 eritrócitos parasitados com quatro linhagens de *P. berghei* ANKA, demostraram que o rápido declínio do estado geral dos animais, culminando em óbito de forma aguda, foi associado a linhagem de *Plasmodium berghei* utilizada e não a concentração de eritrócitos parasitados. Nesse mesmo estudo, as taxas de MC variaram entre 50 e 100% dos animais inoculados. O mesmo grupo de pesquisa mostrou em 2000, que a utilização de inóculo menor ($5x10^5$ eritrócitos parasitados) levou a morte de 100% dos animais no dia 9 após a infecção, enquanto o maior inóculo utilizado na ocasião (10^6 eritrócitos parasitados), levou a óbito 60% dos animais, porém de forma gradativa dentro do período esperado para o desenvolvimento de MC (AMANI et al., 2000).

Dessa forma, considerando que o grupo experimental inoculado com 10^5 eritrócitos infectados apresentou curva de mortalidade e de avaliação de escore clínico descendentes, dentro do período esperado para o desenvolvimento da MC e que os níveis de parasitemia foram de até 8% em média, o que acompanha dados já descritos sobre o desenvolvimento de quadro clínico de MC em modelos murinos (ENGWERDA et al., 2005; CARVALHO et al., 2010), esse foi o inóculo selecionado para a indução da MC experimental nos ensaios de exposição.

7.2 Impacto das exposições heterólogas no desenvolvimento da MC experimental

No presente estudo, após uma ou duas exposições a 10^3 eritrócitos infectados com *P. berghei* ANKA ou *P. berghei* NK65, cerca de 30% e 50% dos animais expostos previamente não desenvolveram MC, respectivamente, sugerindo que as exposições realizadas 30 dias antes do desafio experimental são eficientes em proteger os animais contra o aparecimento de sinais e sintomas clínicos condizentes com o quadro de MC. Mesmo após o período considerado crítico para o desenvolvimento da síndrome, os animais sobreviventes não demonstraram nenhum sinal de dano neurológico durante o acompanhamento, indo a óbito por anemia causada por hiperparasitemia ou por eutanásia ao final do experimento (20º dia após o desafio).

O óbito dos animais por anemia causada pela hiperparasitemia se justificaria, somente, pela destruição do alto número de eritrócito parasitados, já que existe uma correlação positiva entre altos níveis de parasitemia e a diminuição de eritrócitos na anemia aguda por malária (BIEMBA et al., 2000). Entretanto, existem outros contribuintes para a ocorrência da anemia grave na malária, estudos realizados em modelos murinos, modelos primatas não humanos e em seres humanos mostram que o montante de eritrócitos não parasitados destruídos pode chegar a 10 vezes o número de eritrócitos parasitados (JAKEMAN et al., 1999; PRICE et al., 2001; HELEGBE et al., 2009; MORENO et al., 2013). Em seres humanos infectados, mesmo diante de baixos níveis de parasitemia, a doença pode evoluir para anemia grave, uma vez que a presença da hemozoína, dentre outros fatores, pode levar a diseritropoiese (produção de eritrócitos insuficientes para as atividades do organismo) e a eritropoiese ineficaz (destruição de eritrócitos no interior da medula óssea) (LAMIKANRA et al., 2007; IHEKWEREME et al., 2014).

Embora a literatura mostre que a morte por hiperparasitemia seja esperada em uma fração dos camundongos C57/BL6 infectados com PbA que não desenvolvem MC, nesse e em experimentos prévios realizados por nosso grupo, a totalidade dos animais que são somente infectados por PbA vai á óbito pelo desenvolvimento de MC, corroborando, mais uma vez, que em nossos estudos a sobrevivência dos animais se deve às imunizações realizadas com parasitos vivos de fase sanguínea.

Uma fração dos animais que sofreu exposição prévia apresentou baixos níveis de parasitemia durante todo o seguimento. Conforme já demostrado em estudos anteriores, os animais expostos ao parasito tornam-se semi-imunes, o que influencia no desenvolvimento de altos níveis de parasitemia (EVANS et al., 2006, BAO et al., 2015). Similarmente ao que ocorre em seres humanos (JAKEMAN et al., 1999), os animais que foram eutanasiados ao final do ensaio (20º d.p.i) apresentaram durante o todo o experimento níveis de parasitemia menores que 1%. A presença da carga parasitária demonstra o sucesso do desafio experimental, porém sem aumento de parasitemia ao longo do período avaliado, sugerindo que as exposições prévias realizadas podem gerar proteção não só contra danos neurológicos, mas também contra o aumento de parasitemia, entretanto as exposições não foram capazes de contribuir para a total limpeza do parasito da circulação sanguínea.

Diante da proteção conferida pelas exposições aos animais desafiados no dia 30, verificamos se a diminuição no índice de desenvolvimento da MC permanecia efetivo com o decorrer do tempo. Desse modo, foram analisados a sobrevivência, a presença de sinais neurológicos (escore clínico) e a parasitemia de animais que receberam o mesmo esquema de exposição prévia, porém que foram desafiados 90 e 180 dias após a última exposição. Observou-se que a proteção proporcionada pelas exposições permanece efetiva nos animais 90 dias após a última exposição prévia, visto que os parâmetros avaliados (sobrevivência, presença de sinais neurológicos e parasitemia) apresentaram-se semelhantes aos dos animais que foram desafiados no dia 30. De outro modo, os mesmos parâmetros aferidos não se mantiveram similares após uma maior passagem de tempo. Mesmo assim, cerca de 20% dos animais desafiados 180 dias após a última exposição sobreviveram além do período crítico para o desenvolvimento da MC. Ainda, a proteção conferida pelas imunizações após 180 dias pareceu, de algum modo, afetada, no sentido de que os animais sobreviventes apresentavam rápido declínio nos sinais clínicos, indo a óbito de forma abrupta.

Essa diminuição na capacidade de evitar o agravamento da doença é vista em seres humanos após longos períodos sem exposição ao parasito. Sabe-se que indivíduos residentes em áreas de alta endemicidade são afetados pelo agravamento da doença, principalmente ao final do primeiro ano de vida até cerca de 5 anos de idade, porém, após anos de exposição ao parasito, crianças mais velhas e adultos permanecem em áreas endêmicas com baixos níveis de parasitemia e, na maioria das

vezes, sem apresentar sinais clínicos da doença (DOOLAN et al., 2009; BEJON et al., 2010). Essa proteção clínica causada por exposições repetidas permanece por algum tempo após os indivíduos deixarem a área endêmica (BOUCHAUD et al., 2005; PISTONE et al., 2014), porém, eles passam a ser vulneráveis ao agravamento da malária quando se ausentam dessas áreas por mais tempo (FÄRNERT et al., 2015). Em experimento utilizando parasitos de fase sanguínea atenuados quimicamente, camundongos foram protegidos do desenvolvimento de forma grave da doença, após desafio experimental com parasitos homólogos de fase sanguínea, realizado até 9 meses após as imunizações (RAJA et al., 2016). Ainda, Good e colaboradores (2013) demonstraram que imunizações com parasitos atenuados de fase sanguínea geraram proteção contra o agravamento da malária, em desafio homólogo realizado 6 meses após a imunização.

Os níveis de sobrevivência e diminuição de sinais clínicos apresentados parecem não refletirem-se na diminuição dos níveis de parasitemia de todos os animais expostos, embora uma parte deles tenha permanecido com níveis de parasitemia próximos de 1% durante todo o experimento, outra parte que não foi a óbito por MC morreu por anemia causada por hiperparasitemia, reiterando dados já observado que mostram que a imunidade antidoença parece, em certo nível, dissociada da imunidade antiparasitária (BOUSEMA et al., 2014; RODRIGUEZ BARRAQUER et al., 2018; WHITE e WATSON, 2018; SHANKS, 2019).Nesse sentido, a análise dos mecanismos de aquisição da imunidade antidoença pode ser uma abordagem válida, no sentido de direcionar os estudos para entendermos como a imunidade antimalárica é gerada.

De qualquer maneira, a utilização de artifícios que impeçam ou atrasem o aparecimento dos sinais clínicos de MC, e o atraso da morte causada pela síndrome, estendem o período viável para a administração do tratamento antiparasitário efetivo, evitando a morte ou sequelas causadas pela MC.

A observação de que parte dos animais expostos tiveram sua sobrevivência prolongada pelas imunizações, bem como de que apresentaram supressão de sinais clínicos relacionados a MC, foram reforçadas pela avaliação do aspecto macroscópico da calota craniana e dos achados histológicos no tecido cerebral. A avaliação macroscópica demonstrou que todos os animais que morreram em decorrência do agravamento do quadro de MC apresentavam áreas hemorrágicas difusas na superfície da calota craniana no momento do óbito. Em reforço, a análise da

integridade da barreira hematoencefálica feita com azul de Evans mostrou ocorrência de extravasamento do corante para o tecido nervoso somente nos animais que evoluíram para MC. Da mesma forma, as análises histológicas demostraram a presença de vasos congestos, com adesão de células inflamatórias ao endotélio cerebral dos animais com MC, em contrapartida a maioria dos animais que morreu por anemia causada por hiperparasitemia apresentou vasos sanguíneos livres de tais células. Esses achados corroboram observações realizadas anteriormente, as quais demostraram que camundongos C57BL/6 infectados por *P. berghei ANKA* apresentaram sinais de MC associados a presença pontos hemorrágicos na calota craniana e sinais de rompimento da barreira hematoencefálica, com presença de células inflamatórias circundando os vasos sanguíneos (HUNT e GRAU, 2003; LACKNER et al., 2006; EPIPHANIO et al., 2010; NACER et al., 2012; PONSFORD et al., 2012; MILNER et al., 2015).

7.3 Análise do impacto das exposições heterólogas em parâmetros imunológicos

Considerando-se que as exposições utilizando a cepa menos virulenta de *P. berghei* levou a proteção contra MC de parte dos animais e ainda, a importância do papel da imunidade humoral em infecções maláricas, a qual é vista como a principal linha de defesa durante a fase sanguínea do ciclo (COHEN et al., 1961; SABCHAREON et al., 1991.), nosso passo seguinte foi investigar os níveis de anticorpos circulantes presentes no soro dos animais no momento da eutanásia. Para tal, os índices de reatividade das subclasses de anticorpos IgG, citofílicas (IgG1 e IgG2a) e não citofílicas (IgG2b e IgG3), foram medidos em resposta aos antígenos de *P. berghei* ANKA e *P. berghei* NK65. Em nossos experimentos foi possível observar que todos os animais expostos previamente aos parasitos soroconverteram em relação aos isótipos de IgG avaliados. Nesse caso, os anticorpos circulantes foram capazes de reconhecer tanto antígenos homólogos, quanto os heterólogos ao desafio, não havendo qualquer tipo de relação entre a subclasse avaliada e o perfil clínico apresentado pelos animais. Esses dados corroboram estudos anteriores onde demonstrou-se a existência de níveis semelhantes de anticorpos entre indivíduos que

desenvolveram ou não MC (THARAVANIJ et al., 1984; FRIBOURGH-BLANC et al., 1985; ERUNKULU et al., 1992).

Contudo, mesmo que nenhuma associação positiva entre anticorpos e proteção tenha sido observada em nossos estudos, não é possível concluir que os anticorpos avaliados não participem dos mecanismos imunológicos que promovem proteção. Essa informação se baseia no fato do ELISA, amplamente usado para determinar os níveis de anticorpos séricos, não permitir a diferenciação dos mesmos quanto funcionais (PERSSON et al., 2006), potencialmente bloqueadores (isto é, aqueles capazes de competir por epítopos comuns na molécula antigênica) e/ou neutros (não afetam a invasão) (GUEVARA PATIÑO et al., 1997; DEKKER et al., 2004). Portanto, torna-se fundamental, para a elucidação do papel dos anticorpos na proteção contra o desenvolvimento de MC em animais pré-exposição a cepa menos virulenta de *P. berghei*, a aplicação de ensaios funcionais ou de transferência passiva. Esses ensaios já tiveram sua importância descrita em 2004, quando John e colaboradores demonstraram que níveis elevados de anticorpos IgG anti-PfMSP-119 não estiveram associados à proteção antimalárica. Entretanto, em ensaios de inibição de invasão com duas linhagens de *P. falciparum*, uma “selvagem” e outra expressando a MSP-119 de *P. chabaudi*, esses anticorpos foram capazes de opsonizar parasitos expressando MSP-119 homóloga, bloqueando, assim, a invasão (JOHN et al., 2004). Estudos semelhantes realizados anteriormente demostraram a importância funcional dos anticorpos anti-MSP-119 espécie-específicos na imunidade antiparasito, nos quais foi observado que anticorpos IgG que reconhecem essa proteína são significativamente eficientes no bloqueio da invasão de eritrócitos por parasitos expressando a MSP-119 homóloga (O’DONNELL et al., 2001; DE KONING-WARD et al., 2003).

O equilíbrio adequado entra a resposta imune anti e pró-inflamatórias são crucias para o prognóstico de resolução ou agravamento da doença. Uma resposta imune pró-inflamatória adequada leva ao ‘clearence” parasitário e consequentemente, a resolução da doença, mas se resposta inflamatória permanecer e se exacerbar, a malária pode evoluir para um quando de agravamento e óbito. Por outro lado, se a resposta for inadequadamente branda, não haverá a “limpeza” do parasito e a doença permanecerá ativa, levando o indivíduo a morte (DUNST et al., 2017). Dentre os fatores imunes contribuintes para uma resposta imune eficiente e adequada estão as citocinas secretadas em resposta a infecção. Já foi demonstrado que altos títulos de

IFN-ɣ e TNF-α no início da infecção agem estimulando macrófagos, células dendríticas e linfócitos T helper a combater a infecção, porém, com o decorrer do tempo, a continuidade descontrolada da resposta imune pode levar ao agravamento da doença (KOBAYASHI et al., 1996; MITCHELL et al., 2005; TCHINDA et al., 2007). Tanto em seres humanos, quanto em modelos animais, altos níveis dessas citocinas contribuem com esse agravamento (GRAU et al., 1989; MSHANA et al., 1991; MANDALA et al., 2017). Durante o processo de resolução da infecção, a resposta imune reguladora é muito importante, suprimindo a resposta imune pró-inflamatória e promovendo a resposta imune anti-inflamatória, favorecendo a homeostase (COUPER et al., 2008, DO ROSARIO e LANGHORNE, 2012). Dentre as citocinas anti-inflamatórias que desempenham importante papel em infecções maláricas, podemos destacar a interleucina 10 (IL-10), que conforme já foi demonstrado, apresenta atividade de supressão inflamatória *in vitro* (PLEBANSKI e HILL., 2000) e na transmissão natural (PORTUGAL et al., 2014). Ainda, estudos com modelos murinos demonstram que animais infectados a administração de IL-10 diminui a susceptibilidade ao desenvolvimento da MC experimental (KOSSODO et al., 1997).

Em nosso estudo, porém, as exposições realizadas 30, 90 e 180 dias antes do desafio pareceram não influenciar na produção tanto de citocinas pró-inflamatórias, como IFN-ɣ e TNF-α, bem como nos níveis da citocina anti-inflamatória, IL-10, nesse modelo de infecção. Nesse caso, os animais que desenvolveram ou não MC após as exposições, apresentaram níveis de tais citocinas semelhantes entre si e aos ao grupo de controle, que não recebeu nenhum tipo de tratamento. Possíveis hipóteses que podem explicar esses resultados são 1) o fato dos animais atualmente criados e disponibilizados pelo CBR da Universidade Federal de Juiz de Fora não serem “germ free”, o que poderia causar o descompasso observados nos níveis de citocinas pesquisados; e 2) outros mediadores inflamatórios como granzimas e perforinas poderiam estar mais associados ao quadro de MC como visto em alguns estudos (NITCHEU 2003; HAQUE et al., 2011; HUGGINS et al., 2017; KAMINSKI et al., 2019). Portanto, essas questões necessitam ser melhor investigadas.

Durante infecções maláricas, um dos principais sinais associados a doença é a esplenomegalia, ela é considerada um marcador de endemicidade para a doença (WHITE et al., 2014) e ocorre por uma maior ativação do baço em resposta a presença do parasito na corrente sanguínea. Os eritrócitos não infectados com deformabilidade reduzida e infectados são opsonizados e levados pelo sangue até o baço, onde são

retidos e destruídos. Nesse sítio ainda ocorre a geração e ativação de linfócitos B e T específicos, com participação de macrófagos e células dendríticas, contribuindo para o aumento do órgão (CHOTIVANICH et al., 2002; ENGWERDA et al., 2005). O baço desempenha importante papel no decorrer da infecção, seres humanos esplenectomizados apresentam maior dificuldade em suprimir a infeção no organismo (BACH et al., 2005; KHO et al., 2019), o mesmo é observado em infecções experimentais em camundongos (QUINN e WYLER, 1980; YADAVA et al., 1996), embora também já tenha sido observado que animais infectados por *P. berghei* apresentem diminuição do agravamento da doença, quando na ausência do baço (DEL PORTILLO et al., 2012). Diante disso, analisamos o índice esplênico, que é dado pela razão entre a massa corporal e a massa do baço. Comparando os índices esplênicos dos animais que desenvolveram MC com os índices dos animais que não apresentaram esse sinal de agravamento, observamos que animais que morreram em decorrência de anemia por hiperparasitemia, por volta do 20º dia após o desafio, apresentaram maiores índices esplênicos quando comparados aos animais que morreram de MC, antes do 10º dia após a infecção, não havendo diferença quanto ao tipo de exposição administrada (homóloga ou heteróloga ao desafio).

Interessantemente, animais que foram desafiados 90 ou 180 dias após a última exposição também apresentaram dados semelhantes, sugerindo que a ativação esplênica ocorra somente após o desafio estando associada a persistência da infecção. O aumento no índice esplênico dos animais hiperparasitêmicos provavelmente se deve ao maior tempo de exposição ao parasito circulante, já que ao longo do período após o desafio, os animais que morreram em decorrência de anemia por hiperparasitemia ficaram expostos ao parasito por muito mais tempo quando comparados aos animais que morreram de MC, aumentando a ativação do baço e consequentemente, sua massa total. Esses dados corroboram estudos seres humanos, os quais demonstraram que a esplenomegalia está mais associada a quadros de anemias grave que a quadros de agravamento neurológico (RANQUE et al., 2008; BUFFET et al., 2009, KOTLYAR et al., 2014), podendo estar ainda associada a retenção de uma fração da biomassa parasitária (SAFEUKUI et al., 2008; KOTLYAR et al., 2014), evitando o sequestro nos capilares cerebrais. Entretanto, em nosso trabalho não foi possível realizar essa associação, visto que não foi avaliada a carga parasitária do baço de animais que não desenvolveram MC em comparação ao que desenvolveram tal síndrome.

Considerando-se que linfócitos T helper ($CD4^+$), T citotóxicos ($CD8^+$) e linfócitos B ($CD19^+$) presentes no baço desempenham um papel importante na proteção e/ou exacerbação das infecções maláricas (KUMAR et al., 1989; YAÑEZ et al., 1999; ENGWERDA et al.,2005) nós investigamos as frequências de tais populações celulares presentes no baço dos animais experimentais após o desafio no dia 30, considerando-se o desfecho clínico MC e MC∅. Observou-se que, a exceção dos linfócitos T helper e linfócitos B ativados, as demais populações avaliadas se mostraram diminuídas nos grupos de animais que não desenvolveram MC em relação ao grupo controle. Uma hipótese para explicar esses resultados seria o exacerbado estímulo do sistema imune mediado pela alta carga parasitária dos animais experimentais. Já foi demonstrado que infecções maláricas levam a diminuição da população de linfócitos CD4+ murinas *in vitro* e que o mecanismo responsável por essa diminuição é mediado por IFN-ɣ e apoptose (HIRUNPETCHARAT e GOOD, 1998; WIPASA et al., 2001; XU et al., 2002, WYKES et al., 2013). A população de linfócitos T $CD8^+$ também é influenciada pela presença dos plasmódios no organismo; infecções por *P. chabaudi*, por exemplo, podem levar a um decréscimo de 50% dessa população entre o 9º e 18º dias após a infeção (HELMBY et al., 2000). A exaustão de linfócitos T $CD8^+$ parasito-específicas durante a malária aguda, que se manifesta pela diminuição da população e perda de função, exacerba a infecção e pode contribuir para sua cronicidade (HORNE-DEBETS et al., 2013). Portanto, ainda existem lacunas a serem compreendidas no que se refere ao papel desses linfócitos para a imunidade antimalárica. A diminuição da população de linfócitos T $CD4^+$ implica na redução da ativação de linfócitos B e, consequentemente na produção de anticorpos (BUTLER et al., 2011), que são extremamente importantes na resposta imune a malária (COHEN et al., 1961, SABCHAREON et al., 1991). Uma observação intrigante obtida em nosso estudo foi o fato de animais hiperparasitêmicos que apresentaram níveis elevados de anticorpos IgG terem sua população de linfócitos B ativadas reduzidas a níveis semelhantes aos verificados em animais nunca expostos a malária.

Além do papel dos linfócitos T $CD4^+$, $CD8^+$ e linfócitos B na corrente sanguínea e no baço durante as infeções maláricas, essas células também desempenham importante papel *in situ* do desenvolvimento da MC (AMANTE et al., 2010). A presença de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ promovem o acúmulo de parasitos nos órgãos, o que é considerado um fator de risco para o agravamento neurológico da malária (SCHOFIELD e GRAU, 2005; MCQUILLAN et al., 2011; WHITE et al., 2014).

Nesse sentido os linfócitos TCD4+ auxiliam no recrutamento de linfócitos TCD8+ através da produção de IFN-ɣ (VILLEGAS – MENDEZ et al., 2012), induzindo-os a secreção de granzimas e perforinas, mediadores fundamentais no desenvolvimento de MC (HAQUE et al., 2011). Realmente, a depleção desses linfócitos no sexto dia após a infeção experimental impede o desenvolvimento MC em camundongos (BELNOUE et al., 2002). Em seres humanos, a presença de linfócitos T CD8 no cérebro já foi associada ao desenvolvimento da MC (RIGGLE et al., 2020). Em nossas análises, observamos de forma qualitativa que os animais que desenvolveram MC apresentaram marcação imunohistoquímica para linfócitos T $CD4^+$, $CD8^+$ e linfócitos B, enquanto animais controle ou que morreram por hiperparasitemia não apresentavam essa marcação. Nossos achados corroboram estudos anteriores que demonstram que o processo de desenvolvimento da MC é mediado, também, por essas populações celulares (AMANTE et al., 2010; RENIA et al., 2006).

De maneira geral, nossos experimentos nos permitiram observar que exposições prévias a parasitos de baixa virulência são capazes de proteger os animais do desenvolvimento da MC experimental murina, porém, mais estudos são necessários no intuito de avaliar o real papel dos anticorpos e de populações celulares *in situ* nessa proteção.

8 CONCLUSÕES

Os resultados presentes neste estudo nos permitem concluir que:

1- A exposição a parasitos não indutores de MC parece ser capaz de ativar processos que protegem contra o desenvolvimento desse quadro;
2- Poucas exposições prévias aos parasitos homólogos ou heterólogos são suficientes para proteger contra MC;
3- A imunidade gerada nas exposições prévias é reduzida ao longo do tempo corroborando estudos prévios sobre a geração defeituosa de células B de memória;
4- Somente mensurar os níveis de anticorpos plasmáticos parasito-específicos pode não ser ideal nas associações com proteção, visto que níveis elevados de anticorpos citofílicos e não citofílicos foram observados tanto em animais que desenvolveram quanto nos protegidos de MC, reafirmando a necessidade de técnicas que meçam a atividade funcional dessas moléculas;
5- Outros mediadores que não somente as citocinas avaliadas nesse estudo podem estar envolvidas nos processos de MC;
6- A ativação esplênica parece ser mediada sobretudo pela persistência da infecção malárica;
7- Animais protegidos da MC apresentam perfil fenotípico no baço e no cérebro distinto daqueles que evoluem para o quadro grave.

9 REFERÊNCIAS

AMANTE, F. H.; HAQUE, A.; STANLEY, A. C.; DE LABASTIDA RIVERA, F.; RANDALL, L. M.; WILSON, Y. A.; ENGWERDA, C. R. Immune-mediated mechanisms of parasite tissue sequestration during experimental cerebral malaria. The Journal of Immunology, 185(6), 3632-3642, 2010.

AMANI, V.; BOUBOU, M. I.; PIED, S.; MARUSSIG, M.; WALLIKER, D.; MAZIER, D.; RÉNIA, L. Cloned lines of *Plasmodium berghei* ANKA differ in their abilities to induce experimental cerebral malaria. Infection and immunity, 66(9), 4093-4099, 1998.

AMANI, V.; VIGÁRIO, A. M.; BELNOUE, E.; MARUSSIG, M.; FONSECA, L.; MAZIER, D.; RÉNIA, L. Involvement of IFN-γ receptor-mediated signaling in pathology and anti-malarial immunity induced by *Plasmodium berghei* infection. European journal of immunology, 30(6), 1646-1655, 2000.

AMINO, R.; THIBERGE, S.; MARTIN, B.; CELLI, S.; SHORTE, S.; FRISCHKNECHT, F.; MÉNARD, R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. Nature medicine, 12(2), 220-224, 2006.

BACH, O.; BAIER, M.; PULLWITT, A.; FOSIKO, N.; CHAGALUKA, G.; KALIMA, M.; MOLYNEUX, M. Falciparum malaria after splenectomy: a prospective controlled study of 33 previously splenectomized Malawian adults. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 99(11), 861-867, 2005.

BAO, L. Q.; NHI, D. M.; HUY, N. T.; KIKUCHI, M.; YANAGI, T.; HAMANO, S.; HIRAYAMA, K. Splenic CD11c (+) cells derived from semi-immune mice protect naïve mice against experimental cerebral malaria. Malaria journal, 14(1), 23, 2015.

BAPTISTA, F. G.; PAMPLONA, A.; PENA, A. C.; MOTA, M. M.; PIED, S.; VIGÁRIO, 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, 78(9), 4033-4039, 2010.

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

BASIR, R.; RAHIMAN, S. S. F.; HASBALLAH, K.; CHONG, W. C.; TALIB, H.; YAM, M. F.; JABBARZARE, M.; TIE, T. H.; OTHMAN, F.; MOKLAS, M. A. M.; ABDULLAH, W. O.; AHMAD, Z. *Plasmodium berghei* ANKA Infection in ICR Mice as a Model of Cerebral Malaria. Iranian J. Parasitol: Vol. 7, No.4, pp. 62-74, 2012.

BASTOS, K. R.; BARBOZA, R.; ELIAS, R. M.; SARDINHA, L. R.; GRISOTTO, M. G.; MARINHO, C. R.; LIMA, M. R. D. I. Impaired macrophage responses may contribute to exacerbation of blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* malaria in interleukin-12-deficient mice. Journal of interferon & cytokine research, 22(12), 1191-1199, 2002.

BEJON, P.; WILLIAMS, T.N.; LILJANDER, A.; NOOR, A.M.; WAMBUA, J.; OGADA, E.; OLOTU, A.; OSIER, F.H.; HAY, S.I.; FÄRNERT, A.; MARSH, K. Stable and

unstable malaria hotspots in longitudinal cohort studies in Kenya. PLoS medicine, v. 7, n. 7, p. 915, 2010.

BELNOUE, E.; KAYIBANDA, M.; VIGARIO, A. M.; DESCHEMIN, J. C.; VAN ROOIJEN, N.; VIGUIER, M.; RÉNIA, L. On the pathogenic role of brain-sequestered αβ CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. The Journal of Immunology, 169(11), 6369-6375, 2002.

BELNOUE, E.; KAYIBANDA, M.; VIGARIO, A. M.; DESCHEMIN, J. C.; VAN ROOIJEN, N.; VIGUIER, M.; RÉNIA, L. On the pathogenic role of brain-sequestered αβ CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. The Journal of Immunology, 169(11), 6369-6375, 2002.

BHATT, S.; WEISS, D. J.; CAMERON, E.; BISANZIO, D.; MAPPIN, B.; DALRYMPLE, U.; BATTLE, K.; MOYES, C. L.; HENRY, A.; ECKHOFF, P. A.; WENGER, E. A.; BRIËT, O.; PENNY, M. A.; SMITH, T. A.; BENNETT, A.; YUKICH, J.; EISELE, T. P.; GRIFFIN, J. T.; FERGUS, C. A.; LYNCH, M.; LINDGREN, F.; COHEN, J. M.; MURRAY, C. J. L; SMITH, D. L.; HAY, S. I.; CIBULSKIS, R. E.; GETHING, P. W. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. Nature, 526(7572), 207-21, 2015.

BIEMBA, G.; DOLMANS, D.; THUMA, P. E.; WEISS, G.; GORDEUK, V. R. Severe anaemia in Zambian children with *Plasmodium falciparum* malaria. Tropical Medicine & International Health, 5(1), 9-16, 2000.

BOUCHAUD, O.; COT, M.; KONY, S.; DURAND, R.; SCHIEMANN, R.; RALAIMAZAVA, P.; DELORON, P. Do African immigrants living in France have long-term malarial immunity? The American journal of tropical medicine and hygiene, 72(1), 21-25, 2005.

BOUSEMA, T.; OKELL, L.; FELGER, I.; DRAKELEY, C. Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. Nature Reviews Microbiology, 12(12), 833-840, 2014.

BOYLE, M. J.; CHAN, J. A.; HANDAYUNI, I.; REILING, L.; FENG, G.; HILTON, A.; BEESON, J. G. IgM in human immunity to Plasmodium falciparum malaria. Science advances, 5(9), eaax4489, 2019.

BRAGA, E.M. e FONTES C. J. F. Plasmodium - Malária. In: NEVES, D. P. Parasitologia Humana. 13 ed. São Paulo: Atheneu, 2016. Cap. 17, p. 159-18.

BRANCUCCI, N. M.; GERDT, J. P.; WANG, C.; DE NIZ, M.; PHILIP, N.; ADAPA, S. R.; LAFFITTE, M. C. Lysophosphatidylcholine regulates sexual stage differentiation in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Cell, 171(7), 1532-1544, 2017.

BRASIL, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controle da Malária. Boletim epidemiológico. Brasília, Número especial, Nov 2020. Em https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/dezembro/03/boletim_especial_malaria_1dez20_final.pdf. Acesso em 05 de jan. de 2020.

BRUÑA-ROMERO, O.; RODRIGUEZ, A. Dendritic cells can initiate protective immune responses against malaria. Infection and immunity, 69(8), 5173-5176, 2001.

BUCKLING, A.; RANFORD-CARTWRIGHT, L. C.; MILES, A.; READ, A. F. Chloroquine increases *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis in vitro. Parasitology, 118(4), 339-346, 1999.

BUFFET, P. A.; SAFEUKUI, I.; MILON, G.; MERCEREAU-PUIJALON, O.; DAVID, P. H. Retention of erythrocytes in the spleen: a double-edged process in human malaria. Current opinion in hematology, 16(3), 157-164, 2009.

BUTLER, N. S.; MOEBIUS, J.; PEWE, L. L.; TRAORE, B.; DOUMBO, O. K.; TYGRETT, L. T.; HARTY, J. T. Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage *Plasmodium* infection. Nature immunology, 13(2), 188-195, 2011.

CARVALHO, L. J. Murine cerebral malaria: how far from human cerebral malaria? Trends in parasitology, 26(6), 271, 2010.

CHEN, Q.; AMALADOSS, A.; YE, W.; LIU, M.; DUMMLER, S.; KONG, F.; WONG, L. H.; LOO, H. L.; LOH, E.; TAN, S. Q.; TAN, T. C. Human natural killer cells control *Plasmodium falciparum* infection by eliminating infected red blood cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, 111(4), 1479-1484, 2014.

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

CHOUDHURY, H. R.; SHEIKH, N. A.; BANCROFT, G. J.; KATZ, D. R.; DE SOUZA, J. B. Early nonspecific immune responses and immunity to blood-stage nonlethal Plasmodium yoelii malaria. Infection and Immunity, 68(11):6127–32. doi:10.1128/IAI.68.11.6127-6132, 2000.

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

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

COHEN, J.; NUSSENZWEIG, V.; VEKEMANS, J.; LEACH, A. From the circumsporozoite protein to the RTS, S/AS candidate vaccine. Human vaccines, 6(1), 90-9, 2010.

COPPI, A.; PINZON-ORTIZ, C.; HUTTER, C.; SINNIS, P. The *Plasmodium* circumsporozoite protein is proteolytically processed during cell invasion. The Journal of experimental medicine, 201(1), 27-33, 2005.

COPPI, A.; TEWARI, R.; BISHOP, J. R.; BENNETT, B. L.; LAWRENCE, R.; ESKO, J. D.; SINNIS, P. Heparan sulfate proteoglycans provide a signal to *Plasmodium* sporozoites to stop migrating and productively invade host cells. Cell host & microbe, 2(5), 316-327, 2007.

COSTA, G.; LOIZON, S.; GUENOT, M.; MOCAN, I.; HALARY, F.; DE SAINT-BASILE, G.; BEHR, C. Control of Plasmodium falciparum erythrocytic cycle: γδ T cells target

the red blood cell–invasive merozoites. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 118(26), 6952-6962, 2011.

COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RILEY, E. M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. The Journal of Immunology, 180(9), 5771-5777, 2008.

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

COWMAN, A. F.; HEALER, J.; MARAPANA, D.; MARSH, K. Malaria: biology and disease. Cell, 167(3), 610-624, 2016.

CRAIG, A. G.; GRAU, G. E.; JANSE, C.; KAZURA, J. W.; MILNER, D.; BARNWELL, J. W.; LANGHORNE, J. The role of animal models for research on severe malaria. PLoS Pathog, 8(2), e1002401, 2012.

DEANE, L.M.; CAUSHY, O.E.; DUNE, M.P. "Notas sobre a distribuição e a biologia dos anofelinos das regiões nordesti· na. e Amazônica do Brasil". Revista do Serviço Especial de Saúde Públlca. 1(4) : 827-965, 1948

DEANE, L. M.; DEANE, M. P.; NETO, J. F. Studies on transmission of simian malaria and on a natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brazil. Bulletin of the World Health Organization, 35(5), 805, 1966.

DEL PORTILLO, H. A.; FERRER, M., BRUGAT, T.; MARTIN-JAULAR, L.; LANGHORNE, J.; LACERDA, M. V. The role of the spleen in malaria. Cellular microbiology, 14(3), 343-355, 2012.

DEKKER, C.; UTHAIPIBULL, C.; CALDER, L. J.; LOCK, M.; GRAINGER, M.; MORGAN, W. D.; HOLDER, A. A. Inhibitory and neutral antibodies to Plasmodium falciparum MSP119 form ring structures with their antigen. Molecular and biochemical

DEROOST, K.; TYBERGHEIN, A.; LAYS, N.; NOPPEN, S.; SCHWARZER, E.; VANSTREELS, E.; JANSE, C. J. Hemozoin induces lung inflammation and correlates with malaria-associated acute respiratory distress syndrome. American journal of respiratory cell and molecular biology, 48(5), 589-600, 2013.

DE KONING-WARD, T. F.; O'DONNELL, R. A.; DREW, D. R.; THOMSON, R.; SPEED, T. P.; CRABB, B. S. A new rodent model to assess blood stage immunity to the Plasmodium falciparum antigen merozoite surface protein 119 reveals a protective role for invasion inhibitory antibodies. The Journal of experimental medicine, 198(6), 869-875, 2003.

DE SOUZA, J. B.; RILEY, E. M. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. Microbes and Infection, 4(3), 291-300, 2002.

DE SOUZA, J. B.; HAFALLA, J. C.; RILEY, E. M.; COUPER, K. N. Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. Parasitology, 137(5), 755-772, 2009.

DEWALICK, S.; AMANTE, F. H.; MCSWEENEY, K. A.; RANDALL, L. M. STANLEY, A. C. HAQUE, A.; KUNS, R. D.; MACDONALD, K. P. A.; HILL, G. R.; ENGWERDA, C. R. Cutting edge: conventional dendritic cells are the critical APC required for the induction of experimental cerebral malaria. The Journal of Immunology, 178(10), 6033-6037, 2007.

DONDORP, A. M.; ANGUS, B. J.; CHOTIVANICH, K.; SILAMUT, K.; RUANGVEERAYUTH, R.; HARDEMAN, M. R.; WHITE, N. J. Red blood cell deformability as a predictor of anemia in severe falciparum malaria. The American journal of tropical medicine and hygiene, 60(5), 733-737, 1999.

DONDORP, A. M.; DESAKORN, V.; PONGTAVORNPINYO, W.; SAHASSANANDA, D.; SILAMUT, K.; CHOTIVANICH, K.; NEWTON, P. N.; PITISUTTITHUM, P.; SMITHYMAN, A. M.; WHITE, N. J.; DAY, N. P. Estimation of the total parasite biomass in acute falciparum malaria from plasma PfHRP2. PLoS Med, 2(8), e204, 2005.

DONDORP, A. M.; INCE, C.; CHARUNWATTHANA, P.; HANSON, J.; KUIJEN, A. V.; FAIZ, M. A.; RUANGVEERAYUT, R. Direct in vivo assessment of microcirculatory dysfunction in severe falciparum malaria. The Journal of infectious diseases, 197(1), 79-84, 2008.

DOROVINI-ZIS, K.; SCHMIDT, K.; HUYNH, H.; FU, W.; WHITTEN, R. O.; MILNER, D.; KAMIZA, S.; MOLYNEUX, M.; TAYLOR, T. E. The neuropathology of fatal cerebral malaria in malawian children. The American journal of pathology, 178(5), 2146-2158, 2011.

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

DOOLAN, D. L.; DOBAÑO, C.; BAIRD, J. K. Acquired immunity to malaria. Clinical microbiology reviews, 22(1), 13-36, 2009.

DOUGLAS, N. M., ANSTEY, N. M., BUFFET, P. A., POESPOPRODJO, J. R., YEO, T. W., WHITE, N. J.; PRICE, R. N. The anaemia of *Plasmodium vivax* malaria. Malaria journal, 11(1), 135, 2012.

DRUILHE, P.; KHUSMITH, S. Epidemiological correlation between levels of antibodies promoting merozoite phagocytosis of Plasmodium falciparum and malaria-immune status. Infection and Immunity, 55(4), 888-891, 1987.

DUNST, J.; KAMENA, F.; MATUSCHEWSKI, K. Cytokines and chemokines in cerebral malaria pathogenesis. Frontiers in cellular and infection microbiology, 7, 324, 2017.

DYER, M.; DAY, K. P. Commitment to gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. Parasitology today, 16(3), 102-107, 2000.

EL-ASSAAD, F.; WHEWAY, J.; MITCHELL, A. J.; LOU, J.; HUNT, N. H.; COMBES, V.; GRAU, G. E. R. Cytoadherence of *Plasmodium berghei*-infected red blood cells to murine brain and lung microvascular endothelial cells in vitro. Infection and Immunity, 81(11), 3984-3991, 2013.

ELLOSO, M. M.; VAN DER HEYDE, H. C.; VANDE WAA, J. A.; MANNING, D. D.; WEIDANZ, W. P. Inhibition of *Plasmodium falciparum* in vitro by human gamma delta T cells. The Journal of Immunology, 153(3), 1187-1194, 1994.

ENGWERDA, C. R.; BEATTIE, L.; AMANTE, F. H. The importance of the spleen in malaria. Trends in parasitology, 21(2), 75-80, 2005.

EPIPHANIO, S.; CAMPOS, M. G.; PAMPLONA, A.; CARAPAU, D.; PENA, A. C.; ATAÍDE, R.; MOTA, M. M. VEGF promotes malaria-associated acute lung injury in mice. PLoS Pathog, 6(5), e1000916, 2010.

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

FARFOUR, E.; CHARLOTTE, F.; SETTEGRANA, C.; MIYARA, M.; BUFFET, P. The extravascular compartment of the bone marrow: a niche for *Plasmodium falciparum* gametocyte maturation? Malaria journal, 11(1), 285, 2012.

FÄRNERT, A.; WYSS, K.; DASHTI, S.; NAUCLER, P. Duration of residency in a non-endemic area and risk of severe malaria in African immigrants. Clinical Microbiology and Infection, 21(5), 494-501, 2015.

FARRINGTON, L.; VANCE, H.; REK, J.; PRAHL, M.; JAGANNATHAN, P.; KATUREEBE, A.; FEENEY, M. E. Both inflammatory and regulatory cytokine responses to malaria are blunted with increasing age in highly exposed children. Malaria journal, 16(1), 1-11, 2017.

FLORES-GARCIA, Y.; NASIR, G.; HOPP, C. S.; MUNOZ, C.; BALABAN, A. E.; ZAVALA, F.; SINNIS, P. Antibody-mediated protection against *Plasmodium sporozoites* begins at the dermal inoculation site. MBio, 9(6), e02194-18, 2018.

FRANKE-FAYARD, B.; JANSE, C. J.; CUNHA-RODRIGUES, M.; RAMESAR, J.; BÜSCHER, P.; QUE, I.; WATERS, A. P. Murine malaria parasite sequestration: CD36 is the major receptor, but cerebral pathology is unlinked to sequestration. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102(32), 11468-11473, 2005.

FRIBOURG-BLANC, A.; DRUILHE, P.; BRASSEUR, P.; RHODES-FEUILLETTE, A.; BALLET, J. J.; THARAVANIJ, S. Immunological evaluation of cell-mediated and humoral immunity in Thai patients with cerebral and non cerebral Plasmodium falciparum malaria: II. Evolution of serum levels of immunoglobulins, antimalarial antibodies, complement fractions and alpha interferon. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 16(2), 307-313, 1985.

FRIESEN, J.; SILVIE, O.; PUTRIANTI, E. D.; HAFALLA, J. C.; MATUSCHEWSKI, K.; BORRMANN, S. Natural immunization against malaria: causal prophylaxis with antibiotics. Science translational medicine, 2(40), 40ra49-40ra49, 2010.

GHAZANFARI, N.; MUELLER, S. N.; HEATH, W. R. Cerebral malaria in mouse and man. Frontiers in immunology, 9, 2018.

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, 6(9), e24398, 2011.

GILSON, P. R. e CRABB, B. S. Morphology and kinetics of the three distinct phases of red blood cell invasion by Plasmodium falciparum merozoites. International journal for parasitology, 39(1), 91-96, 2009.

GOH, Y. S.; MCGUIRE, D.; RÉNIA, L. Vaccination with sporozoites: models and correlates of protection. Frontiers in immunology, 10, 1227, 2019.

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, 23, 69-99, 2005.

GOOD, M. F.; REIMAN, J. M.; RODRIGUEZ, I. B.; ITO, K.; YANOW, S. K.; EL-DEEB, I. M.; BATZLOFF, M. R.; STANISIC, D. I.; ENGWERDA, C.; SPITHILL, T.; HOFFMAN, S. L.; LEE, M.; MCPHUN, V. Cross-species malaria immunity induced by chemically attenuated parasites. The Journal of clinical investigation, 123(8), 3353-3362, 2013.

GRAU, G.E.; TAYLOR, T.E.; MOLYNEUX; M.E.; WIRIMA, J.J.; VASSALLI, P.; HOMMEL, M.; LAMBERT P.H. Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. N Engl J Med 320:1586 –1591, 1989.

GRIGNARD, L.; SHAH, S.; CHUA, T. H.; WILLIAM, T.; DRAKELEY, C. J.; FORNACE, K. M. Natural human infections with *Plasmodium cynomolgi* and other malaria species in an elimination setting in Sabah, Malaysia. *The Journal of infectious diseases*, *220*(12), 1946-1949, 2019.

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

GUEVARA PATIÑO, J. A.; HOLDER, A. A.; MCBRIDE, J. S.; BLACKMAN, M. J. Antibodies that inhibit malaria merozoite surface protein–1 processing and erythrocyte invasion are blocked by naturally acquired human antibodies. The Journal of experimental medicine, 186(10), 1689-1699,1997.

GWADZ, R. W. Malaria, succesful immunization against the sexual stages of Plasmodium gallinai cum. Science, 193, 1150-1151, 1976.

HAQUE, A.; BEST, S. E.; UNOSSON, K.; AMANTE, F. H.; DE LABASTIDA, F.; ANSTEY, N. M.; ENGWERDA, C. R. Granzyme B expression by CD8+ T cells is required for the development of experimental cerebral malaria. The Journal of Immunology, 186(11), 6148-6156, 2011.

HART, G. T.; TRAN, T. M.; THEORELL, J.; SCHLUMS, H.; ARORA, G.; RAJAGOPALAN, S.; LONG, E. O. Adaptive NK cells in people exposed to *Plasmodium falciparum* correlate with protection from malaria. Journal of Experimental Medicine, 216(6), 1280-1290, 2019.

HELEGBE, G. K.; HUY, N. T.; YANAGI, T.; SHUAIBU, M. N.; YAMAZAKI, A.; KIKUCHI, M.; HIRAYAMA, K. Rate of red blood cell destruction varies in different strains of mice

infected with Plasmodium berghei-ANKA after chronic exposure. Malaria journal, 8(1), 1-13, 2009.

HELMBY, H.; JÖNSSON, G.; TROYE-BLOMBERG, M. Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi AS*. Infection and immunity, 68(3), 1485-1490, 2000.

HERNÁNDEZ-CASTAÑEDA, M. A.; HAPP, K., CATTALANI, F.; WALLIMANN, A.; BLANCHARD, M.; FELLAY, I.; WALCH, M. γδ T Cells Kill *Plasmodium falciparum* in a Granzyme-and Granulysin-Dependent Mechanism during the Late Blood Stage. The Journal of Immunology, 204(7), 1798-1809, 2020.

HILL, D. L.; SCHOFIELD, L.; WILSON, D. W. IgG opsonization of merozoites: multiple immune mechanisms for malaria vaccine development. International journal for parasitology, 47(10-11), 585-595, 2017.

HIRUNPETCHARAT, C.; GOOD, M. F. Deletion of Plasmodium berghei-specific CD4+ T cells adoptively transferred into recipient mice after challenge with homologous parasite. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95(4), 1715-1720, 1998.

HO, M.; TONGTAWE, P.; KRIANGKUM, J.; WIMONWATTRAWATEE, T.; PATTANAPANYASAT, K.; BRYANT, L.; WEBSTER, H. K. Polyclonal expansion of peripheral gamma delta T cells in human *Plasmodium falciparum* malaria. Infection and Immunity, 62(3), 855-862, 1994.

HORNE-DEBETS, J. M.; FALEIRO, R.; KARUNARATHNE, D. S.; LIU, X. Q.; LINEBURG, K. E.; POH, C. M.; WYKES, M. N. PD-1 dependent exhaustion of CD8+ T cells drives chronic malaria. Cell reports, 5(5), 1204-1213, 2013.

HOROWITZ, A.; NEWMAN, K. C.; EVANS, J. H.; KORBEL, D. S.; DAVIS, D. M.; RILEY, E. M. Cross-talk between T cells and NK cells generates rapid effector responses to *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. The Journal of Immunology, 184(11), 6043-6052, 2010.

HOWARD, J.; LOIZON, S.; TYLER, C. J.; DULUC, D.; MOSER, B.; MECHAIN, M.; MAMANI-MATSUDA, M. The antigen-presenting potential of Vγ9Vδ2 T cells during *Plasmodium falciparum* blood-stage infection. The Journal of Infectious Diseases, 215(10), 1569-1579, 2017.

HUGGINS, M. A.; JOHNSON, H. L.; JIN, F.; AURELIE, N.; HANSON, L. M.; LAFRANCE, S. J.; JOHNSON, A. J. Perforin expression by CD8 T cells is sufficient to cause fatal brain edema during experimental cerebral malaria. Infection and immunity, 85(5), 2017.

HUNT, N. H.; GRAU, G. E. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. Trends in immunology, 24(9), 491-499, 2003.

IDRO, R.; NDIRITU, M.; OGUTU, B.; MITHWANI, S.; MAITLAND, K.; BERKLEY, J.; CRAWLEY, J.; FEGAN, G.; BAUNI, E.; PESHU, N.; MARSH, K.; NEVILLE, B.; NEWTON, C.; MARSH, K. Burden, features, and outcome of neurological involvement in acute falciparum malaria in Kenyan children. Jama, 297(20), 2232-2240, 2007.

IHEKWEREME, C. P.; ESIMONE, C. O.; NWANEGBO, E. C. Hemozoin inhibition and control of clinical malaria. Advances in pharmacological sciences, 2014.

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

JAGANNATHAN, P.; KIM, C. C.; GREENHOUSE, B.; NANKYA, F.; BOWEN, K.; ECCLES-JAMES, I.; FEENEY, M. E. Loss and dysfunction of Vδ2+ γδ T cells are associated with clinical tolerance to malaria. Science translational medicine, 6(251), 251ra117-251ra117, 2014.

JAKEMAN, G. N.; SAUL, A.; HOGARTH, W. L.; COLLINS, W. E. Anaemia of acute malaria infections in non-immune patients primarily results from destruction of uninfected erythrocytes. Parasitology, 119(2), 127-133, 1999.

JOHN, C. C.; BANGIRANA, P.; BYARUGABA, J.; OPOKA, R. O.; IDRO, R.; JUREK, A. M.; WU, B.; BOIVIN, M. J. Cerebral malaria in children is associated with long-term cognitive impairment. Pediatrics, 122(1), e92-e99, 2008.

JOHN, C. C.; O'DONNELL, R. A.; SUMBA, P. O.; MOORMANN, A. M.; DE KONING-WARD, T. F.; KING, C. L.; CRABB, B. S. Evidence that invasion-inhibitory antibodies specific for the 19-kDa fragment of merozoite surface protein-1 (MSP-119) can play a protective role against blood-stage *Plasmodium falciparum* infection in individuals in a malaria endemic area of Africa. The Journal of Immunology, 173(1), 666-672, 2004.

KAMINSKI, L.; RIEHN, M.; ABEL, A.; STEEG, C.; YAR, D. D.; ADDAI-MENSAH, O.; MACKROTH, M. S. Cytotoxic T Cell-Derived Granzyme B Is Increased in Severe Plasmodium Falciparum Malaria. Frontiers in Immunology, 10, 2917, 2019.

KESTER, K. E.; CUMMINGS, J. F.; OFORI-ANYINAM, O.; OCKENHOUSE, C. F.; KRZYCH, U.; MORIS, P.; SCHWENK, R.; NIELSEN, R. A.; DEBEBE, Z.; PINELIS, E.; WILLIAMS, J. L.; DOWLER, M.; STEWART, A.; WIRTZ, R. A.; DUBOIS, M. C.; LIEVENS; COHEN, J.; BALLOU, W. R.; HEPPNER, JR. D. G.; RTS,S Vaccine Evaluation Group. Randomized, double-blind, phase 2a trial of falciparum malaria vaccines RTS, S/AS01B and RTS, S/AS02A in malaria-*naive* adults: safety, efficacy, and immunologic associates of protection. Journal of Infectious Diseases, 200(3), 337-346, 2009.

KHO, S.; ANDRIES, B.; POESPOPRODJO, J. R.; COMMONS, R. J.; SHANTI, P. A.; KENANGALEM, E.; PRICE, R. N. High risk of Plasmodium vivax malaria following splenectomy in Papua, Indonesia. Clinical Infectious Diseases, 68(1), 51-60, 2019.

KOBAYASHI, F.; MORII, T.; MATSUI, T.; FUJINO, T.; TSUJI, M.; WATANABE, Y.; WEIDANZ, W. P. Production of interleukin 10 during malaria caused by lethal and nonlethal variants of *Plasmodium yoelii yoelii*. Parasitology research, 82(5), 385-31, 1996.

KOTLYAR, S.; NTEZIYAREMYE, J.; OLUPOT-OLUPOT, P.; AKECH, S. O.; MOORE, C. L.; MAITLAND, K. Spleen volume and clinical disease manifestations of severe

Plasmodium falciparum malaria in African children. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 108(5), 283-289, 2014.

KOSSODO, S.; MONSO, C.; JUILLARD, P.; VELU, T.; GOLDMAN, M.; GRAU, G. E. Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria. Immunology, 91(4), 536-540, 1997.

KUMAR, S.; GOOD, M. F.; DONTFRAID, F.; VINETZ, J. M.; MILLER, L. H. Interdependence of CD4+ T cells and malarial spleen in immunity to Plasmodium vinckei vinckei. Relevance to vaccine development. The Journal of Immunology, 143(6), 2017-2023, 1989.

LACKNER, P.; BEER, R.; HEUSSLER, V.; GOEBEL, G.; RUDZKI, D.; HELBOK, R., SCHMUTZHARD, E. Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. Neuropathology and Applied Neurobiology, 32(2), 177–188. 2006.

LAMIKANRA, A. A.; BROWN, D.; POTOCNIK, A.; CASALS-PASCUAL, C.; LANGHORNE, J.; ROBERTS, D. J. Malarial anemia: of mice and men. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 110(1), 18-28, 2007.

LONG, C. A. e ZAVALA, F. Malaria vaccines and human immune responses. Current opinion in microbiology, 32, 96-102, 2016.

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

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

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265, 1951.

MANDALA, W. L.; MSEFULA, C. L.; GONDWE, E. N.; DRAYSON, M. T.; MOLYNEUX, M. E.; MACLENNAN, C. A. Cytokine profiles in Malawian children presenting with uncomplicated malaria, severe malarial anemia, and cerebral malaria. Clinical and vaccine immunology, 24(4), 2017.

MAJARIAN, W. R.; DALY, T. M.; WEIDANZ, W. P.; LONG, C. A. Passive immunization against murine malaria with an IgG3 monoclonal antibody. The Journal of Immunology, 132(6), 3131-3137, 1984.

MATSUOKA, H.; YOSHIDA, S.; HIRAI, M.; ISHII, A. A rodent malaria, *Plasmodium berghei*, is experimentally transmitted to mice by merely probing of infective mosquito, Anopheles stephensi. Parasitology international, 51(1), 17-23, 2002.

MAVOUNGOU, E.; LUTY, A. J.; KREMSNER, P. G. Natural killer (NK) cell-mediated cytolysis of *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells in vitro. European cytokine network, 14(3), 134-142, 2003.

MAYXAY, M.; PUKRITTAYAKAMEE. S.; NEWTON, P.N.; WHITE, N. J.; Mixed-species malaria infections in humans. Trends in parasitology, v. 20, n. 5, p. 233-240, 200.

MCQUILLAN, J. A.; MITCHELL, A. J.; HO, Y. F.; COMBES, V.; BALL, H. J.; GOLENSER, J.; HUNT, N. H. Coincident parasite and CD8 T cell sequestration is required for development of experimental cerebral malaria. International journal for parasitology, 41(2), 155-163, 2011.

MEDICA, D. L. e SINNIS, P. Quantitative dynamics of *Plasmodium yoelii* sporozoite transmission by infected anopheline mosquitoes. Infection and immunity, 73(7), 4363-4369, 2005.

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

MILNER JR, D. A.; LEE, J. J.; FRANTZREB, C.; WHITTEN, R. O.; KAMIZA, S.; CARR, R. A.; TAYLOR, T. E. Quantitative assessment of multiorgan sequestration of parasites in fatal pediatric cerebral malaria. The Journal of infectious diseases, 212(8), 1317-1321, 2015.

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

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

MITCHELL, A. J.; HANSEN, A. M.; HEE, L.; BALL, H. J.; POTTER, S. M.; WALKER, J. C.; HUNT, N. H. Early cytokine production is associated with protection from murine cerebral malaria. Infection and immunity, 73(9), 5645-5653., 2005

MORDMÜLLER, 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.; IBÁÑEZ, J.; SULYOK, M.; JAMES, E. R.; BILLINGSLEY, P.F.; NATASHA, K. C.; 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.; SIM, B. K. L.; HOFFMAN, S. L.; KREMSNER, P. G. Sterile protection against human malaria by chemoattenuated PfSPZ vaccine. Nature, 542(7642), 445-449, 2017.

MORENO, A.; CABRERA-MORA, M.; GARCIA, A.; ORKIN, J.; STROBERT, E.; BARNWELL, J. W.; GALINSKI, M. R. *Plasmodium coatneyi* in rhesus macaques replicates the multisystemic dysfunction of severe malaria in humans. Infection and immunity, 81(6), 1889-1904, 2013.

MOTA, M. M.; PRADEL, G.; VANDERBERG, J. P.; HAFALLA, J. C.; FREVERT, U.; NUSSENZWEIG, R. S.; RODRÍGUEZ, A. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. Science, 291(5501), 141-144, 2001.

MOTA, M. M., HAFALLA, J. C., & RODRIGUEZ, A. Migration through host cells activates *Plasmodium* sporozoites for infection. Nature medicine, 8(11), 1318-1322, 2002.

MSHANA, R.N.; BOULANDI, J.; MSHANA, N.M.; MAYOMBO, J.; MENDOME, G. Cytokines in the pathogenesis of malaria: levels of IL-I beta, IL-4, IL-6, TNF-alpha and IFN-gamma in plasma of healthy individuals and malaria patients in a holoendemic area. J Clin Lab Immunol 34:131–139, 1991.

MUELLER, M. S.; RENARD, A.; BOATO, F.; VOGEL, D.; NAEGELI, M.; ZURBRIGGEN, R.; ROBINSON, J. A.; PLUSCHKE, G. Induction of parasite growth-inhibitory antibodies by a virosomal formulation of a peptidomimetic of loop I from domain III of Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1. Infection and immunity, 71(8), 4749-4758, 2003.

MUELLER, A. K.; CAMARGO, N.; KAISER, K.; ANDORFER, C.; FREVERT, U.; MATUSCHEWSKI, K.; KAPPE, S. H. Plasmodium liver stage developmental arrest by depletion of a protein at the parasite–host interface. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102(8), 3022-3027, 2005.

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

NACER, A.; MOVILA, A.; BAER, K.; MIKOLAJCZAK, S. A.; KAPPE, S. H.; FREVERT, U. Neuroimmunological blood brain barrier opening in experimental cerebral malaria. PLoS Pathog, 8(10), e1002982, 2012.

NAHRENDORF, W.; SPENCE, P. J.; TUMWINE, I.; LEVY, P.; JARRA, W.; SAUERWEIN, R. W.; LANGHORNE, J. Blood-stage immunity to *Plasmodium chabaudi* malaria following chemoprophylaxis and sporozoite immunization. Elife, 4, e05165, 2015.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. Nature, 420(6917), 846-852, 2002.

NAQVI, R.; AKHTAR, F.; AHMED, E.; SHEIKH, R.; BHATTI, S.; HAIDER, A.; NAQVI A.; RIZVI, A. Malarial acute kidney injury: 25 years experience from a center in an endemic region. Journal of Advances in Medicine and Medical Research, 1-6, 2016.

NEAFSEY, D. E.; JURASKA, M.; BEDFORD, T.; BENKESER, D.; VALIM, C.; GRIGGS, A.; LIEVENS, M.; ABDULLA, S.; ADJEI, S.; AGBENYEGA, T.; AGNANDJI, S. T.; AIDE, P.; ANDERSON, S.; ANSONG, D.; APONTE, J, J.; ASANTE, K. P.; BEJON, P.; BIRKETT, A. J.; BRULS, M.; CONNOLLY, K, M.; D'ALESSANDRO, U.; DOBAÑO, C.; GESASE,S.; GREENWOOD, B.; GRIMSBY, J.; TINTO, J.; HAMEL, M. J.; HOFFMAN, I.; KAMTHUNZI, P.; KARIUKI, S.; KREMSNER, P. G.; LEACH,A.; LELL, B.; N,J.; LUSINGU, J.; KEVIN MARSH, K.; MARTINSON, F.; MOLEL, J. T.; MOSS, E. L.; NJUGUNA, P.; OCKENHOUSE, C. F.; OGUTU, B. R.; OTIEN, W.; OTIENO, L.; OTIENO, K.; OWUSU-AGYEI, S.; PARK, D. J.; PELLÉ, K.;ROBBINS, D.; RUSS, C.; RYAN, E. M.;SACARLAL, J.; SOGOLOFF, B.; SORGHO, H.; TANNER, M.;THEANDER, T.; VALEA, I.;VOLKMAN, S. K.; YU, Q.; LAPIERRE, D.; BIRREN, B. W.; GILBERT, P. B.; e WIRTH, D. F. Genetic diversity and protective efficacy of the

RTS, S/AS01 malaria vaccine. New England Journal of Medicine, 373(21), 2025-2037, 2015.

NITCHEU, J.; BONDUELLE, O.; COMBADIERE, C.; TEFIT, M.; SEILHEAN, D.; MAZIER, D.; COMBADIERE, B. Perforin-dependent brain-infiltrating cytotoxic CD8+ T lymphocytes mediate experimental cerebral malaria pathogenesis. The Journal of Immunology, 170(4), 2221-2228, 2003.

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, 24(6), 570, 2011.

O'DONNELL, R. A.; DE KONING-WARD, T. F.; BURT, R. A.; BOCKARIE, M.; REEDER, J. C.; COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-119 are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. The Journal of experimental medicine, 193(12), 1403-1412, 2001.

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

OLOTU, A.; FEGAN, G.; WAMBUA, J.; NYANGWESO, G.; LEACH, A.; LIEVENS, M.; KASLOW D.C.; NJUGUNA, P.; MARSH, K.; BEJON, P. Seven-year efficacy of RTS, S/AS01 malaria vaccine among young African children. New England Journal of Medicine, 374(26), 2519-2529, 2016.

ONWUAMAH, C. K.; AGOMO, P. U.; ODEIGAH, P. G. Mouse mortality from a high *Plasmodium berghei* inoculum density may be due to immune suppression in the host. International Journal of Medicine and Medical Sciences, 2(5), 162-166, 2010.

PENG, X.; KEITANY, G. J.; VIGNALI, M.; CHEN, L.; GIBSON, C.; CHOI, K.; HUANG, F.; WANG, R. Artesunate versus Chloroquine Infection–Treatment–Vaccination Defines Stage-Specific Immune Responses Associated with Prolonged Sterile Protection against Both Pre-erythrocytic and Erythrocytic *Plasmodium yoelii* Infection. The Journal of Immunology, 193(3), 1268-1277, 2014.

PERERA, M. K.; CARTER, R.; GOONEWARDENE, R.; MENDIS, K. N. Transient increase in circulating gamma/delta T cells during *Plasmodium vivax* malarial paroxysms. The Journal of experimental medicine, 179(1), 311-315,1994.

PERSSON, K. E.; LEE, C. T.; MARSH, K.; BEESON, J. G. Development and optimization of high-throughput methods to measure *Plasmodium falciparum*-specific growth inhibitory antibodies. *Journal of clinical microbiology*, *44*(5), 1665-1673, 2006.

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. The Journal of clinical investigation, 120(8), 2967. 2010.

PISTONE, T.; DIALLO, A.; MECHAIN, M.; RECEVEUR, M. C.; MALVY, D. Epidemiology of imported malaria give support to the hypothesis of 'long-term'semi-

immunity to malaria in sub-Saharan African migrants living in France. Travel medicine and infectious disease, 12(1), 48-53, 2014.

PLEBANSKI, M.; HILL, A. V. The immunology of malaria infection. Current opinion in immunology, 12(4), 437-441, 2000.

PONSFORD, M. J.; MEDANA, I. M.; PRAPANSILP, P.; HIEN, T. T.; LEE, S. J.; DONDORP, A. M.; TURNER, G. D. Sequestration and microvascular congestion are associated with coma in human cerebral malaria. Journal of Infectious Diseases, 205(4), 663-671, 2012.

PORTUGAL, S.; MOEBIUS, J.; SKINNER, J.; DOUMBO, S.; DOUMTABE, D.; KONE, Y.; CROMPTON, P. D. Exposure-dependent control of malaria-induced inflammation in children. PLoS Pathog, 10(4), e1004079., 2014.

PRICE, R. N.; SIMPSON, J. A.; NOSTEN, F.; LUXEMBURGER, C.; HKIRJAROEN, L.; TER KUILE, F. E. I. K. O.; CHONGSUPHAJAISIDDHI, T.; WHITE, N. J. Factors contributing to anemia after uncomplicated falciparum malaria. The American journal of tropical medicine and hygiene, 65(5), 614-622, 2001.

QUINN, T. C.; WYLER, D. J. Resolution of acute malaria (*Plasmodium berghei* in the rat): reversibility and spleen dependence. The American journal of tropical medicine and hygiene, 29(1), 1-4, 1980.

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

RANQUE, S.; POUDIOUGOU, B.; TRAORÉ, A.; KEITA, M.; OUMAR, A. A.; SAFEUKUI, I.; DOUMBO, O. K. Life-threatening malaria in African children: a prospective study in a mesoendemic urban setting. The Pediatric infectious disease journal, 27(2), 130-135, 2008.

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

RÉNIA, L.; POTTER, S. M.; MAUDUIT, M.; ROSA, D. S.; KAYIBANDA, M.; DESCHEMIN, J. C.; GRÜNER, A. C. Pathogenic T cells in cerebral malaria. International journal for parasitology, 36(5), 547-54, 2006.

RICHARDS, J. S., STANISIC, D. I., FOWKES, F. J., TAVUL, L., DABOD, E., THOMPSON, J. K., KUMAR, S.; CHITNIS, C. E.; NARUM, D L.; MICHON, P.; SIBA, P. M.; COWMAN, A. F.; MUELLER, I.; BEESON, J. G. Association between naturally acquired antibodies to erythrocyte-binding antigens of *Plasmodium falciparum* and protection from malaria and high-density parasitemia. Clinical Infectious Diseases, 51(8), e50-e60, 2010.

RIBOT, J. C.; NERES, R.; ZUZARTE-LUÍS, V.; GOMES, A. Q.; MANCIO-SILVA, L.; MENSURADO, S.; PAMPLONA, A. γδ-T cells promote IFN-γ–dependent *Plasmodium*

pathogenesis upon liver-stage infection. Proceedings of the National Academy of Sciences, 116(20), 9979-9988, 2019.

RIBOT, J. C.; LOPES, N.; SILVA-SANTOS, B. γδ T cells in tissue physiology and surveillance. Nature Reviews Immunology, 1-12, 2020.

RIGGLE, B. A.; MANGLANI, M.; MARIC, D. JOHNSON, K. R.; LEE, M. H.; NETO, O. L. A.; PIERCE, S. K. CD8+ T cells target cerebrovasculature in children with cerebral malaria. The Journal of clinical investigation, 130(3), 1128-1138, 2020.

REST, J. R. Cerebral malaria in inbred mice. I. A new model and its pathology. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 76(3), 410-415. 1982.

RODRIGUEZ-BARRAQUER, I.; ARINAITWE, E.; JAGANNATHAN, P.; KAMYA, M. R.; ROSENTHAL, P. J.; REK, J.; GREENHOUSE, B. Quantification of anti-parasite and anti-disease immunity to malaria as a function of age and exposure. Elife, 7, e35832, 2018.

ROESTENBERG, M.; TEIRLINCK, A. C.; MCCALL, M. B.; TEELEN, K.; MAKAMDOP, K. N.; WIERSMA, J.; ARENS, T.; BECKERS, P.; VAN GEMERT, G.; VAN DE VEGTE-BOLMER, M.; VAN DER VEN, A. J.; LUTY, A. J. F.; HERMSEN, C. C.; R, W. Long-term protection against malaria after experimental sporozoite inoculation: an open-label follow-up study. The Lancet, 377(9779), 1770-1776, 2011.

ROTMAN, H. L.; DALY, T. M.; CLYNES, R.; LONG, C. A. Fc receptors are not required for antibody-mediated protection against lethal malaria challenge in a mouse model. The Journal of Immunology, 161(4), 1908-1912, 1998.

DO ROSARIO, A. P. F.; LANGHORNE, J. T cell-derived IL-10 and its impact on the regulation of host responses during malaria. International journal for parasitology, 42(6), 549-555, 2012.

ROUSSILHON, C., OEUVRAY, C., MÜLLER-GRAF, C., TALL, A., ROGIER, C., TRAPE, J. F., THEISEN, M.; BALDE, A.; PÉRIGNON, J. L.; DRUILHE, P. Long-term clinical protection from falciparum malaria is strongly associated with IgG3 antibodies to merozoite surface protein 3. PLoS Med, 4(11), e320, 2007.

Rts, S. C. T. P. 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 randomised, controlled trial. The Lancet, 386(9988), 31-45, 2015.

RYG-CORNEJO, V.; NIE, C. Q.; BERNARD, N. J.; LUNDIE, R. J.; EVANS, K. J.; CRABB, B. S. NK cells and conventional dendritic cells engage in reciprocal activation for the induction of inflammatory responses during Plasmodium berghei ANKA infection. Immunobiology, 218(2):263–71, 2013.

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

SACHS, J.; MALANEY, P. The economic and social burden of malaria. Nature, 415(6872), 680-685, 2002.

SAFEUKUI, I.; CORREAS, J. M.; BROUSSE, V.; HIRT, D.; DEPLAINE, G.; MULÉ, S.; BUFFET, P. A. Retention of *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocytes in the slow, open microcirculation of the human spleen. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 112(6), 2520-2528, 2008.

SAUL, A. Mosquito stage, transmission blocking vaccines for malaria. Current opinion in infectious diseases, 20(5), 476-481, 2007.

SCHATS, R. Safety and efficacy after immunization with *Plasmodium falciparum* sporozoites in the controlled human malaria infection model, 2019.

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

SEVERE MALARIA. Tropical Medicine and International Health 19, Supplement 1, November 2014.

Shanks, G. D. Tolerance may be more appropriate than immunity when describing chronic malaria infections. The American journal of tropical medicine and hygiene, 100(3), 497-500, 2019.

SHIKANI, H. J.; FREEMAN, B. D.; LISANTI, M. P.; WEISS, L. M.; TANOWITZ, H. B.; DESRUISSEAUX, M. S. Cerebral Malaria: We Have Come a Long Way. The American Journal of Pathology, Vol. 181, No. 5, 2012.

SHIN, S. C. J.; VANDERBERG, J. P.; TERZAKIS, J. A. Direct infection of hepatocytes by sporozoites of Plasmodium berghei 1. The Journal of protozoology, 29(3), 448-454., 1982.

SILVESTRINI, F.; ALANO, P.; WILLIAMS, J. L. Commitment to the production of male and female gametocytes in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Parasitology, 121.5: 465-471, 2000.

SIMMONS, R. A.; MBOERA, L.; MIRANDA, M. L.; MORRIS, A.; STRESMAN, G.; TURNER, E. L.; O'MEARA, W. P. A longitudinal cohort study of malaria exposure and changing serostatus in a malaria endemic area of rural Tanzania. Malaria journal, 16(1), 309, 2017.

SKWARCZYNSKI, M.; CHANDRUDU, S.; RIGAU-PLANELLA, B.; ISLAM, M.; CHEONG, Y. S.; LIU, G.; WANG, X.; TOTH, I.; HUSSEIN, W. M. Progress in the Development of Subunit Vaccines against Malaria. Vaccines, 8(3), 373, 2020.

SMITH, E. C. e TAYLOR-ROBINSON, A. W. Parasite-specific immunoglobulin isotypes during lethal and non-lethal murine malaria infections. Parasitology research, 89(1), 26-33, 2002.

SYNKA, M, E.; BANGS, M. J.; MANGUIN, S.; RUBIO-PALIS, Y.; CHAREONVIRIYAPHAP, T.; COETZEE, M.; MBOGO, C. M.; HEMINGWAY, J.; PATIL

A, P.; TEMPERLEY, W. H. A global map of dominant malaria vectors. Parasite Vectors 5: 69, 2012.

SPRING, M. D.; CUMMINGS, J. F.; OCKENHOUSE, C. F.; DUTTA, S.; REIDLER, R.; ANGOV, E.; BERGMANN-LEITNER, E.; STEWART, V. A.; BITTNER, S.; JUOMPAN, L.; KORTEPETER,M. G.; NIELSEN, R.; KRZYCH, U.; TIERNEY, E.; WARE, L.A.; DOWLER, M.; HERMSEN, C. C.; SAUERWEIN, R. W.; DE VLAS, S. J.; OFORI-ANYINAM, O.; LANAR, D. E.; WILLIAMS, J. L.; KESTER, K. E.;TUCKER, K.;SHI, M.; MALKIN, E.; LONG, C.; DIGGS, C. L.; SOISSON, L.; DUBOIS, M. C.; BALLOU, W. R.; COHEN, J.; HEPPNER JR., D. G . Phase 1/2a study of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen-1 (AMA-1) administered in adjuvant system AS01B or AS02A. PloS one, 4(4), e5254, 2009.

STANISIC, D. I.; CUTTS, J.; ERIKSSON, E.; FOWKES, F. J.; ROSANAS-URGELL, A.; SIBA, P.; SCHOFIELD, L. γδ T cells and CD14+ monocytes are predominant cellular sources of cytokines and chemokines associated with severe malaria. The Journal of infectious diseases, 210(2), 295-305, 2014.

STANISIC, D. I. e GOOD, M. F. Whole organism blood stage vaccines against malaria. Vaccine, 33(52), 7469-7475, 2015.

STEGMANN, K. A.; DE SOUZA, J. B.; RILEY, E. M. IL-18-induced expression of high-affinity IL-2R on murine NK cells is essential for NK-cell IFN-γ production during murine *Plasmodium yoelii* infection. European journal of immunology, 45(12), 3431-3440, 2015.

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

SU, Z. e STEVENSON, M. M. Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. Infection and immunity, 68(8), 4399-4406, 2000.

TAKALA, S. L. e PLOWE, C. V. Genetic diversity and malaria vaccine design, testing and efficacy: preventing and overcoming ‘vaccine resistant malaria’. Parasite immunology, 31(9), 560-573, 2009.

TALAAT, K. R.; ELLIS, R. D.; HURD, J.; HENTRICH, A.; GABRIEL, E.,;HYNES, N. A.; RAUSCH, K. M.; ZHU, D.; MURATOVA, O.; ANDERSON, C.; HERRERA, R.; JONES, D.; AEBIG, J; BROCKLEY, S.; MACDONALD, N. J.; WANG, X.; FAY, M. P.; HEALY, S. A.; DURBIN, A. P.; NARUM, D. L.; WU, Y.; DUFFY, P. E. Safety and immunogenicity of Pfs25-EPA/Alhydrogel®, a transmission blocking vaccine against *Plasmodium falciparum*: an open label study in malaria naïve adults. PloS one, 11(10), e0163144, 2016.

TAYLOR, R. R.; ALLEN, S. J.; GREENWOOD, B. M.; RILEY, E. M. IgG3 antibodies to Plasmodium falciparum merozoite surface protein 2 (MSP2): increasing prevalence with age and association with clinical immunity to malaria. The American journal of tropical medicine and hygiene, 58(4), 406-413, 1998.

TAYLOR, W. R.; HANSON, J.; TURNER, G. D.; WHITE, N. J.; DONDORP, A. M. Respiratory manifestations of malaria. Chest, 142(2), 492-505, 2012.

TCHINDA, V. H.; TADEM, A. D. TAKO, E. A.; TENE, G.; FOGAKO, J.; NYONGLEMA, P.; LEKE, R. G. Severe malaria in Cameroonian children: correlation between plasma levels of three soluble inducible adhesion molecules and TNF-α. Acta tropica, 102(1), 20-28, 2007.

THARAVANIJ, S.; WARRELL, M. J.; TANTIVANICH, S.; TAPCHAISRI, P.; CHONGSA-NGUAN, M.; PRASERTSIRIROJ, V.; PATARAPOTIKUL, J. Factors Contributing to the Development of Cerebral Malaria. The American journal of tropical medicine and hygiene, 33(1), 1-11, 198, 1984.

THOMPSON, J.; COOKE, R. E.; MOORE, S.; ANDERSON, L. F.; JANSE, C. J.; WATERS, A. P. PTRAMP; a conserved *Plasmodium* thrombospondin-related apical merozoite protein. Molecular and biochemical parasitology, 134(2), 225-232, 2004.

TORRE, S.; LANGLAIS, D.; GROS, P. Genetic analysis of cerebral malaria in the mouse model infected with *Plasmodium berghei*. Mammalian Genome, 29(7-8), 488-506, 2018.

TROYE-BLOMBERG, M.; ANDERSSON, G.; STOCZKOWSKA, M.; SHABO, R.; ROMERO, P.; PATARROYO, M. E.; PERLMANN, P. Production of IL 2 and IFN-gamma by T cells from malaria patients in response to *Plasmodium falciparum* or erythrocyte antigens in vitro. The Journal of Immunology, 135(5), 3498-3504, 1985.

VAN DEN BERG, M.; OGUTU, B.; SEWANKAMBO, N. K.; BILLER-ANDORNO, N.; TANNER, M. RTS, S malaria vaccine pilot studies: addressing the human realities in large-scale clinical trials. Trials, 20(1), 1-4, 2019.

VAN DIJK, M. R.; DOURADINHA, B.; FRANKE-FAYARD, B.; HEUSSLER, V.; VAN DOOREN, M. W.; VAN SCHAIJK, B.; VAN GEMERT, G.; SAUERWEIN,R. W.; MOTA, M. M.; WATERS, A. P.; JANSE, C. J. Genetically attenuated, P36p-deficient malarial sporozoites induce protective immunity and apoptosis of infected liver cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102(34), 12194-12199, 2005.

VAUGHAN, A. M. e KAPPE, S. H. Malaria vaccine development: persistent challenges. Current Opinion in Immunology, 24(3), 324–331, 2012.

VILLEGAS-MENDEZ, A.; GREIG, R.; SHAW, T. N.; DE SOUZA, J. B.; FINDLAY, E. G.; STUMHOFER, J. S.; COUPER, K. N. IFN-γ–producing CD4+ T cells promote experimental cerebral malaria by modulating CD8+ T cell accumulation within the brain. The Journal of Immunology, 189(2), 968-979, 2012.

WAKI, S.; UEHARA, S.; KANBE, K., NARIUCH, H.; SUZUKI, M. INTERFERON-gamma and the induction of protective IgG2a antibodies in non-lethal *Plasmodium berghei* infections of mice. Parasite immunology, 17(10), 503-508, 1995.

WANG, R.; CHAROENVIT, Y.; CORRADIN, G.; DE LA VEGA, P.; FRANKE, E. D.; HOFFMAN, S. L. Protection against malaria by *Plasmodium yoelii* sporozoite surface protein 2 linear peptide induction of CD4+ T cell-and IFN-gamma-dependent

elimination of infected hepatocytes. The Journal of Immunology, 157(9), 4061-4067, 1996.

WASSMER, S. C.; COMBES, V.; GRAU, G. E. Platelets and microparticles in cerebral malaria: the unusual suspects. Drug Discovery Today: Disease Mechanisms, 8(1-2), e15-e23, 2011.

WEISS, G. E.; GILSON, P. R.; TAECHALERTPAISARN, T.; THAM, W. H.; DE JONG, N. W.; HARVEY, K. L.; FOWKES, F. J.; BARLOW, P. N.; RAYNER, J. C.; WRIGHT, G. J.; COWMAN, A. F.; CRABB, B. S.; COWMAN, A. F. Revealing the sequence and resulting cellular morphology of receptor-ligand interactions during *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. PLoS pathogens, 11(2), 2015.

WEISS, W. R.; MELLOUK, S.; HOUGHTEN, R. A.; SEDEGAH, M.; KUMAR, S., GOOD, M. F.; BERZOFSKY, J. A.; HOFFMAN, S. L. Cytotoxic T cells recognize a peptide from the circumsporozoite protein on malaria-infected hepatocytes. The Journal of experimental medicine, 171(3), 763-773, 1990.

WHITE, N. J. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite, 2008.

WHITE, N. J.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; HIEN, T. T.; FAIZ, M. A.; MOKUOLU, O. A.; DONDORP, A. M. Malaria. Lancet. 383:723–735, 2014.

WHITE, N. J.; TURNER, G. D.; MEDANA, I. M.; DONDORP, A. M.; DAY, N. P. The murine cerebral malaria phenomenon. Trends in parasitology, 26(1), 11-15, 2010.

WHITE, M.; WATSON, J. Malaria: age, exposure and immunity. Elife, 7, e40150, 2018.

WHITE, W. I.; EVANS, C. B.; TAYLOR, D. W. Antimalarial antibodies of the immunoglobulin G2a isotype modulate parasitemias in mice infected with *Plasmodium yoelii.* Infection and immunity, 59(10), 3547-3554, 1991.

WIN, K. K. Y. K.; THANACHARTWET, V.; WATTANAGOON, Y.; JERRAKSUWAN, S.; RUANGWEERAYUT, R.; DESAKORN, V. Factors associated with acute renal failure in adults with severe falciparum malaria. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 43(5), 1071, 2012.

WIPASA, J.; XU, H.; STOWERS, A.; GOOD, M. F. Apoptotic deletion of Th cells specific for the 19-kDa carboxyl-terminal fragment of merozoite surface protein 1 during malaria infection. The Journal of Immunology, 167(7), 3903-3909, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Health Organization Guidelines for the treatment of malaria. 3ª edição. 2015. Disponível em: http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en/

WYKES, M. N.; LIU, X. Q.; BEATTIE, L.; STANISIC, D. I.; STACEY, K. J.; SMYTH, M. J.; GOOD, M. F. *Plasmodium* strain determines dendritic cell function essential for survival from malaria. PLoS Pathog, 3(7), e96, 2007.

WYKES, M. N.; HORNE-DEBETS, J. M.; LEOW, C. Y.; KARUNARATHNE, D. S. Malaria drives T cells to exhaustion. Frontiers in microbiology, 5, 249, 2014.

XU, H.; WIPASA, J.; YAN, H.; ZENG, M.; MAKOBONGO, M. O.; FINKELMAN, F. D.; GOOD, M. F. The mechanism and significance of deletion of parasite-specific CD4+ T cells in malaria infection. The Journal of experimental medicine, 195(7), 881-892, 2002.

YAHATA, K.; TREECK, M.; CULLETON, R.; GILBERGER, T. W.; KANEKO, O. Time-lapse imaging of red blood cell invasion by the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii.* PloS one, 7(12), e50780, 2012.

YAÑEZ, D. M.; BATCHELDER, J.; VAN DER HEYDE, H. C.; MANNING, D. D.; WEIDANZ, W. P. γδ T-Cell Function in Pathogenesis of Cerebral Malaria in Mice Infected with *Plasmodium berghei* ANKA. Infection and immunity, 67(1), 446-448, 1999.

YADAVA, A.; KUMAR, S.; DVORAK, J. A.; MILON, G.; MILLER, L. H. Trafficking of *Plasmodium chabaudi adami*-infected erythrocytes within the mouse spleen. Proceedings of the National Academy of Sciences, 93(10), 4595–4599, 1996.

ZHENG, J.; PAN, H.; GU, Y.; ZUO, X.; RAN, N.; YUAN, Y.; ZHANG, C.; WANG, F. Prospects for Malaria Vaccines: Pre-Erythrocytic Stages, Blood Stages, and Transmission-Blocking Stages. BioMed Research International, 2019.

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=5820&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock, acessado em 07/04/2020.

1BRASIL, P. et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. The Lancet Global Health, Rio de Janeiro, v. 5, p. e1038-1046, 31 Aug. 2017.

https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/dezembro/03/3.%20a%20-%20Situa%C3%A7%C3%A3o%20Epidemiol%C3%B3gica%20da%20Mal%C3%A1ria_Brasil_CIT_28.11.2018.pdf, acessado em 06/04/2020

https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/Dadosparacidado_201925_03_2020/Ttulo, acessado em 06/04/2020.