

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS.  
IMUNOLOGIA E DIP/GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

**Juliane Aparecida Marinho Duque**

**“ANÁLISE DA FUNÇÃO FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS DE  
ANIMAIS INFECTADOS COM *PLASMODIUM BERGHEI* NK65”**

Juiz de Fora

2012

**JULIANE APARECIDA MARINHO DUQUE**

**“ANÁLISE DA FUNÇÃO FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS DE ANIMAIS INFECTADOS COM *PLASMODIUM BERGHEI* NK65”**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas - Ênfase em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção de Grau do Mestre em Ciências Biológicas.

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Jacy Gameiro**

Juiz de Fora

2012

**JULIANE APARECIDA MARINHO DUQUE**

**Análise da função fagocítica de macrófagos de animais infectados com  
*Plasmodium berghei* NK65.**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 05 / 07 / 2012.

**BANCA EXAMINADORA:**



**Prof.ª. Dr.ª. Jacy Gameiro**

**Orientador**

**Universidade Federal de Juiz de Fora**



**Prof.ª. Dr.ª. Patrícia Resende Alo Nagib Loyola**

**Universidade Federal de Goiás**



**Prof.ª. Dr.ª. Kézia Katiani Gorza Scopel**

**Universidade Federal de Juiz de Fora**

*Dedico este trabalho à minha mãe, ao meu pai, ao meu esposo e minha querida vizinha, por todo apoio que me deram durante esta longa trajetória, sem vocês eu nada seria.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Juiz de Fora, por me receber desde a minha alfabetização passando pela graduação, mestrado e futuramente o doutorado!

Agradeço à minha orientadora Dra. Jacy Gameiro pela maravilhosa oportunidade de realizar a pós-graduação, por todo apoio, paciência e ensinamentos que recebi. Espero ter atendido suas expectativas e que a cada dia eu possa melhorar cada dia mais. Desejo que nossa amizade não termine aqui e que ainda eu possa aprender muito com você!

Às instituições FAPEMIG e CAPES, agradeço pelo apoio financeiro, fundamental para realização deste estudo.

Ao laboratório de Imunologia, agradeço pelo apoio e possibilidade de realizar meu trabalho.

Aos meus amigos do laboratório: Sandra, Ana Claudia, Alice, Alessa, Caio, Alyria, Marcilene, Michelle, Flávia, Luciano, Marina, Carol, Renan, Chris, Polly, Luan, Bárbara, Vitor, Tiago, Leidiana e Naira: foi muito bom conhecer e trabalhar com todos vocês, com certeza muitos ensinamentos científicos e de vida aprendi com todos vocês.

À minha querida amiga Patrícia: com você meus dias de trabalho foram mais leves e alegres. Sentirei saudades de tudo que vivemos nestes dois anos de mestrado. Sei que nossa amizade não terminará aqui. Agradeço a Deus por ter colocado você na minha vida.

Ao Prof. Gilson, agradeço pelos conselhos e importantes ensinamentos.

Ao Prof. Henrique e a Prof.<sup>a</sup> Ana Paula, agradeço por todo apoio para realização deste trabalho.

Agradeço a Deus por minha vitória, pois sem ele nada seria possível e nada teria sentido!!!

Agradeço à minha mãe Rosângela por todo esforço e dedicação para me ajudar a realizar o meu sonho de estudar e poder hoje, dizer que ela foi fundamental em todas as conquistas que obtive. Nunca esquecerei todas as dificuldades que passamos, mas lembrarei sempre que você derrubou todas as barreiras para que eu pudesse ir em frente. O título obtido neste momento é muito importante para mim,

porém mais valioso que ele, foi os ensinamentos de vida que aprendi com você: uma mulher guerreira e carinhosa.

Agradeço ao meu pai Marcos por todo apoio e incentivo em todos os momentos. Obrigado por sempre me incentivar a ser a pessoa honesta que sou hoje, e sempre serei.

Ao meu amor Fernando: Tudo teve um novo sentido quando te conheci! Você me faz entender o quanto eu posso ser capaz de atingir meus objetivos. Obrigado por me confortar nos momentos mais difíceis, e me fazer acreditar que posso fazer melhor!

À minha querida vó Lora, muito obrigado por sempre sonhar comigo! Creio agora que posso realizar o sonho do vô Luiz de ser a professorinha dele!!! Com muito orgulho! Agradeço por você vivenciar mais esta etapa tão importante da minha vida! Vamos agora para o Doutorado, se Deus quiser!!

Agradeço a todos que contribuíram de alguma para que eu pudesse estar no Mestrado e que torceram por mim!

Nunca me esquecerei de vocês.

## RESUMO

A malária é uma importante doença tropical com distribuição mundial. A doença é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* que infectam humanos e outras espécies animais. Modelos experimentais de infecção por *Plasmodium berghei* NK65A (PbNK65A) em camundongos Balb/c auxiliam na compreensão da doença humana. A resposta imune à malária é extremamente complexa. Os macrófagos apresentam-se como importantes células no combate ao estágio eritrocítico do parasito. O trabalho buscou avaliar diferentes aspectos da função destas células durante a infecção por PbNK65.

Os resultados demonstraram que a parasitose não altera a frequência relativa da população de macrófagos peritoneais nos camundongos. Porém, os animais infectados, apresentaram maior expressão de moléculas co-estimuladoras, principalmente CD80, e expressiva redução da capacidade de fagocitar hemácias parasitadas ao longo da infecção. A produção da IL-12, citocina importante para ativação da resposta celular também foi intensamente prejudicada pelo parasito no decorrer da infecção. Diante dos resultados, podemos sugerir que a infecção por *Plasmodium berghei* NK65 interfere na resposta imune inata, e esta pode ser atribuída ao caráter negativo da infecção sobre o macrófago, que possui suas principais funções alteradas, como a fagocitose e a produção de IL-12. Ainda que a co-estimulação seja preservada e até elevada neste modelo, é insuficiente para o hospedeiro gerar uma resposta celular eficiente que limitaria a proliferação de *Plasmodium* e, sobretudo, a morte do hospedeiro.

Palavras-chaves: malária, macrófagos, resposta inata, *Plasmodium berghei*.

## ABSTRACT

Malaria is a major tropical disease with worldwide distribution. The disease is caused by protozoa of the genus *Plasmodium* which infects humans and other animal species. Experimental models of infection by *Plasmodium berghei* NK65A (PbBNK65A) in Balb/c mice is important in the understanding of human disease. Immune response to malaria configures itself extremely, involving different elements. Macrophages are important cells against the erythrocytic parasite stage. Thus, the study aimed to evaluate different aspects of macrophage functions during infection by PbNK65A.

The results showed that the parasite does not alter the frequency on peritoneal macrophages. However, the infected animals showed higher expression of coestimulatory molecules, mainly CD80 and significant reduction in the ability to phagocytosis infected erythrocytes during the infection. The production of IL-12 cytokine, important for activation of the cellular response, was also affected during infection. Thus, we suggest that infection by *Plasmodium* affects the innate immune response, and this can be attributed to the negative character of the infection on the macrophages, which has changed its principal functions, such as phagocytosis and IL-12 production. Although co-stimulation is preserved and even higher in this model, is insufficient to generate a host cell response that limits the proliferation of *Plasmodium*, and especially the host death.

Keywords: malaria, macrophages, innate response, *Plasmodium berghei*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Regiões de risco de transmissão da malária no mundo (Adaptado).....	14
.	
Figura 2 Delineamento experimental.....	23

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD's	Células Dendríticas
Células NK	Células "Natural Killer", Células matadoras naturais
Células NKT	Células T "Natural Killer", Células T matadoras naturais
IFN	Interferon
LT CD4+	Linfócitos T CD4+ (auxiliares)
LTCD8+	Linfócitos TCD8+ (citotóxicos)
LB	Linfócitos B
IL-12	Interleucina 12
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
IL-6	Interleucina 6
IgG	Imunoglobulina G
PAMP's	Padrões moleculares associados à patógenos
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
TLR	"Toll like receptors"- Receptores do tipo <i>Toll</i>
NO	Óxido Nítrico
ELISA	"Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay", Ensaio imunoabsorvente ligado à enzima.
i.p.	Intraperitoneal
PBS	"Phosphate Buffer Saline", Solução tampão fosfato salina
EDTA	"Ethylenediamine tetraacetic acid", Ácido Etilenodiamino Tetraacético
RPM	Rotações por minuto
MIF	Média de Intensidade de Fluorescência.
TMB	Tetrametilbenzidina
APC	Célula apresentadora de antígenos.
G	Grama

$\mu\text{L}$       Microlitros

mL      Mililitros

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>19</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
3.1 Objetivo geral.....	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
4.1 Animais.....	21
4.2 Infecção por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 (Pb NK65).....	21
4.3 Delineamento experimental.....	22
4.4 Obtenção e cultura de macrófagos peritoneais.....	23
4.5 Análise fenotípica dos macrófagos peritoneais por citometria de fluxo.....	23
4.6 Ensaios de fagocitose.....	24
4.6.1 Fagocitose de hemácias (específica).....	24
4.6.2 Fagocitose de micropartículas fluorescentes (inespecífica).....	24
4.7 Dosagem de TNF, IL-10 e IL-12 por ELISA.....	25
4.8 Análise estatística.....	26
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>27</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>35</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>41</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A malária é uma importante doença tropical, com distribuição mundial, ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais (figura 1) como os países do continente africano, por exemplo, que são os mais acometidos. Nesta região ocorrem as maiores taxas de morbidade e mortalidade, principalmente no grupo de gestantes, cuja imunidade é reduzida pela gravidez, e crianças menores que cinco anos que ainda não desenvolveram certo grau de defesa contra a malária. A enfermidade também está presente na América Latina (CDC, 2011) e no Brasil encontra-se principalmente na região denominada Amazônia Legal que concentra 99,5% dos casos da doença registrados no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

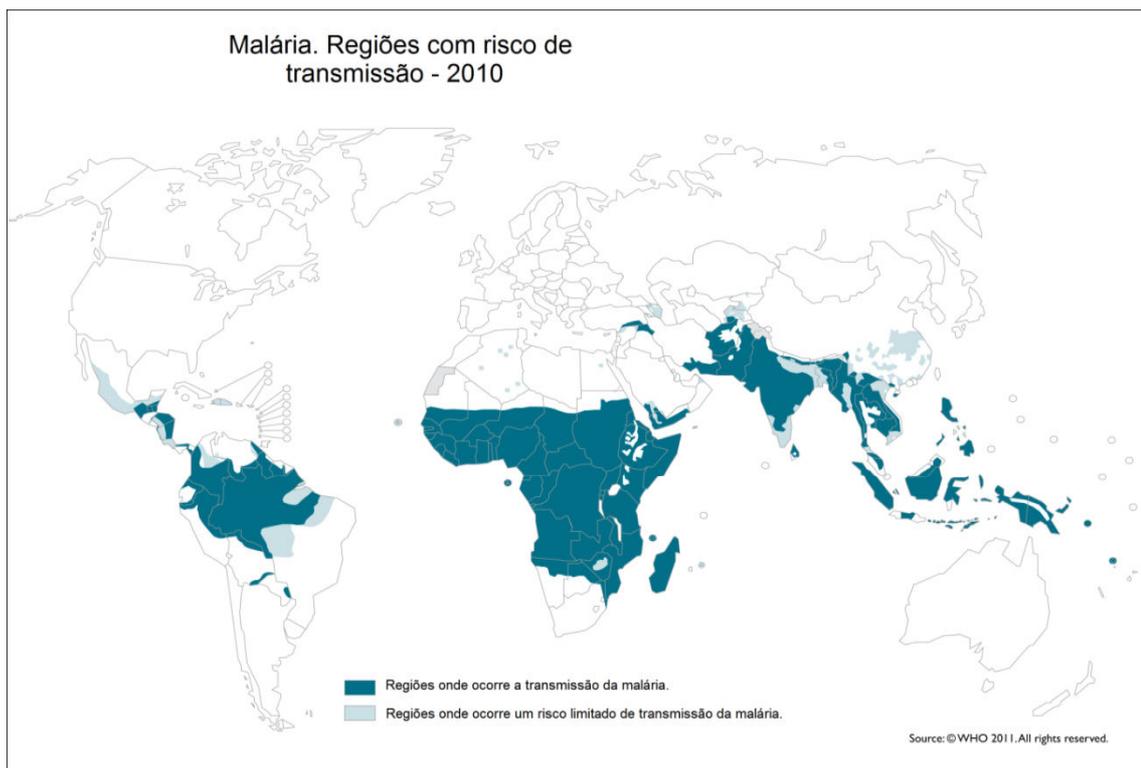


Figura 1. Regiões de risco de transmissão da malária no mundo em 2010 (adaptado). Fonte: OMS, 2011.

A malária é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e as espécies que infectam o homem são: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. Estudos recentes têm demonstrado novos casos de infecção humana por *P. knowlesi*, espécie conhecida por infectar preferencialmente outros animais (COX-SINGH et al., 2008).

Os parasitos são transmitidos ao homem quando fêmeas dos mosquitos do gênero *Anopheles*, durante o repasto sanguíneo, inoculam no hospedeiro vertebrado as formas infectantes (esporozoítos), estas ganham, posteriormente, acesso à circulação sanguínea. O ciclo de desenvolvimento de *Plasmodium* no hospedeiro vertebrado é complexo, composto de duas etapas principais: uma que ocorre no fígado, onde os esporozoítos se desenvolvem a merozoítos hepáticos, e uma fase assexuada que ocorre nas hemácias (GAUR, MAYER e MILLER, 2004). As principais etapas que ocorrem durante a fase eritrocítica são: a elevada multiplicação dos merozoítos no interior das células, seguida pelo seu rompimento e liberação dos parasitos juntamente com os metabólitos tóxicos gerados por eles (FRANCIS, SULLIVAN e GOLDBERG, 1997). Estes eventos estão associados às principais observações clínicas da patologia da malária.

No ciclo eritrocítico é observado o aumento da parasitemia, fato que poderia ser limitado pela atuação das células do sistema imune do hospedeiro, prevenindo a ocorrência de alterações mais graves, como malária cerebral, anemia grave, distúrbios metabólicos, entre outras manifestações.

A atuação do sistema imune poderia reduzir o número de células infectadas, porém, esta resposta mostra-se, na maioria dos casos, insuficiente para o controle da infecção, podendo levar a disseminação e o estabelecimento do parasito no hospedeiro, observados durante a fase crônica da doença (STEVENSON e RILEY, 2004).

Tal como o ciclo biológico dos plasmódios, as reações imunológicas contra o parasito são muito complexas envolvendo diversos componentes do sistema imune, porém, os processos envolvidos ainda não foram totalmente esclarecidos.

Sabe-se que anticorpos produzidos pelos linfócitos B previnem a invasão dos eritrócitos (BLACKMAN et al., 1990), medeiam à morte celular dependente de anticorpo (BOUHAROUN-TAYOUN et al., 1995) e também auxiliam à fagocitose (MOTA et al., 1998).

Os LTCD4+ desempenham um importante papel na resposta imune contra o estágio sanguíneo do parasito (PERLMANN e TROYE-BLOMBERG, 2002). Estes agem sobre os Linfócitos B, estimulando a resposta imune humoral, auxiliam na indução de resposta citotóxica de LT CD8+ e inibem indiretamente, através da produção de citocinas, o desenvolvimento do estágio hepático dos parasitos (TSUJI e ZAVALA, 2003).

Os linfócitos TCD8+ são ativados durante este estágio do ciclo de vida de *Plasmodium*, auxiliando na inibição do desenvolvimento do parasito (CHAKRAVART et al., 2008) e prevenindo a sua entrada deste nos eritrócitos.

O estágio hepático do ciclo do parasito tem sido bastante estudado, sobretudo em relação à atuação das células T CD8+ contra as formas pré-eritrocíticas, porém, como é na fase sanguínea que ocorre a maior parte dos eventos que culminam com as manifestações clínicas da doença, esta conseqüentemente tem sido alvo de grande parte das pesquisas sobre a imunologia da doença.

Apesar dos elementos da imunidade adquirida serem amplamente estudados e sua importância no controle de *Plasmodium* ser reconhecida, a resposta específica demora a se desenvolver quando ocorre uma primeira infecção.

A imunidade inata configura-se como extremamente importante no controle inicial de diversas infecções, a exemplo da malária. Seus componentes como as células dendríticas (CDs) (WYKES e GOOD; 2008) células *Natural Killer* (NK), *Natural Killer T* (NKT) (revisto por Mc CALL e SAUERWEIN, 2010, VASAN e TSUJI, 2010) revelam-se essenciais por estar envolvidas na destruição dos parasitos. As células T $\gamma\delta$ , por exemplo, são excelentes produtoras de IFN- $\gamma$ , citocina que exerce funções importantes na destruição de *Plasmodium* (revisto por: MC CALL e SAUERWEIN, 2010).

Apesar de participarem da imunidade protetora, células dendríticas e NK podem desencadear ou inibir respostas inflamatórias. Esta polarização é dependente do hospedeiro, da linhagem do parasito, das diferenças nas taxas de crescimento dos plasmódios, da carga antigênica e do grau de ativação de diferentes células do sistema imunológico (AUGUSTINE et al., 2009).

A primeira linha de defesa contra *Plasmodium* são as células fagocíticas que reconhecem os eritrócitos infectados pelos parasitos (SHEAR et al., 1989; URQUHART, 1994 *apud* SERGHIDES e KAIN, 2001), controlando o crescimento do

protozoário, através das suas principais funções como a fagocitose e produzindo componentes oxidativos que auxiliarão na destruição do patógeno.

Neste contexto os macrófagos são extremamente importantes na resposta a microrganismos invasores uma vez que atuam como um elo entre os sistemas inato e adquirido, pois além da fagocitose, são capazes de atuar como células apresentadoras de antígenos (BURKE e LEWIS, 2003; HARDING, RAMACHANDRA e WICK, 2003). Além disso, produzem diversas citocinas que podem agir sobre outros tipos celulares, estimulando-os. Entre elas estão a interleucina-12 (IL-12) (TRINCHIERE, 2003), interleucina-1 (IL-1), interleucina-10 (IL-10), fator de Necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6), entre outras (CAVAILLON, 1994).

Bastos et al., 2002 demonstraram a importância da citocina pró-inflamatória IL-12 na indução da resposta imune adquirida durante a infecção por *P. chabaudi chabaudi*, por meio da ativação dos próprios macrófagos, auxiliando talvez, para a resolução da infecção.

Na resposta imune específica os macrófagos podem interagir com os linfócitos através da apresentação de antígenos a estas células. Resumidamente estes fagócitos internalizam as hemácias infectadas ou os próprios parasitos, reduzindo-os a peptídeos que posteriormente serão apresentados na superfície celular através do complexo de histocompatibilidade principal de classe I ou II, (MHC I ou II) (HARDING, RAMACHANDRA e WICK, 2003) e através da expressão de moléculas co-estimulatórias como CD80 e CD86, as quais interagem com a molécula CD28 presentes nos linfócitos T, promovendo sua ativação para que exerçam as funções efetoras, como a produção de citocinas inflamatórias e ativação de outros tipos celulares (SHARPE e FREEMAN, 2002).

Naturalmente os macrófagos possuem uma série de receptores de superfície com a finalidade de discriminar partículas estranhas das próprias, entre eles estão: o receptor CR, para frações do sistema complemento, receptor Fc $\gamma$  para IgG, receptor CD36 ou *Scavenger*, *Toll-like receptor*, receptores de manose, receptores de proteína ligadora de manose (STAFFORD, NEUMANN e BELOSEVIC, 2002). Estas proteínas são responsáveis pelo reconhecimento e ativação de resposta rápida frente ao microorganismo invasor, mesmo sem um contato prévio com o mesmo.

Este fagócitos respondem prontamente às infecções, sobretudo à patógenos intracelulares como *Plasmodium sp*, *Leishmania sp* e *Toxoplasma sp* através de

diferentes mecanismos, como a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que são altamente citotóxicas aos parasitos (BRUNET, 2001).

Apesar da importância dos macrófagos na resposta imune, são poucos e inconsistentes os trabalhos que analisam o papel inato destas células durante a infecção por *Plasmodium*.

Os estudos obtidos até o momento, em geral, avaliaram o papel de certos padrões moleculares associados a patógenos (PAMP's) expressos na superfície das hemácias infectadas por *Plasmodium*, como o glicosilfosfatidilinositol (GPI) de *P. falciparum* que interagem com receptores de superfície nos fagócitos, como TLRs (KRISHNEGOWDA et al., 2005) ou receptores *scavengers* (ou CD36) (PATEL et al., 2007) ativando a resposta destas células pela liberação de citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$  (PATEL et al., 2007).

Foi descrito também que micropartículas derivadas do plasma de animais infectados por *P. berghei* ANKA, têm relação com o aumento da expressão de CD40 e produção de TNF por macrófagos (COUPER et al., 2010); e ainda, substâncias liberadas durante o ciclo do parasito, como a hemozoína, (COBAN et al., 2005), podem ser fagocitadas pelos macrófagos, seja na forma livre, ou no interior de hemácias infectadas, formando lipoperóxidos tóxicos, prejudicando as funções destas células, como a fagocitose (SCHWARZER et al., 1992; SCHWARZER et al., 1996) e apresentação de antígenos (SCHWARZER et al., 1998).

Essa possível redução da função dos macrófagos poderia ser um dos mecanismos que contribuem para a perpetuação do parasito no hospedeiro (URBAN e ROBERTS, 2002), fato que se mostra condizente com os quadros de imunossupressão observados durante certos episódios de infecção (HO et al., 1986; HVIID et al., 1991).

Por outro lado, é conhecido que a infecção malárica pode gerar um desequilíbrio na relação parasito-hospedeiro e levar a uma exacerbação da resposta inflamatória com grande produção de TNF- $\alpha$ , que têm sido relacionada a um quadro de malária grave (KWIATKOWSKI, 1990), que apresenta como resultados: a malária cerebral, anemia grave, distúrbios hepáticos, renais, respiratórios e metabólicos (MILLER et al., 2002).

Apesar da importância destas células, é amplamente conhecido que os plasmódios podem influenciar sua atividade através de mecanismos que permitem sua permanência no organismo hospedeiro, como a apresentação de variação

antigênica de moléculas na superfície do protozoário, ocorrência do fenômeno de eritrócitos sequestrados, que evitam a destruição das células infectadas ao chegarem ao baço, além da possibilidade de causar supressão nas células imunes (CRAIG e SCHERF, 2001).

Observações semelhantes ocorreram em infecções com outros protozoários intracelulares como a *Leishmania major* (CARRERA et al., 1996) e *Toxoplasma gondii*, que já foram descritos serem capazes de promover a supressão nas funções dos macrófagos, como na produção de TNF- $\alpha$  e IL-12 (BUTCHER et al., 2005).

As células dendríticas possuem certas semelhanças com os macrófagos, sobretudo na habilidade de internalizar as células parasitadas por *Plasmodium* infectadas e apresentá-las aos linfócitos T (GUERMONPREZ et al., 2002).

Alguns trabalhos mostraram que a função das células dendríticas está comprometida durante a infecção por *P. falciparum*, contribuindo para a patogênese da doença (URBAN et al., 1999, URBAN, WILLCOX e ROBERTS, 2001) e também durante as infecções por outras espécies de *Plasmodium*, como *P. yoelii* (OCAÑA-MORGNER, MOTA e RODRIGUEZ, 2003, POUNIOTIS et al., 2005) e *P. berghei* (WILSON et al., 2006, WYKES et al., 2007). Neste contexto, o parasito ou seus antígenos solúveis, poderiam interferir no processo pelo qual as células dendríticas interagem com as outras células do sistema imune, e conseqüentemente prejudicar a resposta do hospedeiro (MILLINGTON et al., 2006). Talvez da mesma maneira pela qual as células dendríticas podem ser suprimidas pelo parasito, o mesmo poderia ocorrer com os macrófagos, segundo Millington et al. (2006) a redução da atividade destas células seria decorrente da presença de elevadas concentrações de hemozoína depositada sobre elas, tornando instáveis suas interações com receptores das células T, como as moléculas co-estimulatórias, por exemplo.

De forma similar, a supressão causada por elevadas concentrações de hemozoína também já foi correlacionada com a baixa atividade de apresentação de antígenos pelos macrófagos (SCHWARZER et al., 1998), ainda assim, estudos mais detalhados devem ser realizados para confirmar esta e outras relações entre o parasito e a imunossupressão na malária.

Tendo em vista os escassos trabalhos que analisam o papel das células da imunidade inata, sobretudo dos macrófagos, e sabendo que estes são muito importantes para o controle inicial de diversas infecções, este trabalho propõe analisar o papel destas células durante a malária.

## 2 JUSTIFICATIVA

É amplamente reconhecido o papel dos macrófagos no controle de diversas infecções, mas sabe-se também que muitos parasitos possuem a habilidade de interferir nas funções destas células como forma de evadir o sistema imune do hospedeiro.

Como são poucos os trabalhos que visam o entendimento da relação destes fagócitos com *Plasmodium*, sobretudo nos períodos iniciais da infecção e sabendo-se que existe o relato de casos de imunossupressão do hospedeiro associados à malária, este trabalho visa auxiliar a compreensão destas relações entre imunossupressão com as funções dos macrófagos durante a infecção.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar “*in vitro*” a função fagocítica de macrófagos durante a infecção experimental por *P. berghei* NK65.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar por meio da marcação de moléculas de superfície dos macrófagos, a população relativa destas células em animais infectados e não infectados.
- Avaliar *in vitro* a função fagocítica de macrófagos através da análise da fagocitose de hemácias infectadas (fagocitose específica) e de micropartículas de látex fluorescentes (fagocitose inespecífica) em células provenientes de animais infectados e não infectados;
- Analisar a produção de citocinas (IL-12, TNF- $\alpha$ ) e NO, no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais através de ELISA provenientes de animais infectados e não infectados.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Camundongos machos da linhagem BALB/c, entre 6 e 8 semanas de idade, fornecidos pelo Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), foram mantidos durante todo o período experimental em gaiolas apropriadas e estantes ventiladas (ALESCO, série 1803) no biotério do Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas (UFJF) com água e ração *ad libitum*. O estudo conduzido foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFJF (Protocolo nº013/2010).

### 4.2 INFECÇÃO POR *PLASMODIUM BERGHEI* NK65 (Pb NK65)

No presente trabalho, foi utilizado *P. berghei* NK65A, gentilmente cedido pela Prof.<sup>a</sup> Dra. Clarice Abramo, do departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas (UFJF). Antes de cada infecção, amostras congeladas do parasito foram inoculadas em animal repique. Após 14 dias aproximadamente, estes animais foram anestesiados (quetamina 5% e xilasina 1%), sacrificados para coleta de sangue. Uma gota foi utilizada para confecção de esfregaço em lâmina de vidro, seguida com a coloração de *Giemsa*. Por microscopia ótica as hemácias parasitadas foram contadas para a determinação da porcentagem de infecção. O sangue, mantido em tubos contendo heparina e 300µl de PBS, foi centrifugado por três vezes durante 5 minutos à 1500 rpm. Então, o sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspenso em 1 ml de PBS 1X. O número total de células presente na suspensão foi determinado por contagem em câmara de Neubauer e a suspensão final ajustada para  $5 \times 10^6$  hemácias parasitadas/ml e 200µl

de solução foi inoculada em cada animal via intraperitoneal (i.p.), totalizando  $10^6$  hemácias parasitadas por camundongo.

### 4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para avaliar aspectos da atividade de macrófagos durante a infecção por *P. berghei* NK65 camundongos BALB/c foram infectados e eutanasiados de acordo com o seguinte protocolo:

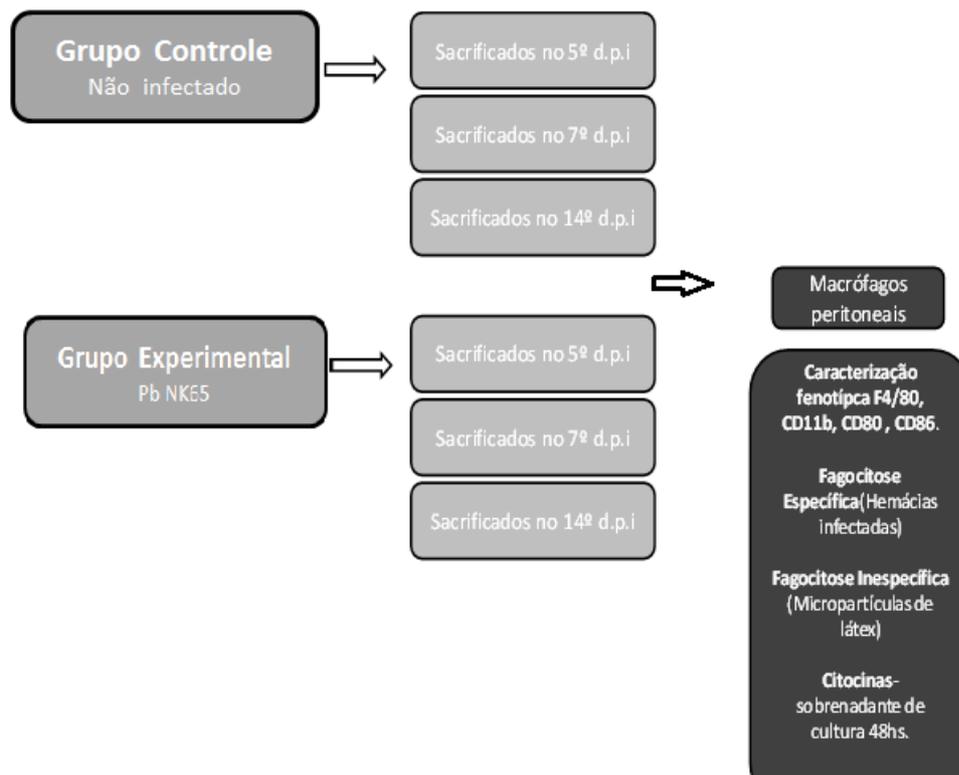


Figura 2: Delineamento experimental.

#### 4.4 OBTENÇÃO E CULTURA DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Quatro dias antes da eutanásia, animais controle (n=5) e infectados (n=6) foram estimulados com tioglicolato 3% via i.p. Após a eutanásia os macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal através injeção de 10 ml de PBS 1X gelado, seguida de homogeneização e aspiração do lavado e transferência para tubos de 15 mL estéreis. Os mesmos foram centrifugados (4°C, 1200 rpm, 10 minutos) e o sobrenadante foi desprezado. O sedimento foi ressuspenso adicionando-se 1 mL de meio RPMI suplementado com soro fetal bovino 10%, antibiótico 1 % e aminoácidos não essenciais 1%. A solução foi diluída em PBS 1X (1:100) para contagem das células em Câmara de *Neubauer*. A contagem final foi ajustada para  $2 \times 10^5$  células para cada poço da placa de cultura e em seguida as células foram adicionadas às placas e incubadas em estufa (CO<sub>2</sub> a 5%, 37°C) por 24 horas para aderência. Posteriormente, as placas foram exaustivamente lavadas com PBS 1 X para a remoção de células não aderentes. Então, foi adicionado meio de cultura para os experimentos subsequentes.

#### 4.5 ANÁLISE FENOTÍPICA DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS POR CITOMETRIA DE FLUXO

As células obtidas do lavado peritoneal de animais infectados e controle, diluídas em PBS1X, foram imediatamente transferidas para placas de 96 poços fundo em “U” ( $2 \times 10^5$  células/ poço de 200 µL) e incubadas com os seguintes anticorpos: anti-CD11b, anti-F4/80 e anti-CD86 e anti- CD80, por 20 minutos a 4°C. Após este tempo, procedeu-se a lavagem com adição de PBS 1X aos poços e a placa foi submetida à centrifugação por 10 minutos a 1500 rpm, em seguida as células foram fixadas com formaldeído 1% e submetidas a leitura no citômetro de fluxo FACsCalibur (*BD Pharmingen, San Diego, Califórnia, EUA*).

A análise dos dados adquiridos foi realizada no *software* FCS Express V3. A expressão dos receptores nas diferentes subpopulações foi analisada a partir da média da intensidade de fluorescência (MIF).

## **4.6 ENSAIOS DE FAGOCITOSE**

### **4.6.1 FAGOCITOSE DE HEMÁCIAS (ESPECÍFICA)**

Para a realização do ensaio de fagocitose específica, os macrófagos obtidos de animais infectados e não-infectados foram incubados ( $2 \times 10^5$  células/poço de 200 $\mu$ L) em placas de 24 poços contendo uma lamínula redonda. Hemácias oriundas de um animal parasitado por PbNK65 foram adicionadas a placa na concentração de  $10^7$  hemácias/poço de 300 $\mu$ L. A placa foi incubada por 50 minutos em estufa (CO<sub>2</sub> a 5%, 37°C) e em seguida o sobrenadante foi desprezado. Os poços foram lavados duas vezes com PBS 1x e as lamínulas foram retiradas das placas, fixadas e coradas por *Giemsa*.

O percentual de fagocitose foi estimado pela contagem de hemácias fagocitadas em 100 macrófagos, independente do número de hemácias interiorizadas em cada célula.

### **4.6.2. FAGOCITOSE MICROPARTÍCULAS FLUORESCENTES (INESPECÍFICA)**

Para a realização do ensaio de fagocitose inespecífica, os macrófagos obtidos de animais parasitados e controle foram incubados com meio RPMI por 24 horas em placas de 96 poços ( $2 \times 10^5$  células/poço de 200 $\mu$ L), seguido de lavagem com PBS 1X, para retirar as células não aderidas e adição de micropartículas de látex

("beads") na concentração de  $2 \times 10^6$ / poço de 200  $\mu\text{L}$ , diluídas em meio RPMI. As placas foram então armazenadas por 50 minutos em estufa ( $\text{CO}_2$  a 5%,  $37^\circ\text{C}$ ). Então, o sobrenadante foi desprezado e a placa foi exaustivamente lavada com PBS 1X, para retirar as partículas não fagocitadas. A seguir foi acrescentado à placa EDTA 1mM gelado para retirar os macrófagos aderidos na placa e assim as células foram transferidas para tubos de citometria.

A leitura foi realizada com o citômetro FACsCalibur (BD *Pharmingen*, San Diego, Califórnia, EUA). A análise dos dados adquiridos foi realizada no *software* FCS *Express* V3. A expressão da fagocitose foi analisada a partir da média da intensidade de fluorescência (MIF) das micropartículas de látex fluorescentes.

#### **4.7 DOSAGEM DE TNF, IL-10 E IL-12 POR ELISA**

Para a dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura, os macrófagos ( $2 \times 10^5$  células/poço de 200  $\mu\text{L}$ ) obtidos no 5ºdpi, 7ºdpi e 14º dpi, provenientes de animais infectados e não infectados, foram incubados com hemácias infectadas, homogeneizadas em meio RPMI, na concentração de  $10^6$  hemácias/poço de 200  $\mu\text{L}$ . As placas foram então incubadas por 48 horas e seu conteúdo foi transferido para tubos de microcentrífuga para posterior dosagem de TNF, IL-10 e IL-12.

As amostras foram descongeladas para serem analisadas pelo ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) e os kits utilizados foram obtidos da *BD Biosciences*. O procedimento foi seguido de acordo com o protocolo do fabricante. Resumidamente, uma placa de 96 poços foi incubada com anticorpo de captura específico para a citocina em questão. Após 24 horas de incubação a placa foi lavada, sendo adicionado aos poços 50  $\mu\text{L}$  de sobrenadante da cultura de cada poço. A placa foi novamente lavada e aos poços foi adicionado o anticorpo de detecção, também específico. Para a revelação foi utilizado o substrato peróxido de hidrogênio + tetrametilbenzidina (TMB) e a procedeu-se a leitura no espectrofotômetro (SPECTRA Max 190).

## 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística e os gráficos foram confeccionados no *software GraphPad Prism 5.0*. Os dados obtidos foram analisados dentro da curva de normalidade seguido do teste ANOVA de uma via, com pós-teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

Para avaliar a função dos macrófagos peritoneais nos diferentes grupos experimentais, realizamos a análise destes quanto aos seus principais marcadores de superfície (F4/80 e CD11b), buscando identificar se a população destas células sofrem alterações ao longo da infecção por *Plasmodium*.

Avaliando o número relativo de células F4/80+ / CD11b+ os resultados demonstram não ocorrer diferenças significativas na população de macrófagos nos diferentes dias de infecção, comparando-se ao número relativo de células do grupo controle, conforme apresentado nos gráficos 1a e 1b.

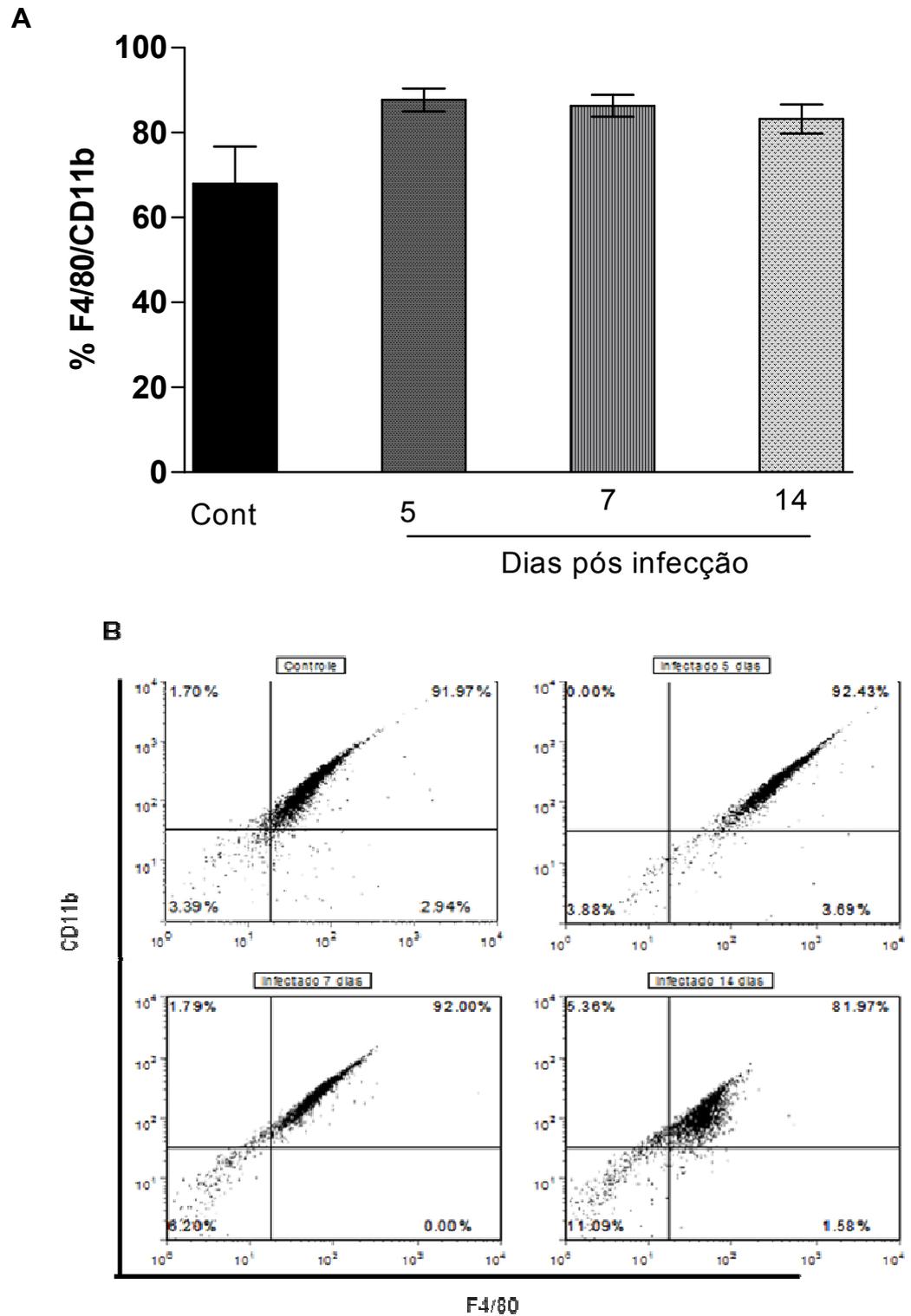


Gráfico 1: (A) Número relativo de células F4/80/CD11b+. (B) Gráficos do tipo dot-plot representativos do percentual de expressão de F4/80/CD11b+. Resultados expressos em média  $\pm$  EM.

Os marcadores de superfície CD80 e CD86 atuam como co-estimuladores na ativação de linfócitos T e estão presentes na superfície dos macrófagos; conhecendo a importância destas moléculas na ativação da resposta imune específica avaliamos então em ambos os grupos experimentais o percentual de células que apresentava estes marcadores.

Foi visto que células de animais infectados, sobretudo no 5º e 7º dpi, apresentaram maior número relativo de células CD80+ quando comparadas às células do grupo controle e 14º dpi, de acordo com o gráfico 2 a.

Avaliando o número de células que apresentava a molécula co-estimuladora CD86, observa-se uma redução destas no 5º e 7º dpi, em relação ao grupo controle (gráfico 3 a).

É possível observar que pode existir uma modulação do número relativo destas células no grupo infectado nos diferentes períodos da infecção.

Ao avaliar a expressão destes receptores pela média de intensidade de fluorescência emitida, são observadas também alterações na expressão de CD80 e de CD86 nos macrófagos de animais infectados quando comparados ao controle (gráficos 2b e 3b, respectivamente).

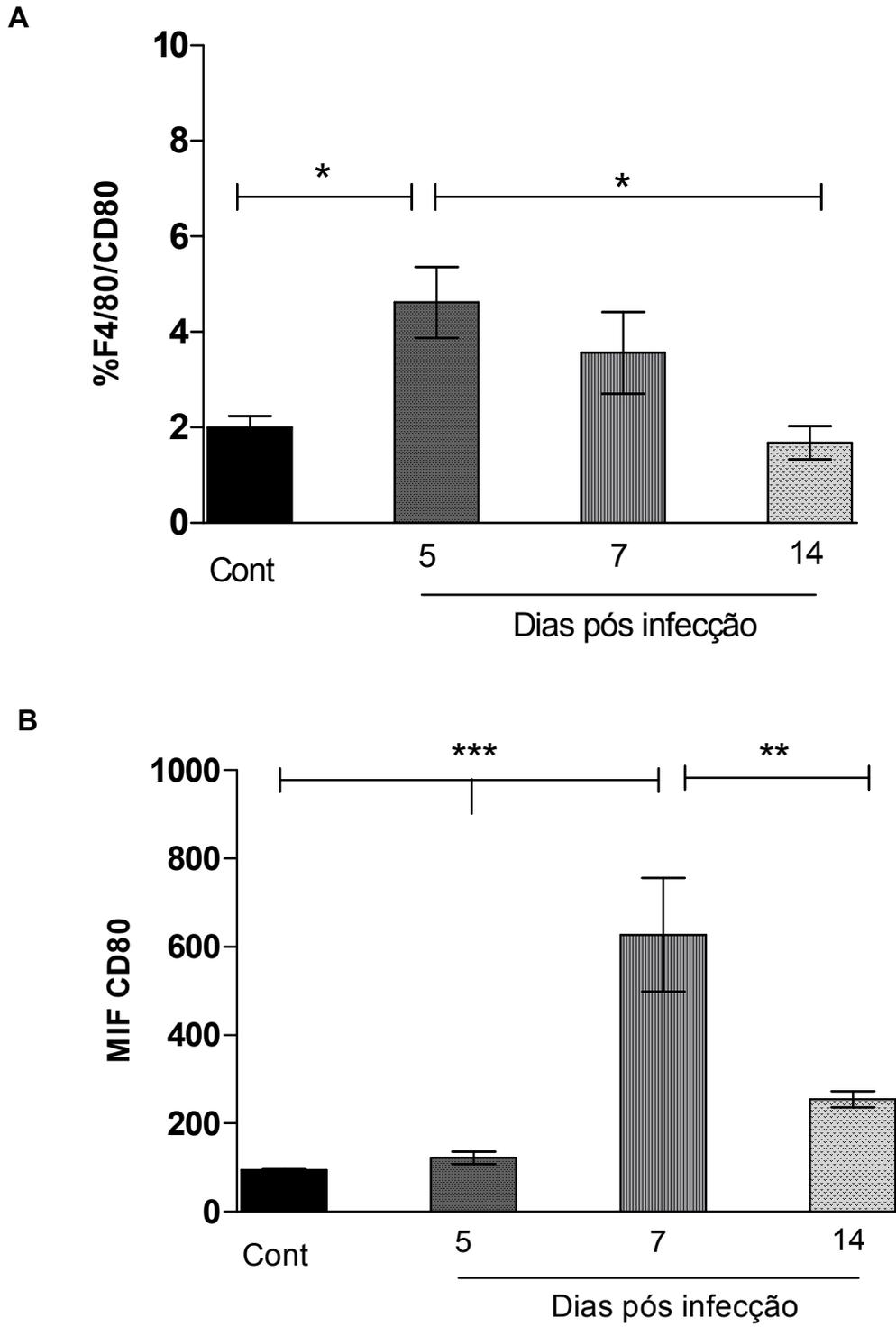


Gráfico 2: Número relativo de células CD80+ (A) e expressão de CD80+ na superfície de macrófagos pela média de intensidade de fluorescência. (B). Resultados expressos em média  $\pm$  EM (\*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ ).

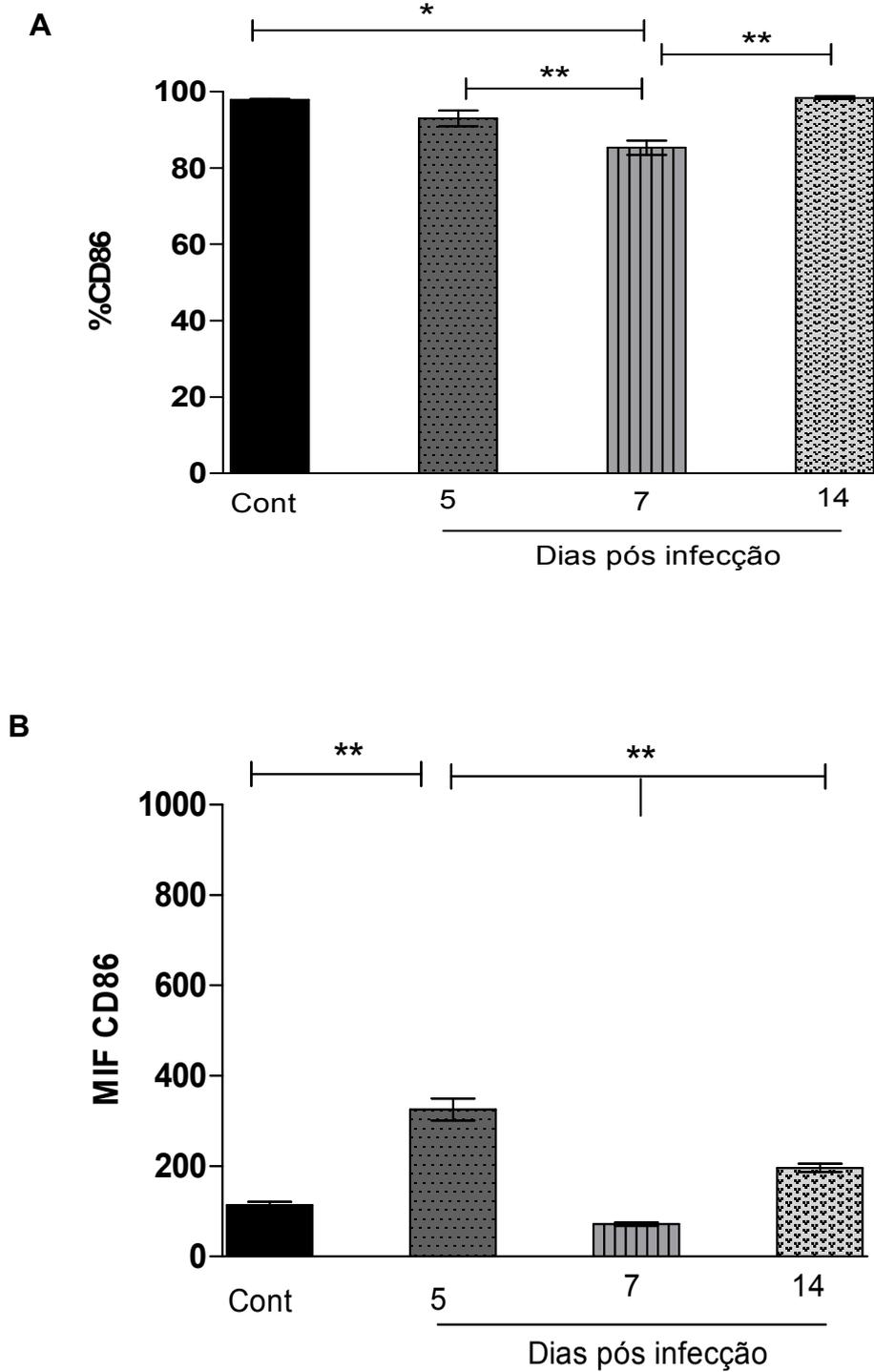


Gráfico 3: Número relativo de células CD86+ (A) e expressão de CD86+ (B) na superfície de macrófagos pela média de intensidade de fluorescência. Resultados expressos em média  $\pm$  EM, (\*\* $p \leq 0.01$ ).

A fagocitose é um dos principais mecanismos de atuação dos macrófagos contra parasitos intracelulares como o *Plasmodium*, principalmente em estágios iniciais da infecção. Para avaliar se a função fagocítica dos macrófagos peritoneais poderia sofrer alguma alteração em decorrência da infecção, foram realizados ensaios de fagocitose “*in vitro*”, através da estimulação das culturas de macrófagos com hemácias parasitadas em todos os grupos experimentais.

Podemos observar que as células provenientes de animais infectados apresentaram uma redução da capacidade de internalizar as hemácias parasitadas pelo PbNK65 comparado com os fagócitos do grupo controle. Entre os infectados houve uma redução crescente da função fagocítica em relação ao tempo de infecção (gráfico 4a).

Procedeu-se também o ensaio de fagocitose inespecífica, onde à cultura de células foi acrescentado micropartículas de látex, estimulando a fagocitose pelos macrófagos.

Neste ensaio, a média de intensidade de fluorescência das partículas fagocitadas revelou que as células do grupo controle tiveram uma elevada capacidade de fagocitar as *beads*, quando comparado com as dos grupos infectados, sobretudo após o 5º dia de infecção, corroborando os resultados encontrados na fagocitose de hemácias (gráfico 4 b).

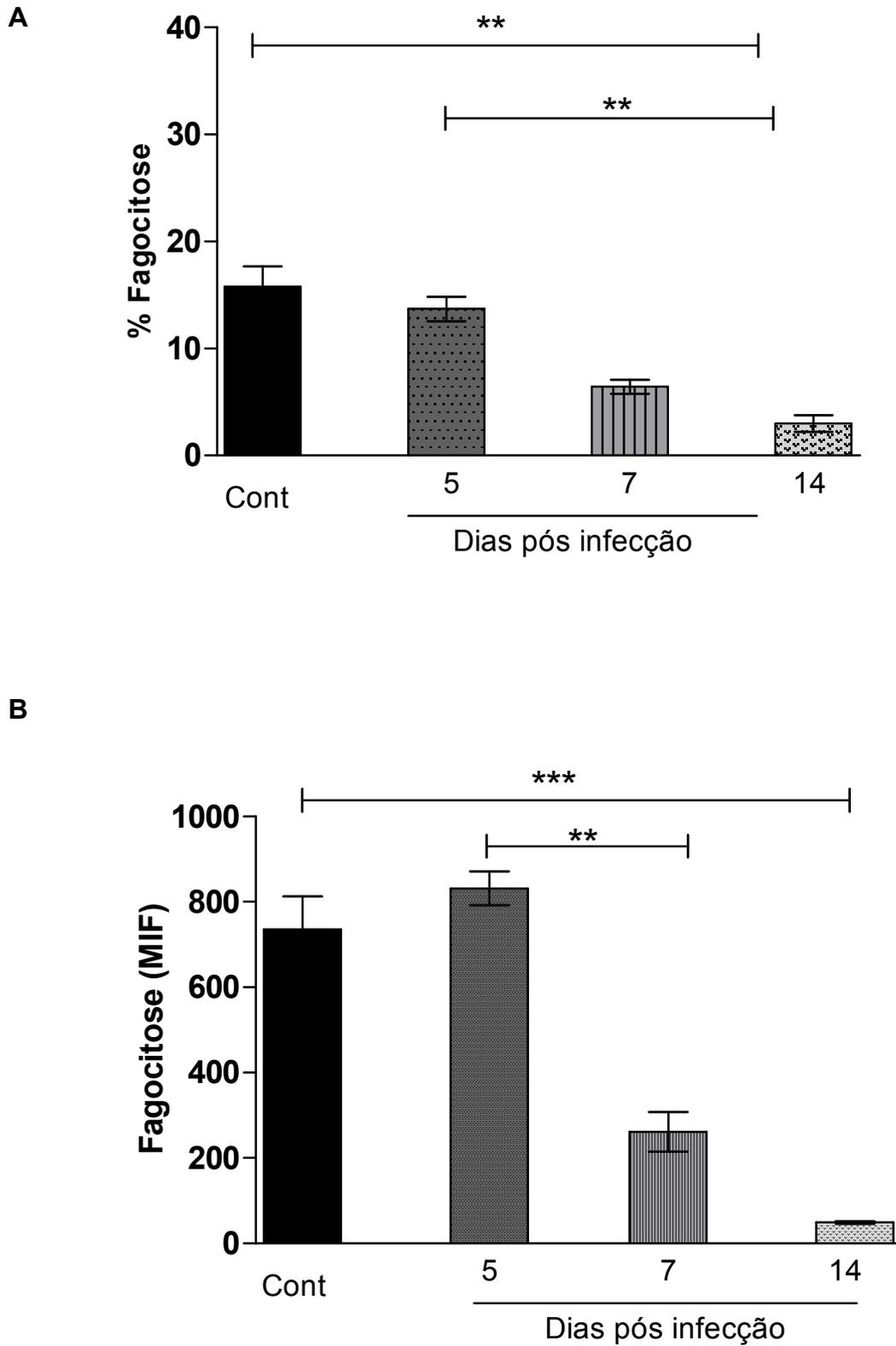


Gráfico 4: (A) Fagocitose de hemácias infectadas (fagocitose específica). (B) Fagocitose de micropartículas de látex (fagocitose inespecífica). Resultados expressos em média  $\pm$  EM (\*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ ).

Após avaliar os marcadores de superfície e as alterações na atividade fagocítica, foi analisado a produção de citocinas “*in vitro*” pelos macrófagos oriundos dos diferentes grupos experimentais após estimulação com hemácias parasitadas por *Plasmodium*.

As análises das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10 foram realizadas, porém não foram encontrados níveis detectáveis no presente estudo, sugerindo que a atividade fagocítica parece ser independente de tais moléculas, no contexto deste trabalho.

A análise da produção de IL-12 revelou que esta citocina pró-inflamatória foi extremamente reduzida nas culturas de macrófagos provenientes de animais infectados, quando comparados às células de animais controles (gráfico 5).

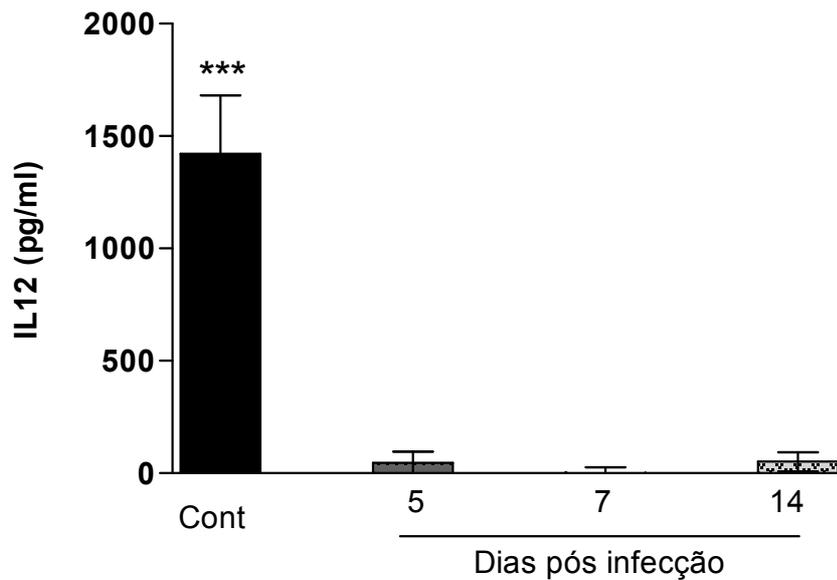


Gráfico 5: Produção de IL-12 *in vitro* por macrófagos de animais infectados e controle. Resultados expressos em média  $\pm$  EM (\*\*\*)  $p \leq 0.001$ .

## 6 DISCUSSÃO

Diversos aspectos acerca da imunologia da malária têm sido amplamente discutidos ao longo dos anos, sobretudo aqueles que relacionam a resposta imune do hospedeiro com os mecanismos de evasão apresentados pelo parasito.

Alguns estudos revelam a ocorrência de supressão das respostas imunológicas durante a malária (WYKES et al., 2007) muitas vezes associada à ocorrência de outras enfermidades (LEHRER, 2010; CUNNINGTON et al., 2011). Os mecanismos que explicam esse fenômeno ainda não foram totalmente compreendidos, mas alguns autores já associaram tal disfunção a uma reduzida ou imprópria atividade dos macrófagos (GREENWOOD, PLAYFAIR e TORRIGIANT, 1971).

Já foi amplamente demonstrado que a resposta específica dos linfócitos T possui grande importância para o controle da infecção (BEESON, OSIER e ENGWERDA, 2008), porém o papel de células da imunidade inata, entre elas os macrófagos também vem revelando que estas são essenciais para o controle inicial da parasitemia, uma vez que reconhecem os eritrócitos parasitados levando à sua destruição.

Neste estudo durante a infecção por *Plasmodium* não foi observada nenhuma alteração significativa na população de células F480/CD11b+, entre os diferentes grupos, sugerindo que durante todo período experimental não houve depleção das mesmas. Desta forma neste contexto, o parasito parece não exercer influência quanto ao número relativo de macrófagos peritoneais.

Os resultados obtidos demonstraram que houve um aumento na expressão das moléculas co-estimuladoras, sobretudo CD80, nos macrófagos de animais parasitados. Tais moléculas apresentam-se como um dos meios pelo quais os macrófagos interagem com os elementos da imunidade específica, estimulando os linfócitos T CD4+ a tornarem-se ativados para exercerem suas funções efetoras. De acordo com os resultados é possível inferir que durante a infecção a função de apresentar antígenos aos linfócitos não é somente preservada, mas também

elevada, e a molécula que realizará o estímulo, pode variar conforme o decorrer da infecção.

A fagocitose é uma das principais funções desempenhadas pelos macrófagos. Neste trabalho tais células provenientes de animais infectados apresentaram uma redução acentuada de sua capacidade fagocítica quando comparados aos fagócitos dos animais controle e ainda tal redução da atividade foi crescente com o avançar da infecção. Neste caso, foi visto que quanto maior foi tempo de infecção, menor a capacidade dos macrófagos de fagocitar as hemácias parasitadas por *Plasmodium*.

Frente ao estímulo com as micropartículas fluorescentes, também ocorreu redução crescente da fagocitose, corroborando o resultado do experimento com hemácias parasitadas, demonstrando que a atividade fagocítica durante a infecção está prejudicada não somente na presença do parasito nas culturas, mas a própria infecção do animal reduz a habilidade das células de internalizar partículas diferentes do plasmódio. Este dado sugere que algum mecanismo imunomodulatório, do próprio sistema ou de moléculas do parasito pode inibir a função de fagocitose dos macrófagos.

As células dendríticas assim como os macrófagos, também possuem a habilidade de fagocitar o protozoário da malária. Alguns pesquisadores mostraram que certas funções destas células também podem ser comprometidas durante a infecção. Urban et al. (1999) revelou que eritrócitos parasitados podem aderir às células dendríticas e inibir sua maturação, reduzindo a capacidade destas de estimular as células T. Bettiol et al. (2010) reportaram que os eritrócitos parasitados também podem inibir a função de receptores do tipo *Toll* nas células dendríticas, fato que poderia elucidar porque algumas funções imunes são alteradas durante a parasitose. Em outros estudos, entretanto, a atuação negativa do parasito sobre as células dendríticas não foi demonstrada (PERRY et al., 2004). Baseando-se nas conclusões que alguns trabalhos têm revelado sobre a influência do parasito sobre a função das células dendríticas, podemos sugerir que os macrófagos também podem sofrer uma modulação negativa em sua função.

Schwarzer et al. (1992) demonstraram que, após estímulos com eritrócitos infectados ou com o pigmento malárico isolado (hemozoína), os macrófagos sofriam

danos permanentes, como a inabilidade de realizar a fagocitose. Poderia ser este, talvez, um dos mecanismos que ajudariam no entendimento de como ocorre a supressão das células observada neste estudo.

De forma geral pode-se perceber que enquanto a fagocitose é reduzida ocorre um aumento na expressão de moléculas co-estimulatórias, ou seja, a função de célula APC dos macrófagos é aumentada, sugerindo-se que, esta talvez, seja uma maneira do sistema imune do hospedeiro “compensar” a diminuição da atividade inata da célula, na tentativa de buscar mecanismos celulares de conter a invasão do protozoário.

Outros trabalhos têm sugerido que em murinos a capacidade de internalizar o parasito é preservada, porém a supressão acontece devido à redução da capacidade de processamento e apresentação dos antígenos. Esta observação é variável conforme o local onde se encontram os macrófagos, como, por exemplo, fígado, baço ou o peritônio (LOOSE, 1984).

Certamente devido às variações na literatura acerca da supressão ou não dos macrófagos durante a infecção da malária esta relação deverá ser mais bem analisada para a devida compreensão do papel desta célula durante a doença.

Outra importante função desempenhada por macrófagos é a produção da IL-12. Neste estudo foi visto que, após estimulação das culturas de macrófagos com hemácias parasitadas por *Plasmodium*, as células de camundongos infectados tiveram a produção desta substancialmente reduzida, quando comparadas às de células não infectadas também estimuladas. Outros trabalhos descritos na literatura também relataram a redução da produção de IL-12 por macrófagos durante a infecção malárica.

Uma pesquisa envolvendo crianças africanas infectadas por *P. falciparum* que apresentavam um quadro de malária grave, detectou baixos níveis de IL-12 plasmáticos nas mesmas quando comparadas com as que não apresentavam um quadro grave da doença, os níveis desta citocina também apresentaram relação inversa com a parasitemia (LUTY et al., 2000).

A redução da produção de IL-12p40 também foi relatada em macrófagos de camundongos infectados por *P. berghei*, o que não foi visto para os animais não

infectados, e esta regulação negativa parece acontecer a nível transcricional (XU et al., 2001), o que sugere então um mecanismo de inibição da IL-12 observado no presente estudo.

Semelhante aos resultados observados neste estudo, Bastos et al. (2002) reportaram que macrófagos de camundongos *knockout* para o gene IL-12p40 tinham a habilidade de fagocitar eritrócitos infectados opsonalizados extremamente prejudicada, mostrando assim a importância da IL-12 também para a função dos macrófagos. Desta forma uma relação pode ser estabelecida entre a redução da IL-12 e da fagocitose nos animais infectados observados neste estudo.

Sabendo-se que a IL-12 é uma citocina extremamente importante para ativação dos linfócitos T CD4+ (TRINCHIERE, 2003) e que de acordo com os presentes dados sua expressão é extremamente reduzida durante a infecção, pode-se sugerir que a resposta celular não poderá ser bem estabelecida ainda que as moléculas co-estimuladoras estejam altamente expressas, como observado neste trabalho. Desta forma podemos explicar em parte porque durante a infecção neste modelo ocorre alta letalidade dos animais, visto que aparentemente os macrófagos não conseguem exercer sua função de controlar a parasitemia, e ainda não são capazes de estimular de forma eficiente às células da resposta específica, sugerindo assim um dos mecanismos pelos quais a supressão celular na malária pode ocorrer.

Recentes estudos buscaram avaliar como células fagocíticas são influenciadas pela presença de *Plasmodium* e qual seria sua relação com a imunossupressão observada em alguns modelos. Em um estudo no qual foram testadas células polimorfonucleares de humanos saudáveis e vacúolos digestivos de *P.falciparum* (que metabolizam a hemoglobina humana ingerida pelo parasito em hemozoína), demonstrou que estas células endocitam os vacúolos, induzem um “burst” respiratório, porém a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas não possui a habilidade de destruir os merozoítos, mas levam à célula a um estado de exaustão, que subsequente pode prejudicá-la ao exercer sua função. Assim é maior a probabilidade de ocorrências de infecções e septicemias (DASARI et al., 2011). De forma semelhante ao apresentado neste trabalho, Dasari et al. (2011) infere a atuação negativa da presença do parasito sobre os macrófagos, como um dos responsáveis pela imunossupressão.

Mills et al. (2000) estudando o perfil de macrófagos de diferentes linhagens de camundongos evidenciou a existência de grupos diferentes, um denominado M1, característico de animais cujas respostas imunes são do perfil Th1, com elevada produção de NO e um denominado M2, característico de animais cuja resposta imune prevalente é do tipo Th2 com elevada produção de TGF- $\beta$ . No presente trabalho foi utilizado como modelo animais Balb/c que de acordo com o estudo de destes autores teria um perfil mais anti-inflamatório, com elevada produção de TGF- $\beta$ , portanto poderia auxiliar no entendimento de como os animais infectados tinham baixos níveis de IL-12.

Apesar deste panorama, podemos inferir que o parasito também poderia ter influência nesta supressão uma vez que animais não infectados tiveram uma produção superior de IL-12, quando comparado aos infectados. Os níveis de TGF- $\beta$  e NO também foram dosados, porém não mostraram diferenças importantes entre os diferentes grupos neste estudo.

Semelhante aos dados apresentados neste trabalho, Wykes et al.(2007) analisando a capacidade fagocítica de células dendríticas em grupos de camundongos infectados por *P.berghei*, *P. vinkey*, e pelas espécies não letais *P. chabaudi*, *P.yoelli* 17XNL e ainda em animais não infectados, observou que a presença das espécies letais nestas células ocorria um aumento da expressão de MHC-II, CD80 e CD86, redução da capacidade destas de endocitar partículas de látex e ainda não foram detectados níveis importantes de IL-12 sérica, quando comparados aos expressivos níveis observados nos grupos infectados por espécies não letais.

Diante destas observações e aos controversos resultados encontrados na literatura, em parte devido à utilização de modelos de estudo diferentes, é possível inferir que novas pesquisas tornam-se necessárias para elucidar a relação entre a imunossupressão durante a malária com a redução da função dos macrófagos e principalmente qual seria o mecanismo que explicaria este processo.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que a função dos macrófagos em animais infectados por *Plasmodium berghei* NK65 está significativamente reduzida, tanto por sua capacidade fagocítica, quanto pela habilidade de produzir IL-12, uma importante citocina capaz de ativar os linfócitos T CD4+. Tal fato pode explicar a alta letalidade observada no modelo. Ainda que ocorra a ativação de uma imunidade adaptativa pela estimulação dos linfócitos T ao longo da infecção, os animais acabam por sucumbir devido aos efeitos danosos do *Plasmodium* às hemácias, como a grave anemia observada na malária.

## 8 REFERÊNCIAS

AUGUSTINE, A.D.; HALL, B.F.; LEITNER, W.W.; MO, A.X.; WALI, T.M.; FAUCI, A. 2009. NIAID workshop on immunity to malaria: addressing immunological challenges. **Nature Immunology**, **10 (7)**: 673-678.

BASTOS, K.R.B.; BARBOZA, R.; ELIAS, R.M.; SARDINHA, L.R.; GRISOTTO, M.G.; MARINHO, C.R.F.; AMARANTE-MENDES, G.P.; ALVAREZ, J.M.; D'IMPÉRIO-LIMA, R. 2002. 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**: 1191-1199.

BEESON, J.G.; OSIER, F.H.A.; ENGWERDA, C.R. 2008. Recent insights into humoral and immune responses against malaria. **Trends in Parasitology**, **24 (12)**: 578-584.

BETTIOL, E. ; CARAPAU , D.; GALAN-RODRIGUEZ ,C.; OCAÑA-MORGNER, C.; RODRIGUEZ, A. 2010. Dual effect of *Plasmodium*- infected erythrocytes on dendritic cell maturation. **Malaria Journal**, **9**: 64.

BLACKMAN, M. J.; HEIDRICH, H.G.; DONACHIE, S.; MC BRIDE, J.S.; HOLDER, A.A. 1990. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. **The Journal of Experimental Medicine**, **172**, 379–382.

BOUHAROUN-TAYOUN, H.; OEUVRAY, C.; LUNEL, F.; DRUILHE, P. 1995. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. **The Journal of Experimental Medicine**, **182**: 409–418.

BRUNET, L.R. 2001. Nitric oxide in parasitic infections. **International Immunopharmacology**, **1**: 1457–1467.

BUTCHER, B.A.; KIM, L.; PANOPOULOS, A.D.; WATOWICH, S.S.; MURRAY, P.J.; DENKERS, E.Y. 2005. Cutting edge: IL-10-independent STAT3 activation by *Toxoplasma gondii* mediates suppression of IL-12 and TNF- $\alpha$  in host macrophages. **The Journal of Immunology**, **174**:3148-3152.

BURKE, B.; LEWIS, C.E. 2003. The Macrophage (2nd Edn). **British Journal of Cancer**, **89**: 421.

CARRERA, L.; GAZZINELLI, R.T.; BADOLATO, R.; HIENY, S.; MULLER, W.; KUHN, R.; SACKS, D.L. 1996. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin -12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. **The Journal of Experimental Medicine**, **183**:515-526.

CAVAILLON, J.M. 1994. Cytokines and macrophage. **Biomed Pharmacotherapy**, **48** (10):445-453.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Disponível em: [cdc.gov/malaria/.../impact.html](http://cdc.gov/malaria/.../impact.html). Acesso em: 02/07/2011.

CHAKRAVARTY, S.; BALDEVIANO, G. C.; OVERSTREET, M. G.; ZAVALA, F. 2008. Effector CD8+ T lymphocytes against liver stages of *Plasmodium yoelii* do not require gamma interferon for antiparasite activity. **Infection and Immunity**, **76(8)**: 3628-3631.

COBAN, C.; ISHII, K.J.; KAWAI, T.; HEMMI, H.; SATO, S.; UEMATSU, S. YAMAMOTO, M.; TAKEUCHI, O.; ITAGAKI, S.; KUMAR, N.; HORII, T.; AKIRA, S. 2005. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. **The Journal of Experimental of Medicine**, **201**: 19–25.

COUPER, K.N.; BARNES, T.; HAFALLA, J.C.R.; COMBES, V.; RYFFEL, B.; SECHER, T.; GRAU, G.E.; RILEY, E.M; DE SOUZA, J.B. 2010. Parasite-derived plasma microparticles contribute significantly to Malaria infection-induced inflammation through potent macrophage stimulation. **Plos Pathogens**, **6(1)**:1-13.

COX-SINGH, J.; DAVIS, T.M.E.; LEE, K.S.; SHAMSUL, S.S.G.; MATUSOP, A.; RATMAN, S.; RAHMAN, H.A.; CONWAY, D.J.; SINGH, B. 2008. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life-threatening. **Clinical Infection Disease**, **46(2)**: 165:171.

CRAIG A, SCHERF, A. 2001. Molecules on the surface of the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **115(2)**:129-143.

CUNNINGTON, A.J.; DE SOUZA, J.B.; WALTHER, M.; RILEY, E.M. 2011. Malaria impairs resistance to *Salmonella* through heme- and heme oxygenase-dependent dysfunctional granulocyte mobilization. **Nature Medicine**. Publicação on line: 18 de dezembro de 2011: 1-9.

DASARI, P.; REISS, K. LINGELBACH, BAUMEISTER, S.; LUCIUS, R.; UDOMSANGPETCH, R.; BHAKDI, S.C; BHAKDI, S. 2011. Digestive vacuoles of *Plasmodium falciparum* are selectively phagocytosed by and impair killing function of polymorphonuclear leukocytes. **Blood**, **118**(18): 4946-4956.

FRANCIS, S.E.; JR. SULLIVAN, D.J.; GOLDBERG, D.E. 1997. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **The Annual Review of Microbiology**, **51**:97-123.

GAUR, D.; MAYER, G. D.C.; MILLER, L.H. 2004. Parasite ligand–host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. **International Journal for Parasitology** **34**: 1413–1429.

GREENWOOD, B. M.; PLAYFAIR, J. H. L.; TORRIGIANI, G. 1971. Immunosuppression in murine malaria. **Clinical and experimental Immunology**, **8**: 467-478.

GUERMONPREZ, P.; VALLADEAU, J.; ZITVOGEL, L.; THÉRY, C.; AMIGORENA, S. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, **20**:621–667.

HARDING, C.V.; RAMACHANDRA, L.; WICK, M.J. 2003. Interaction of bacteria with antigen presenting cells: influences on antigen presentation and antibacterial immunity. **Current Opinion in Immunology**, **15** (1):112-119.

HO, M.; WEBSTER, H.K.; LOOAREESUWAN S., SUPANARANOND, W.; PHILLIPS, R.E.; CHANTHAVANICH, P.; WARRELL D.A. 1986. Antigen-specific immunosuppression in human malaria due to *Plasmodium falciparum*. **The Journal of Infectious Diseases**, **153(4)**:763–771.

HVIID, L.; THEANDER, T.G.; ABU-ZEID, Y.A.; ABDULHADI, N.H.; JAKOBSEN, P.H.; SAEED, B.O.; JEPSEN, S.; BAYOUMI, R.A.L., JENSEN, J.B. 1991. Loss of cellular immune reactivity during acute *Plasmodium falciparum* malaria. **FEMS Microbiology Immunology**, **76**:219–228.

KRISHNEGOWDA, G.; HAJJAR, A.M., ZHU, J.; DOUGLASS, E.J.; UEMATSU, S.; AKIRA, S.; WOODS, A.S.; GOWDA, D.C. 2005. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*. **The Journal of Biological Chemistry**, **280(9)**: 8606-8616.

KWIATKOWSKI, D. 1990. Tumour necrosis factor, fever and fatality in falciparum malaria. **Immunology Letters**, **25(1-3)**: 213–216.

LEHRER, S. 2010. Association between malaria incidence and all cancer mortality in fifty U.S. States and the District of Columbia. **Anticancer Research**, **30(4)**:1371-1373.

LOOSE, L.D.1984. Characterization of macrophage dysfunction in rodent malaria. **Journal of Leukocyte Biology**, **36**: 703-718.

LUTY, A.J.F.; PERKINS, D.J.; LELL, B.; SCHMIDT-OTT, R.; LEHMAN, L.G.; LUCKNER, D.; GREVE, B.; MATOUSEK, P.; HERBICH, K.; SCHMID, D.; WEINBERG, J.B.; KREMSNER, P.G. 2000. Low interleukin-12 activity in severe *Plasmodium falciparum* malaria. **Infection and immunity**, **68**(7): 3909–3915.

MC CALL M.B.B.; SAUERWEIN, R.W. 2010. Interferon- $\gamma$  central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria. **Journal of leukocyte biology**, **88**: 1-12.

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

MILLINGTON, O.R.; DI LORENZO, C.; PHILLIPS, R.S.; GARSIDE, P.; BREWER, J.M. 2006. Suppression of adaptive immunity to heterologous antigens during *Plasmodium* infection through hemozoin-induced failure of dendritic cell function. **Journal of Biology**, **5**: 5.

MILLS, C. D.; KINCAID, K.; ALT, J.M.; HEILMAN, M.J.; HILL, A.M. 2000. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **The Journal of Immunology**, **164**: 6166-6173.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, PORTAL DA SAÚDE. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=21400](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21400). Acesso em: 26/03/2010.

MOTA, M.M.; BROWN, K.N.; HOLDER, A.A.; JARRA, W. 1998. Acute *Plasmodium chabaudi chabaudi* Malaria infection induces antibodies and promote their phagocytosis by macrophages in vitro. **Infection and Immunity**, **66** (9): 4080-4086.

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

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. ("WORLD HEALTH ORGANIZATION") Disponível em: <http://www.who.int>. Acesso em: 06/2011.

PATEL, S.N.; LU, Z.; AYI, K.; SERGHIDES, L.; GOWDA, D.C.; KAIN, K.C. 2007. Disruption of CD36 impairs cytokine response to *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositol and confers susceptibility to severe and fatal malaria in vivo. **The journal of Immunology**, **178**:3954-3961.

PERRY, J.A.; RUSH, A.; WILSON, R.J.; OLVER, C.S.; AVERY, A.C. 2004. Dendritic cells from malaria-infected mice are functional APC. **The Journal of Immunology**, **172**:475-482.

PERLMANN, P.; TROYE-BLOMBERG, M. 2002. Malaria and the immune system in humans. **Malaria Immunology. Chemical Immunology. Basel, Karger**, **80**:229–242.

POUNIOTIS, D.S.; PROUDFOOT, O.; BOGDANOSKA, V.; SCALZO, K.; KOVACEVIC, S.; COPPEL, R. L.; PLEBANSKI, M. 2005. Selectively impaired CD8+

but not CD4+ T cell cycle arrest during priming as a consequence of dendritic cell interaction with plasmodium-infected red cells. **The Journal of Immunology**, **175**: 3525–3533.

SCHWARZER, E.; TURRINI, F.; ULLIERS, D.; GIRIBALDI, G.; GINSBURG, H.; ARESE, P. 1992. Impairment of macrophage functions after ingestion of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes or isolated malarial pigment. **The Journal of Experimental Medicine**, **176**: 1033-1041.

SCHWARZER, E.; MULLER, O.; ARESE, P.; SIEMS, W.G.; GRUNE, T. 1996. Increased levels of 4-hydroxynonenal in human monocytes fed with malarial pigment hemozoin. A possible clue for hemozoin toxicity. **FEBS Letters**, **388**: 119-122.

SCHWARZER, E.; ALESSIO, M.; ULLIERS, D.; ARESE, P. 1998. Phagocytosis of the Malarial pigment, hemozoin, impairs expression of major histocompatibility complex class II antigen, CD54, and CD11c in human monocytes. **Infection and Immunity**, **66** (4): 1601–1606.

SERGHIDES, L.; KAIN, K.C. 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ -retinoid X receptor agonists increase CD36- dependent phagocytosis of *Plasmodium falciparum* – parasitized erythrocytes and decrease malaria-induced TNF- $\alpha$  secretion by monocytes/ macrophages. **The Journal of Immunology**, **166**(11): 6742-6748.

SHARPE, A. H.; FREEMAN, G. J. 2002. The B7- CD28 superfamily. **Nature Reviews Immunology**, **2**: 116-126.

SHEAR, H. L.; SRINIVASAN, R.; NOLAN, T.; NG, C. 1989. Role of IFN-g in lethal and non-lethal malaria in susceptible and resistant murine hosts. **The Journal of Immunology**, **143**:2038-2044.

STAFFORD, J.L.; NEUMANN, N.F.; BELOSEVIC, M. 2002. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. **Critical Reviews in Microbiology**, **28**(3):187-248.

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

TRINCHIERI, G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, **3**: 133-146.

TSUJI, M., ZAVALA, F. 2003. T cells as mediators of protective immunity against liver stages of *Plasmodium*. **Trends in Parasitology**, **19** (2): 88-93.

URBAN, B. C.; FERGUSON, D. J.; PAIN, A.; WILLCOX, N. ; PLEBANSKI, M.; AUSTYN, J. M.; ROBERTS, D. J. 1999. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. **Nature**, **400**: 73–77.

URBAN, B. C.; WILLCOX, N.; ROBERTS, D. J. 2001. A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **98**: 8750–8755.

URBAN, B.C. ROBERTS, D. 2002. Malaria, monocytes, macrophages and myeloid dendritic cells: sticking of infected erythrocytes switches of host cells. **Current opinion in Immunology**, **14**: 458-465.

URQUART, A. D. 1994. Putative pathophysiological interactions of cytokines and phagocytic cells in severe human *falciparum* malaria. **Clinical Infectious and Diseases**, **19**:117.

XU, X. ; SUMITA, K.; FENG, C.; XIONG, X.; SHEN, H.; MARUYAMA, S.; KANO, M.; ASANO, Y. 2001. Down-regulation of IL-12 p40 gene in *Plasmodium berghei* - infected mice. **The Journal of Immunology**, **167**:235-241.

WILSON, N. S.; BEHRENS, G. M.N. ; LUNDIE, R. J. ; SMITH, C. M. ; WAITHMAN, J.; YOUNG, L. ; FOREHAN, S. P. ; MOUNT, A. ; STEPTOE, R. J.; SHORTMAN, K. D. ; KONING-WARD, T. F.; BELZ, G.T.; CARBONE, F.R.; CRABB, B.S.; HEATH, W.R.; VILLADANGOS, J.D. 2006. Systemic activation of dendritic cells by toll-like receptor ligands or malaria infection impairs cross-presentation and antiviral immunity. **Nature Immunology**, **7**(2): 165–172.

WYKES, M.N.; GOOD, M.F. 2008. What really happens to dendritic cells during malaria? **Nature Reviews Microbiology**, **6**: 864-870.

WYKES, M.N.; LIU, X.Q.; JIANG, S.; HIRUNPETCHARAT, C.; GOOD, M.F. 2007. Systemic tumor necrosis factor generated during lethal *Plasmodium* infections impairs dendritic cell function. **The journal of Immunology**, **179** (6): 3982-3987.

VASAN,S.; TSUJI, M. 2010. A double-edged sword: The role of NKT cells in malaria and HIV infection and immunity. **Seminars in Immunology**, **22**: 87-96.