

**FÁTIMA M<sup>a</sup> CALDEIRA BRANT COSTA**

**PAPÉL DO RECEPTOR ARIL-HIDROCARBONO (AhR) NA  
MALÁRIA CEREBRAL EXPERIMENTAL CAUSADA POR  
*Plasmodium berguei* Anka**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Belo Horizonte**

**2011**

**FÁTIMA M<sup>a</sup> CALDEIRA BRANT COSTA**

**PAPEL DO RECEPTOR ARIL-HIDROCARBONO  
(AhR) NA MALÁRIA CEREBRAL EXPERIMENTAL  
CAUSADA POR *Plasmodium berguei* Anka**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do título de Mestre em Neurociências.**

**Orientação: Profa. Dra. Fabiana Simão Machado**

**Co-orientação: Prof. Dr. Antônio Lucio Teixeira Junior**

**Belo Horizonte  
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG  
2011**

Costa, Fátima Maria Caldeira Brant

Papel do receptor Aril-hidrocarbono (AhR) na malária cerebral experimental causada por *Plasmodium berguei* Anka. [manuscrito] / Fátima Maria Caldeira Brant Costa. – 2011.

118 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Fabiana Simão Machado. Co-orientador: Antônio Lúcio Teixeira Júnior.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Resposta imune - Teses. 2. Barreira hematoencefálica – Teses. 3. Ferro – Metabolismo – Teses. 4. Neurociências – Teses. 5. Receptores celulares – Teses. 6. Malária cerebral. I. Machado, Fabiana Simão. II. Teixeira Júnior, Antônio Lúcio. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612.8: 616.936



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS  
[www.ufmg.br/neurociencias](http://www.ufmg.br/neurociencias)

**“Papel do receptor Aril-hidrocarbono (AhR) na malária cerebral experimental causada por *Plasmodium berguei* Anka”**

**Aluna: Fátima Maria Caldeira Brant Costa**

Dissertação defendida em 18/11/2011.

Resultado: *APROVADA*

Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Profa. Fabiana Simão Machado  
UFMG (orientadora)

Prof. Antônio Lúcio Teixeira Júnior  
UFMG (co-orientador)

Profa. Fabíola Mara Ribeiro  
UFMG

Profa. Vanessa Pinho da Silva  
UFMG

## **AGRADECIMENTOS**

Tudo começou com uma conversa no corredor.....uma ideia, e muita ajuda!!

Para começar, agradeço a Fabiana pela oportunidade de poder estar fazendo um trabalho que eu gosto muito. Pelo incentivo, acolhida, carinho, exemplo, amizade, por tudo! Você sabe misturar a arte de ensinar com o dom da convivência!! A meu co-orientador, professor Antônio, pelo exemplo, dedicação, orientação.

A colegas do laboratório LINDIN, vale muito ter vocês todos como colegas e amigos! Muito obrigada! Lísia, que se diz brava, mas é só fachada!!! Muito obrigada pela paciência, pelos Facs, por seu carinho e amizade. Ronan, sempre pronto a ajudar com toda calma e paciência, ensinando-nos até os mínimos detalhes!! Andréia parece mal-humorada, às vezes, mas nem ligo, porque sei que não é comigo rrsrrsr! Bruno IC, Bruno Cabral, Cynthia, Fernandinha, Ricardo, Diego, Tayara vamos trabalhar muito ainda, esperem um pouco!!

Para começar, muito obrigada a todos os alunos “do Antônio” pela ajuda, em todos os momentos, especialmente: Davi, Marcinha, Norinne, Aline, vocês sempre estão disponíveis para ajudar! Aline não tem nem como agradecer pelo tanto que você me ajuda, por sua amizade! Serei eternamente grata! Natália, sempre pronta a ajudar, seja no Facs, na estatística, em tudo! Não poderia esquecer que com vocês eu aprendi que fazer 30 placas de ELISA no domingo pode ser muito divertido!!! Agradecimento mais que especial a todos por me salvarem, constantemente!

Um agradecimento muito especial a todos da família IMUNOFAR. É muito bom fazer parte de uma equipe assim: que podemos contar em TODOS os momentos mesmo!!! E sempre de bom humor!! Isso não tem preço!!!! Fred, sem você não haveria PCR!!!! Muito obrigada! Tiça, apesar de falarem que você é muito mal-humorada, você me ajudou muito na dosagem das transaminases, nem reclamou, aliás estava muito boazinha!!!!

Como não poderia deixar de ser, toda família tem um “pai”: Professor Mauro Martins muito obrigada pela sua disposição em ajudar, por me acolher na sua “família”.

As professoras Dani e Vanessa: é muito bom conviver com vocês!!! Faz todo dia ser especial!!

A professora Daniela Bonaventura e Lucas Kangussu por me ajudarem nos experimentos, pela boa vontade, disponibilidade, sugestões, por estarem sempre prontos! Muito obrigada mesmo!!!

A professora Milene Rachid, muito obrigada pela disponibilidade e pelo seu sorriso! Sempre atendendo às nossas “urgências”!

Ao professor Jader e a todos do seu laboratório por estar sempre dispostos a ajudar seja por um problema científico ou uma ferramenta!!! Lá sempre encontramos uma solução!!

A professora Leda e todos os seus alunos por podermos sempre contar em todos os apertos!! Muito obrigada pelo apoio e pelo bom humor! Isso faz muita diferença num dia “daqueles”!

A professora Silvia Guatimosim e aos seus alunos, que me ajudaram e me ensinaram que é possível “vencer” o western blott!!! Pedro, Amanda, Mariana, Aline e Enéas, muito obrigados pela ajuda, paciência e disponibilidade!!

A todos que participaram de alguma forma na execução deste trabalho!! Ilma, Frank, sem o apoio de vocês, não teria feito nem metade!!!

Aos professores Cláudio Marinho e Sabrina Ephifanio da USP, além de cederem a cepa do *Plasmodium berghei* ANKA- GFP, me ajudaram nos procedimentos de manutenção da mesma. Leandro, Henrique, Renato, muito obrigada pela eterna paciência e disponibilidade! Vocês me ajudaram muitas vezes, benditos e-mail e skype!!!! Muito obrigada mesmo!

Ao professor Homero da ANALISA GOLD por me ajudar nas dosagens de ferro sérico e pela doação do kit. Muito obrigada pela ajuda!

Ao Diego, Marisa e todos do Xerox do ICB (Milcopy) pela paciência e boa vontade sempre!!

Agradeço as agências de fomento: CNPq e FAPEMIG, cujo apoio foi fundamental!

A toda minha família: meu pai, minha mãe, Flávia, Fernando, Rogério, Paulinha, Clarice, Theu, Camila, Dani e Elciane. Obrigada pelo apoio, carinho, por entender a minha falta de horário, por estarem presentes quando eu preciso!

A meus amigos Ângela, Mé, Éder, Marina, Ana Paula, Silvana e todos que trabalharam comigo, sei que estou em falta: agora vamos por as conversas em dia!!! Será?! Obrigada por compreenderem minhas ausências e por me apoiarem incondicionalmente, mesmo quando não respondo nem pelo Facebook!!.

Por fim, agradeço a Deus que está comigo em todos os momentos, fazendo que tudo no final dê certo... se não deu é porque ainda não chegamos no final!

*“Desta forma eu digo: Não deixe de fazer algo que gosta devido à falta de tempo, a única falta que terá será desse tempo que infelizmente não voltará mais”.*

*Mário Quintana*

## RESUMO

A malária é uma das mais sérias doenças infecciosas humana, responsável por mais de 1 milhão de mortes anualmente, principalmente crianças menores de 5 anos na África sub-Saara. Malária Cerebral (MC) é a principal complicação da malária, causando alto índice de morbidade e mortalidade. Diversos fatores podem influenciar a patogênese da MC, entre eles a resposta inflamatória, quebra da BHE e alterações metabólicas.

O receptor Aril hidrocarbono-AhR, é um fator de transcrição gênica ativado por ligantes. O AhR, foi reconhecido como o receptor de ligação de poluentes ambientais, como a dioxina, e tem importante papel na modulação da resposta imune contra patógenos, além de participar de diversos processos biológicos fundamentais. A atuação desse receptor, dependente do ligante, pode induzir o perfil Treg/Th17. Mas, a sua participação na MC é desconhecida.

No presente trabalho foi investigado possíveis associações entre o AhR e a resposta neuro-imunológica utilizando o modelo experimental de MC por *Plasmodium berghei* ANKA (PbA). Camundongos WT e AhRKO fêmeas infectados intraperitonealmente, com a cepa PbA, por meio de inóculo padronizado. Camundongos AhRKO são mais susceptíveis a MC, apresentando alta carga parasitária. Apresentaram no baço, aumento de INF- $\gamma$ , IL-12, IL-10, mas, redução na produção de TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ . No cérebro, órgão alvo da infecção por PbA, ocorreu menor produção de IFN- $\gamma$  e IL-12. Observamos, também nos KO, uma maior produção de IL-6, IL-17 e TGF- $\beta$ , além de aumento na expressão de FOXP3. Além disso, observamos no timo uma deficiência na geração de células Treg. Tais fatos podem indicar um aumento de polarização TH17 nos camundongos deficientes em AhR.

Nossos resultados mostraram um aumento nos níveis de transaminases hepáticas, especialmente TGP, aumento de inflamações e áreas degeneradas, assim como o aumento na concentração de ferro sérico no fígado em camundongos AhRKO-PbA. Todas essas alterações podem indicar que ocorreu grave lesão hepática no fígado dos animais AhRKO infectados. Camundongos AhR-KO infectados, tiveram aumento na permeabilidade da BHE, o que juntamente com a resposta inflamatória e alterações metabólicas podem ter contribuído tanto para o desenvolvimento da patologia quanto para a morte precoce dos animais. Nossos dados sugerem que AhR pode contribuir significativamente para o desenvolvimento da MC.

**Palavras-chave:** AhR, Malária Cerebral, Resposta imune, Permeabilidade da BHE, Alterações hepáticas, Metabolismo ferro .

## ABSTRACT

The cerebral malaria (CM) is the major complication found in the individuals infected by the *P. falciparum*. However, the events that result in the development of CM are multi-factorial and could not be explained for only one mechanism. Mice infected with *P. berghei ANKA* (PbA) faithfully recapitulate many of the characteristics of human CM and it has been an important tool to investigate the disease pathogenesis. The Aryl Hydrocarbon receptor (AhR) is an intracellular receptor activated by ligands and is important to modulate the inflammatory response. However, the involvement of AhR in CM is not known.

The parasitemia was dramatically higher in AhRKO infected with PbA. In the spleen of PbA-infected AhRKO mice there was a significant increased expression INF- $\gamma$ , IL-12, IL-10 and decrease expression of TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  when compared with infected WT mice. Additionally, there was an increased level of TGF- $\beta$ , IL-6, IL-17 and high expression of FOXP3 in the brain of infected AhRKO mice when compared with WT counterparts. This data seems possible maybe indicated that Th17 polarization is promoted by stimulation of the AhR a ligand-dependent.

Our results show an increase levels of hepatic transaminases, especially ALT, increased inflammation and degeneration, as well as increase iron concentration in serum during infection in mice AhRKO PbA. All these changes may indicate that severe injury occurred in the liver of animals infected with AhRKO PbA.

AhR-deficient mice infected, had an increase in permeability of the BBB, which together with the inflammatory and metabolic changes may have contributed to the development of pathology in these animals culminating in early death observed. Our data suggest that AhR may contribute significantly to the development of CM.

**Keywords:** AhR, Cerebral Malaria, Immune Response, BBB breakdown, Liver changes, Iron metabolism.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura1.</b> Aumento da ansiedade em camundongos AhRKO no teste do labirinto em cruz elevado.....	64
<b>Figura2.</b> Reversão parcial do estado ansiogênico nos camundongos AhRKO durante a infecção por PbA.....	67
<b>Figura 3.</b> Comprometimento na retenção da memória de longa duração em animais AhRKO durante a tarefa de reconhecimento de novos objetos.....	69
<b>Figura 4.</b> Desempenho dos camundongos AhRKO e WT ao longo da infecção por <i>Plasmodium berghei</i> ANKA (PbA).....	71
<b>Figura 5.</b> Curso natural da infecção em camundongos AhRKO infectados por <i>P. berghei</i> ANKA.....	73
<b>Figura 6.</b> Aumento da produção de IL-12p70 e IFN- $\gamma$ no baço de animais WT e AhRKO infectados com <i>P. berghei</i> ANKA.....	77
<b>Figura7.</b> Redução da produção de TNF- $\alpha$ , mas não de IL-1 $\beta$ e IL-10, no baço de camundongos AhRKO infectados com <i>P. berghei</i> ANKA.....	78
<b>Figura 8.</b> Redução esplênica da produção de TGF- $\beta$ , FOXP3, SOCS1, SOCS2 e SOCS3 em camundongos AhRKO infectados com PbA.....	79
<b>Figura 9.</b> Diminuição da produção de IL-12p70 e IFN- $\gamma$ no cérebro de camundongos WT e AhRKO infectados com PbA.....	82
<b>Figura 10.</b> Aumento da produção de IL-6 e IL-17 no cérebro de camundongos WT e AhRKO infectados com <i>P. berghei</i> ANKA.....	83

<b>Figura 11.</b> Aumento da produção de TGF- $\beta$ mas não de IL-10 no cérebro de camundongos WT e AhRKO infectados com <i>P. berghei</i> ANKA.....	84
<b>Figura 12.</b> Redução da geração de células Treg no timo de camundongos AhRKO infectados com <i>P. berghei</i> ANKA.....	86
<b>Figura 13.</b> Diminuição da geração de células CD4+ e CD8+ no timo de camundongos AhRKO infectados com <i>P. berghei</i> ANKA.....	87
<b>Figura 14.</b> Aumento dos processos de rolamento e adesão em camundongos AhRKO infectados com <i>P. berghei</i> ANKA.....	89
<b>Figura 15.</b> Alterações histológicas no cérebro de camundongos WT e AhRKO infectados por <i>P.berghei</i> Anka.....	91
<b>Figura 16:</b> Alterações na pressão arterial, permeabilidade vascular e produção de óxido nítrico nos camundongos WT e AhRKO infectados com <i>P. berghei</i> Anka.....	94
<b>Figura 17.</b> Alterações hepáticas nos camundongo AhRKO durante a infecção por <i>P. berghei</i> ANKA com inoculo de $1 \times 10^5$ hemácias parasitadas.....	98

## Lista de Abreviaturas e Siglas

AHR- Receptor Aril hidrocarbono

APC - Célula apresentadora de antígeno

BDNF- Fator neurtrófico derivado do cérebro

BHE - Barreira hematoencefálica

GPI - Glicofosfatidil-inusitol

ICAM - Molécula de adesão intercelular

IDO- indoleamina -2,3- dioxigenase

IFN- $\gamma$  - Interferon gamma

IL10- Interleucina 10

IL-1 $\beta$ - Interleucina 1Beta

IL-12- Interleucina 12

IL-17- Interleucina 17

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

LPS - Lipopolissacarídeo

LXA4- Lipoxina

MC - Malária cerebral

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

NGF- Fator de crescimento neuronal

NK- Célula “natural killer”

NO - Óxido nítrico

OMS - Organização Mundial de Saúde

PAMPS - Padrões moleculares associados a patógenos

PfEMP1 . proteína 1 do *P. falciparum* na membrana do eritrócito

PPRS - Receptores de reconhecimento padrão

pRBC- Eritrócitos parasitados por *P. falciparum*

SNC - Sistema Nervoso Central

SOCS- Supressor de sinalização de citocinas

TCDD- 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (dioxina)

TGO- Aspartato amino transferase

TGP- Alanina amino transferase

Th1- célula T helper1

Th2- célula T helper2

Th17- célula T helper17

Treg- célula T reguladora

TLRs - Receptores do tipo “Toll”

TGF- $\beta$  - Fator transformador de crescimento beta

TNF-  $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>38</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>62</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>100</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>115</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>117</b>

# *Introdução*

## 1. Introdução

A malária é uma das três doenças infecciosas mundial mais importante, com grande impacto no mundo, particularmente na morbidade, mortalidade e consequências econômicas deletérias (Hunt & Grau, 2003). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO), em 2010 ocorreram aproximadamente 225 milhões de casos e 781 mil mortes (principalmente crianças abaixo de 5 anos) e aproximadamente 3,3 bilhões de pessoas - metade da população mundial- estão em áreas de risco de malária (World Malária Report 2010- WHO)

O programa de controle baseado no uso de inseticidas, a partir de 1950, levou à eliminação da malária na América do Norte, Europa e Austrália (Girard et al., 2007). Entretanto, a malária ainda é endêmica em muitos países, a maioria na região africana.

A doença tem contribuído efetivamente para o baixo crescimento econômico de muitos países endêmicos (cuja renda *per capita* é 20-50 vezes mais baixa do que a de países ricos) e muitos países tropicais pobres têm sido incapazes de controlar a malária (Good et al., 2005). A malária causa, em média, uma perda de 1,3% de crescimento econômico anual nos países com intensa transmissão (WHO 2011). O custo da malária é em média, o equivalente a 10 dias de trabalho para as famílias das áreas rurais afetadas pela doença. O custo anual direto e indireto com a malária na África sub-Saara foi estimado em \$ 12 bilhões/ano (Girard et al., 2007).

Na América Latina, o maior número de casos ocorre na Amazônia brasileira, composta pelos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, com registros médios de 500 mil novos casos por ano (Secretaria de Vigilância em Saúde-SVS /Ministério da Saúde-MS, 2008). A grande extensão geográfica da área endêmica, as condições climáticas e a ocupação

desordenada favorecem o desenvolvimento dos agentes transmissores e causais da malária.

Houve uma queda expressiva no número de casos de malária, nos últimos quatro anos, no Brasil; em 2005, foram notificados 607.827 casos, enquanto que em 2007, foram 457.659 casos, o que representa uma redução de 24,7% (SVS/MS, 2008). A maior parte dos casos de malária na Amazônia é devido ao parasita *Plasmodium vivax* (79,6%), seguido pelo *P. falciparum* (19,3%). De 2006 para 2007 houve uma redução nos casos de malária por *P. falciparum* em praticamente todos os estados endêmicos da Amazonia Legal, cujo percentual passou de 25% em 2006 para 19% em 2007. Mas nos estados do Tocantins e Mato Grosso houve um aumento nos casos de *P. falciparum* de 57,1% e 44,1%, respectivamente, nesse mesmo período (SVS/MS, 2008). No ano de 2009, o Brasil registrou 306.908 casos de malária, sendo 99,8% dos casos confirmados oriundos da Região Amazônica.

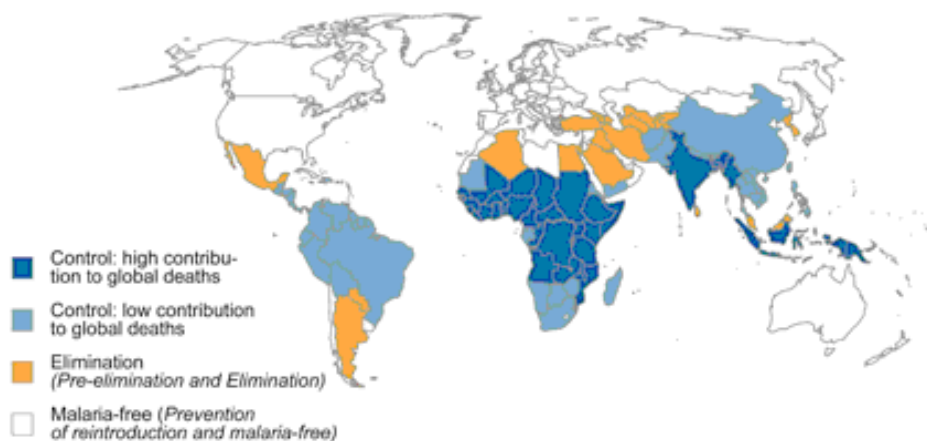
Apesar de todos os esforços feitos para erradicar a malária do mundo, ela ainda é um grave problema de saúde em vários países. Vários fatores contribuem para que o controle da doença não seja eficiente (Geenwood & Mutabingwa, 2002):

- resistência do *P. falciparum* à cloroquina (droga antimalárica mais comum e barata) usada de forma indiscriminada em muitos países
- resistência do mosquito-vetor ao inseticida piretroide
- mudanças ambientais/climáticas
- crescimento populacional / aumento de turistas nas áreas de risco
- instabilidade política e social
- falta de pessoal adequadamente qualificado para implementar os programas de controle/erradicação da doença

- dificuldades econômicas para implementar programas efetivos de controle da doença

Esses fatores resultam no aumento de criadouros do mosquito, na destruição do seu habitat, fazendo com que se aproximem das áreas urbanas, facilitando a introdução de novas cepas do vetor e do contato do vetor infectado com pessoas sem imunidade específica à malária.

A WHO possui um plano de ação, iniciado em 1995-Estratégia Global de Malária-, estabelecendo estratégias e metas que norteiam os esforços para erradicar a malária. Essas estratégias enfatizam a importância de se conhecer as características regionais específicas de cada país, buscando ferramentas mais eficientes e eficazes para controlar o mosquito vetor, melhorar o diagnóstico e o tratamento da doença, além de fornecer aos países endêmicos suporte técnico e financeiro para combater a doença (Mapa 1).



**Mapa 1- Distribuição da malária no mundo de acordo com o nº de mortes e grau de controle da doença.** Fonte: WHO-Roll Back Malaria, 2011

## Patogênese da Malária

A malária é uma doença infecciosa sistêmica, causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*. O ciclo de vida do parasita inclui uma fase de desenvolvimento no mosquito, uma fase clinicamente assintomática no homem, fase extra-eritrocítica, seguida pela invasão de eritrócitos maduros pela forma infectante (merozoítos), que inicia o estágio patogênico intra-eritrocítico (Malaguarnera & Musumeci, 2002).

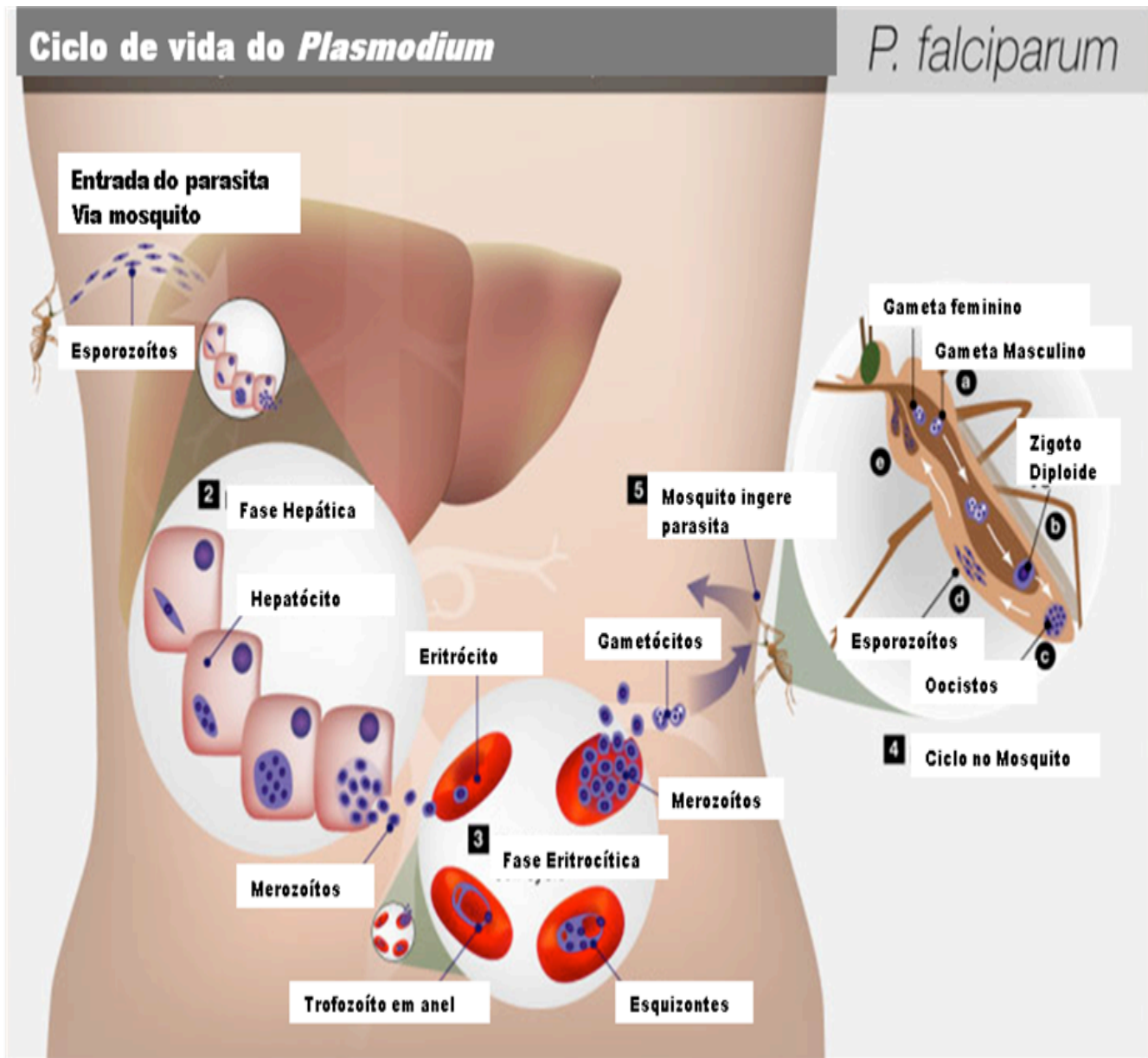
Atualmente são conhecidas cerca de 150 espécies, mas apenas quatro parasitam o homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale* (Neves, 2005). *P.ovale* causa uma infecção tipicamente “benigna”. *P. malariae* causa frequentemente uma doença clinicamente silenciosa. *P.vivax* é a causa comum da doença com febre aguda, especialmente na Ásia, América do Sul e Oceania, raramente fatal, mas podendo contribuir para anemia.

*Plasmodium knowlesi*, uma espécie que causa malária em macacos nas florestas do sudeste asiático, foi recentemente reconhecida como a 5ª espécie de *Plasmodium* causadora de malária em humanos. Essa espécie era considerada, até alguns anos atrás, tipicamente uma zoonose, raramente infectando seres humanos. Mas recentemente, foi reportado um grande número de pacientes infectados por essa espécie (Richards & Beeson, 2009; Mishra & Wiese, 2009; Bronner et al., 2009).

A maioria dos casos graves e fatais de malária é causada pelo ciclo eritrocítico do *P. falciparum* endêmico, em grande parte da África sub-Saara e em muitos países tropicais (Sholfield & Grau, 2005). Ondas endêmicas ocorrem, normalmente, conforme a densidade das chuvas no local, determinando um aumento pronunciado da população dos vetores. O ciclo do parasita no interior do vetor é tanto mais rápido quanto maior for a temperatura, até um limite de 33° C. Assim, regiões equatoriais, onde as condições

climáticas são relativamente estáveis (umidade e temperatura), a transmissão da malária pode ser permanente (Unifesp, 2009).

A infecção malárica inicia-se quando os esporozoítos infectantes são inoculados no homem pela fêmea do mosquito *Anopheles sp* infectado durante o repasto sanguíneo (Neves, 2005). Durante o estágio extraeritrocítico, o esporozoítos invade o hepatócito e inicia a reprodução assexuada por um período de 5-10 dias. Cada esporozoítos produz cerca de 10.000 merozoítos por hepatócito infectado. Os merozoítos invadem as hemácias (RBC) iniciando a fase intra-eritrocítica da infecção (Malaguarnera & Musumeci, 2002). Ao invadir o eritrócito, inicia-se uma fase cíclica na qual progride para trofozoítos e para esquizonte maduro, que ao romper o eritrócito liberará novos merozoítos que invadirão outros eritrócitos (de Souza & Riley, 2002). Quando do rompimento do eritrócito, além de liberar o esquizonte, são liberados também pigmentos maláricos-hemozoína (produto da digestão da hemoglobina pelo parasita da malária). Após vários ciclos sanguíneos ocorre a diferenciação em estágios sexuais, os gametócitos. Os gametócitos formados no homem são ingeridos pelo vetor durante a hematofagia. Dentro do mosquito, o parasito amadurece até alcançar o estágio sexual (fase esporogônica) onde, novamente, pode infectar o hospedeiro humano (Neves, 2005) (Esquema1).



Esquema 1: Ciclo de vida do *Plasmodium*

Fonte: <http://marudg.wordpress.com/2010/03/23/ciclo-de-vida-del-parasito-de-la-malaria/> modificado

A maioria das infecções com os agentes causadores da malária são clinicamente silenciosas, refletindo a habilidade dos mecanismos imunes na prevenção da doença (Schofield & Grau, 2005). Entre os sintomas típicos da malária incluem febre intermitente, sudorese, mal-estar, vômitos e intensa debilidade física. A sintomatologia é decorrente principalmente do rompimento dos eritrócitos parasitados (pRBC).

Uma característica central da infecção por *P. falciparum* é o sequestro de formas maduras de pRBC e o estágio de anel dentro de micro-vasos dos principais órgãos do corpo, predominantemente cérebro, coração, pulmões e a submucosa do

intestino delgado, resultando nas formas graves da malária (de Souza & Riley, 2002; Clark & Cowden, 2003). Dependendo do órgão/tecido obstruído, a resposta do organismo pode ter características e sintomas clínicos diversos, demonstrando assim, a importância no desenvolvimento da doença da interação de fatores tanto parasita-específico quanto hospedeiro-específico (de Souza & Riley, 2002; Miller *et al.*, 2002; Mung'ala-odera *et al.*, 2004; Newton *et al.*, 2000).

### **Malária cerebral (MC)**

A MC afeta o sistema nervoso central (SNC) ocorrendo em aproximadamente 1% dos infectados por *P. falciparum* (Hunt & Grau, 2003), sendo responsável pela maioria das mortes de pacientes infectados, principalmente crianças africanas (Renia *et al.*, 2006). A incidência de malária grave vem aumentando, provavelmente devido à resistência do parasita às drogas antimaláricas comumente usadas -cloroquina- (de Souza & Riley, 2002).

Segundo a OMS, a MC pode ser definida como uma síndrome clínica caracterizada por coma de pelo menos 1h após o término da convulsão ou correção da hipoglicemia, com detecção de formas assexuadas do *P. falciparum* no sangue periférico e exclusão de outras causas de encefalopatias (Idro *et al.*, 2005).

Os pacientes mais afetados são aqueles que não têm imunidade adquirida à malária: crianças menores de 5 anos e viajantes vindos de áreas onde a malária não é endêmica (Girard *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Sarkar *et al.*, 2009). Das crianças afetadas pela MC que sobrevivem, muitas tem manifestações neurológicas persistentes ao longo da vida (Good *et al.*, 2005; Idro *et al.*, 2005; Girard *et al.*, 2007).

MC normalmente desenvolve rapidamente após um ataque inicial de febre de 2-3 dias, podendo apresentar dores de cabeça, vômitos, seguidos de alterações sensoriais

e/ou convulsão (Sarkar et al.,2009). Os sintomas clínicos desta fase inicial são inespecíficos, dificultando a sua diferenciação das encefalites, meningites e convulsões febris, frequentemente retardada de modo significativo o início do seu tratamento, aumentando ainda mais o risco de sequelas e morte. Esses sintomas iniciais progridem rapidamente podendo ocorrer aumento da pressão intracraniana, hemiparesia, ataxia e coma. As drogas antimaláricas normalmente usadas -Artemísia e Quinino- são insuficientes para reverter e aliviar os sintomas (de Souza et al., 2009).

A marca histopatológica de MC é a dilatação dos capilares e vênulas cerebrais com RBC parasitados ou não (Newton et al., 2000). Estudos “post-mortem” em cérebros de indivíduos que sucumbiram à MC foi constatada a presença de inchaços e hemorragia na substância branca da área subcortical e corpo caloso (de Souza et al., 2009) e hemorragias petequiais tanto no córtex cerebral e cerebelar (Haldar et al., 2007). Alterações morfológicas, como ativação da micróglia, redistribuição de astrócitos, modificações na barreira hematoencefálica (BHE) e dano neuronal já foram identificados nos portadores da MC (Desruisseaux et al., 2008). Podem estar presentes também hemorragias e deposição de hemozoína - além de edema cerebral (Medana et al.,2001). Em modelo murino observou áreas focais de inflamação e danos hemorrágicos em diversas regiões cerebrais: fórnix, tálamo, hipocampo, mesencéfalo e cerebelo (Desruisseaux et al., 2008) e hemorragia no prosencéfalo e no tronco cerebral (Lackner et al., 2006).

A diversidade de complicações neurológicas associadas a MC indica que múltiplas áreas do cérebro são afetadas por essa condição (de Souza et al., 2009). O mecanismo exato que leva aos déficits cognitivos ainda não foi elucidado e possivelmente é decorrente da interação de diversos fatores (Kihara et al., 2006; Desruisseaux et al., 2008). Fatores como a duração e profundidade do estado de coma,

número de reinfecções, idade, hipoglicemia, situação socioeconômica e má nutrição podem interferir nos déficits cognitivos (Kihara et al., 2006), além dos efeitos da própria inflamação (Desruisseaux et al., 2008).

Apesar da reversibilidade do estado de coma, uma proporção significativa dos sobreviventes apresenta complicações neurológicas permanentes, incluindo desordens da fala, anormalidades motoras, problemas de comportamento, prejuízos na memória e cegueira cortical (de Souza & Riley, 2002; Idro et al., 2005; Desruisseaux et al., 2008; Kihara et al., 2006; Kihara et al., 2009). A patologia da MC é multifatorial e complexa (Hunt et al., 2006), cujo mecanismo permanece incompletamente entendido (Medana & Turner, 2006).

### **Modelos experimentais de Malária Cerebral**

O estudo de MC em seres humanos é muitas vezes impossível de ser realizado por barreiras práticas e também éticas. Os modelos murinos têm permitido avaliar todos os estágios da doença, mesmo antes da manifestação de sintomas clínicos (Medana et al., 2001; Desruisseaux et al., 2008; Lackner et al., 2006). Diversas linhagens de animais geneticamente e/ou farmacologicamente modificados permitem estabelecer, cada um com sua especificidade, características patológicas da MC (Lou et al., 2001). Dependendo da linhagem do animal e da cepa do parasita empregado, é possível estudar as modificações específicas ocorridas no organismo em virtude dessa interação, além de permitir manipulações experimentais para investigar importantes eventos, que ocorrem durante o desenvolvimento da MC. De fato, o modelo experimental utilizando roedores é bem caracterizado e útil para a pesquisa científica. A grande diversidade de linhagens de camundongos associada à infecção com diferentes espécies de *Plasmodium* (*P.*

*chabaudi*, *P. yoelii*, *P. berghei* e *P. vinckei*) têm contribuído para elucidar mecanismos envolvidos na patogênese da doença (De Souza e Riley, 2002).

Dentre os diversos modelos experimentais de MC, aquele que melhor reproduz as características da síndrome humana é o *Plasmodium berguei* ANKA. A infecção com essa cepa em camundongos C57BL/6 e CBA, apresenta uma patologia cerebral cujos sinais clínicos incluem ataxia, convulsões, dificuldade respiratória e coma (de Souza & Riley, 2002; de Souza et al., 2009; Penet et al., 2005), sintomas esses, similares aos da MC humana (Desruisseaux et al., 2008).

Além de apresentarem todos esses sinais clínicos, nesse modelo também ocorre o sequestro de pRBC e resposta imune deletéria (Hunt & Grau, 2003), quebra da BHE, hemorragias petequiais (Penet et al., 2005) e edema (Medana et al., 2001).

### **Patogênese da Malária Cerebral (MC)**

MC tem sido associada, além do sequestro de pRBC, ao sequestro de leucócitos e plaquetas nos micro-vasos cerebrais (Coltel *et al.*, 2004), ao acúmulo de células mononucleares nos tecidos do cérebro e ao aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (Randall *et al.*, 2008, Cabrales *et al.*, 2011), às alterações metabólicas no SNC como a elevação das concentrações cerebrais de lactato e alanina, alterações na via da quinurenina, aumento da atividade glutamatérgica (Sanni *et al.*, 2001; Rae *et al.*, 2004; Parekh *et al.*, 2006; Van de Heyde *et al.*, 2006, Miranda *et al.*, 2010) além de alterações sistêmicas decorrentes da hemólise como a liberação do heme livre (Ferreira *et al.*, 2008; Pamplona *et al.*, 2007).

## Teoria do sequestro

Entre as hipóteses que tentam explicar a patofisiologia da MC, podemos citar a obstrução mecânica ou sequestro. A teoria da obstrução mecânica sugere que a MC é consequência direta do sequestro de eritrócitos, o que acarreta obstrução do fluxo cerebral e hipóxia. O sequestro de eritrócitos é um mecanismo complexo que envolve interações entre antígenos polimórficos localizados na superfície de eritrócitos infectados e receptores expressos nas células endoteliais do hospedeiro (De Souza e Riley, 2002) O sequestro então, seria uma estratégia de imuno-evasão do parasita que previne a remoção dos pRBC no baço contribuindo assim para a sua sobrevivência (Amante et al.;2010).

O ataque inicial dos merozoítos à superfície do eritrócito parece estimular uma onda de deformação ao longo da membrana, seguida por uma reorientação apical, a formação de uma junção estável das células parasita-hospedeiro, uma invaginação da membrana do eritrócito, que resulta na entrada no eritrócito através do motor actina-miosina (Richards & Beeson, 2009; Halder et al.,2007). O tempo gasto neste processo é em média de 1-2 minutos e, é somente neste período que o parasita fica diretamente exposto ao ambiente extracelular, durante o estágio eritrocítico.

Dentro do pRBC, o parasita induz uma série de modificações na superfície da célula que permite a sua adesão à parede endotelial dos capilares (citoaderência), que é mediada pela proteína 1 do *P. falciparum* na membrana do eritrócito (PfEMP1) formando protuberâncias ou “*Knobs*”. De fato, o eritrócito passa a expressar na sua membrana a proteína PfEMP1 do parasita, a qual apresenta múltiplos domínios de adesão localizados na sua região extracelular que são capazes de reconhecer diversos receptores do hospedeiro (Miller et al., 2002), como por exemplo os receptores das células endoteliais CD36 e ICAM-1 tem sido descrito como o principal ligante

envolvido no sequestro nos capilares cerebrais. Um aumento da expressão deste receptor no endotélio cerebral resultaria em citoaderência, cujos danos seriam responsáveis pelas complicações da MC, pois contribuiriam com o sequestro dos pRBC, que podem levar à obstrução da microcirculação e conseqüente redução do fluxo de oxigênio.

Leucócitos (monócitos e macrófagos) e plaquetas também foram encontrados nos vasos cerebrais de pacientes com MC (Coltel et al., 2006; Wassmer et al., 2006; Combes et al., 2006). Além de ter um papel importante na obstrução dos vasos cerebrais, plaquetas e pRBC têm efeito direto na integridade das células endoteliais (Wassmer et al., 2006).

Essa hipótese prevê uma correlação entre quanto maior a parasitemia maior a obstrução vascular pelos pRBC. Entretanto, estudos clínicos indicam que é baixa a correlação entre parasitemia e mortalidade: indivíduos com alta parasitemia são assintomáticos e indivíduos com baixa parasitemia sintomáticos (Van der Heyde et al., 2006). De fato, o fluxo sanguíneo pode ser prejudicado pelo sequestro dos pRBC e leucócitos causando um dano mais local que global, ou seja, mecanismos compensatórios entrariam em ação para aumentar o fluxo sanguíneo nos vasos colaterais dos locais obstruídos (Van der Heyde et al., 2006).

### **Teoria da Inflamação**

Outra teoria que tenta explicar a patogênese da MC é a teoria da inflamação postulada por Maegraith em 1948. Essa teoria sugere que a MC é resultado de uma resposta imune excessiva, envolvendo a ativação e mobilização das células imunocompetentes do sistema imune inato e adaptativo e de plaquetas em resposta aos antígenos do parasito acarretando uma produção exacerbada de citocinas pró-

inflamatórias tipo Th1, especialmente o Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ) e o Interferon Gama (IFN- $\gamma$ ) e a hiperativação de células T (Hunt e Grau, 2003; Hunt *et al.*, 2006; Van de Heyde *et al.*, 2006; Armah *et al.*, 2005) mas que também podem ser nocivas para o hospedeiro resultando em hemorragia, apoptose de células endoteliais e astrócitos, danos neuronais, e conseqüentemente, os sintomas neurológicos observados na MC (Van de Heyde *et al.*, 2006; Langhorne *et al.*, 2004).

De fato, o IFN- $\gamma$  parece ter um papel importante na resolução primária da malária não complicada, sendo que a superprodução de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  predispõe à malária grave (Togbe *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009). A sua indução, é consequência direta da ativação das células TCD4+ e TCD8+, mas outras células, como as NK e as células  $\gamma\delta$  também podem ser fontes desta citocinas (Haldar *et al.*, 2007). Na via de transdução de sinal, o IFN- $\gamma$  ativa a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) que induz a produção de óxido nítrico (NO) importante na eliminação de parasita intracelular.

Outra citocina importante durante a MC é o TNF- $\alpha$  que é liberado pelos monócitos em resposta a antígenos e tem sido implicado na patogênese da malária (Haldar *et al.*, 2007). Durante a MC existe uma produção persistente de TNF- $\alpha$  (Torre *et al.*, 2002) e em estudos com seres humanos observou-se que níveis plasmáticos mais altos de TNF podem predispor à MC e à morte, enquanto níveis mais baixos aumentam a proteção contra MC (Medana *et al.*, 2001; Hunt & Grau, 2003; Schofield & Grau, 2005; Haldar *et al.*, 2007). Esta citocina também participa na regulação da produção de IL-12 por macrófagos e é importante cofator para a produção de IFN- $\gamma$  por células NK estimuladas com IL-12 (Malaguarnera & Musumeci, 2002).

Toxinas maláricas como o GPI (glicosilfosfatidil inusitol) ligam-se ao receptor de reconhecimento padrão-PPR- do sistema imune inato que ativam a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF e LT, e produção de NO (Van der

Heyde *et al.*, 2006). Altos níveis de citocinas inflamatórias foram detectados na malária não-letal por *P. vivax*, sugerindo que as citocinas inflamatórias são necessárias, mas não suficientes para o desenvolvimento de MC.

Assim, NO pode ser um fator-chave na patogenicidade da malária apesar de estar envolvido também na defesa do hospedeiro, através da eliminação de organismos intracelulares, além de atuar na manutenção do “status” vascular e na neurotransmissão (Idro *et al.*, 2005). É uma molécula importante, porque sua função pleiotropica afeta tanto o sequestro de pRBC, quanto a inflamação e a hemostase (Hunt *et al.*, 2006). NO estimula a resposta imune mediada por macrófagos e linfócitos sendo um importante sinalizador intra e extracelular (Idro *et al.*, 2005), além de contribuir para a patogênese da MC (Good *et al.*, 2005). Estudos imunohistológicos sugerem que NO pode atuar como mediador local neuroativo contribuindo para o estado de coma em MC (Malaguarnera & Musumeci, 2002). Entretanto, administração exógena de NO teve um efeito protetor durante a malária cerebral experimental (Gramaglia *et al.*; 2006; Zanini *et al.*; 2011).

No controle da resposta Th1, IL-10 tem importante participação, ao inibir a secreção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  atuando assim como um fator protetor contra MC (Lou *et al.*, 2001; Hunt & Grau, 2003; Mitchel *et al.*, 2005). Em camundongos, a produção de IL-10 está relacionada com a proteção contra o desenvolvimento de patologias induzidas por TNF- $\alpha$  (Hunt & Grau, 2003). Camundongos resistentes á MC, ao receberem injeções anti-IL-10, morrem com MC e altos níveis de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Kossodo *et al.*, 1997). IL-10 pode controlar o desenvolvimento da MC não somente inibindo o excesso de produção de citocinas inflamatórias, mas também interferindo com a função das células endoteliais envolvidas nessa patologia (Amante *et al.*, 2007).

Em conjunto, esses estudos apontam que IL-10 parece ter um papel protetor na MC (Newton *et al.* 2000; Lyke *et al.*, 2004; Hunt & Grau, 2003; Amante *et al.*, 2007).

A modulação do balanço das respostas Th1 e Th2 durante a fase aguda da infecção malárica tem também a participação do TGF- $\beta$ . Essa citocina pode ser produzida por populações de células TCD4 e T regulatórias (Treg) induzidas no contexto inflamatório (Belkaid e Torbell, 2009). Além de ser um potente inibidor da produção de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , estimula IL-10 e inibe a expressão de moléculas de adesão. TGF- $\beta$  em modelos murinos é crucial para a ativação de macrófagos, sendo que essas células quando imaturas têm alta concentração de receptores para TGF- $\beta$  e são sensíveis à baixa concentração dessa citocina (Malaguarnera & Musumeci, 2002). Neste contexto, agiria como um repressor da resposta pró-inflamatória após eliminação/redução da carga parasitária, protegendo o hospedeiro das ações deletérias do TNF. Por outro lado, quando produzido precocemente frente à infecção, age como um bloqueador do desenvolvimento da resposta efetiva Th1 contribuindo para o crescimento exacerbado do parasita (Torre *et al.*, 2002).

A célula Treg tem emergido como um fator crítico na modulação da resposta imune em diversos modelos. A presença de Treg no sítio inflamatório geralmente contribui para a persistência do patógeno, porque limita a magnitude da resposta efetora (Belkaid, 2009). Por outro lado, elas também podem limitar os danos teciduais colaterais causados por uma vigorosa resposta imune contra patógenos (Belkaid e Torbell, 2009). Células Treg têm sido descritas com base na sua origem, geração e mecanismo de ação. Nesta classificação podemos citar duas principais subpopulações identificadas: as células Treg FOXP3+ naturais que se desenvolvem no timo mesmo anteriormente a exposição aos patógenos e as células Treg induzidas que se desenvolvem na periferia a partir de células TCD4+ após exposição a sinais vindos de citocinas regulatórias, drogas

imunossupressoras e moléculas vindas do patógeno ligadas APC (Belkaid & Torbell, 2009). O mecanismo de ação das células Treg no desenvolvimento da MC ainda não foi completamente elucidado.

Vários mediadores imunomodulatórios podem contribuir para o desfecho de uma infecção. Entre eles, podemos citar a lipoxina (LXA4) e o supressor de sinalização de citocinas 2 (SOCS2). LXA<sub>4</sub> é um eicosanoide derivado do metabolismo do ácido araquidônico (AA) pela ação da 5-lipoxigenase (5-LO). Esses compostos são mediadores lipídicos formados localmente após a interação célula a célula, podendo ocorrer durante a inflamação, promovendo a resolução de uma grande variedade de processos inflamatórios. LXA<sub>4</sub> atua na inibição da função dos leucotrienos, na migração de leucócitos, na produção de quimiocinas induzidas por TNF e na expressão das moléculas de adesão (Machado & Aliberti, 2008). Indivíduos com malária assintomáticos infectados por *P. vivax* apresentaram níveis reduzidos de LXA<sub>4</sub> em relação aos controles saudáveis (Bafica, 2007). Níveis sistêmicos de citocinas e também de LX podem não refletir a sua importância nos eventos cerebrais, assim como a sua liberação durante a infecção podem sofrer variações (de Souza et al., 2009).

A LXA4 pode-se ligar ao receptor nuclear de fatores de transcrição ativados, o receptor aril hidrocarbono (AhR), que é crítico para indução de SOCS2 (supressor de sinalização de citocinas 2) e seus efeitos anti-inflamatórios nesse sistema. SOCS2 é um membro da família de proteínas SOCS que inicialmente foi descrito como um regulador negativo da sinalização de citocinas (Rico-Bautista et al.; 2006; Kile & Alexander, 2001). Esta família é composta por oito membros (SOCS1-SOCS7 e CIS) que são caracterizados por possuírem um domínio c-terminal conservado SOCS-BOX (Rico-Bautista et al.; 2006; Yoshimura; 2009). SOCS-2 está envolvido na regulação de tumores em câncer de ovário, leucemia, pulmonar, participa do crescimento somático e

estimula a diferenciação de osteoblastos (Rico-Bautista et al.; 2006; Piessevaux et al.; 2008). A presença de SOCS-2 estimula a diferenciação neuronal através da inibição do hormônio GH (Turnley, 2005), e, recentemente foi demonstrado o seu papel no modelo de asma alérgica onde SOCS-2 teve importante papel no desenvolvimento e expansão da resposta TH2 (Knosp et al.; 2011). Entretanto, o papel de proteínas da família SOCS durante a malária não é conhecido.

Dessa forma, o resultado de uma infecção depende do delicado balanço na indução de mediadores pró e anti-inflamatórios que influenciarão na imunoproteção e/ou imunopatogênese da doença (Aliberti & Bafica, 2005; Machado & Aliberti, 2008; Idro et al., 2005; Hunt et al., 2006; Medana & Turner, 2006).

### **Alterações Metabólicas**

Como já foi dito, alterações neuroquímicas do SNC têm sido reportadas durante a MC (Hunt *et al.*, 2006; Penet *et al.*, 2005). Uma das vias alteradas é a via do metabolismo do triptofano, que é degradado através da ação da enzima 2,3-dyoxegenase (IDO), cuja atividade no SNC em condições fisiológicas é extremamente baixa, mas, é induzido pela ação do IFN- $\gamma$  durante processos infecciosos (Hunt *et al.*; 2006). IDO está expresso nas células endoteliais e durante a infecção por PbA tem sua expressão e ativação aumentada (Sanni *et al.*, 1998; Hunt *et al.*, 2006).

Outros metabolitos originados da degradação do triptofano e que parecem ter papéis importantes no desenvolvimento das alterações neurológicas na MC são os ácidos quinoléico e quinurênico (Sanni *et al.*, 2001; Medana *et al.*, 2001; Hunt e Grau, 2003). O ácido quinoléico possui atividade excitatória no SNC uma vez que é capaz de se ligar ao receptor de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA). Em altas concentrações pode ter um efeito neurotóxico, causando danos ao SNC, que incluem disfunções

mitocondriais e aumento da permeabilidade da BHE (Stone *et al.*, 2001; Stone *et al.*, 2003). Em contrapartida, o ácido quinurênico é considerado um antagonista natural do ácido quinoléico, com atividade neuroprotetora, uma vez que se liga aos receptores de glicina inibindo a ação excitatória do glutamato e de seus receptores, incluindo o NMDA (Stone *et al.*, 2003). Nesse sentido, um desequilíbrio na relação de produção ácido quinoléico/ácido quinurênico tem sido associado aos episódios de convulsão observados na MC humana e experimental (Sanni *et al.*, 1998; Dobbie *et al.*, 2000; Medana *et al.*, 2001).

Além disso, espécies reativas do oxigênio derivadas do ferro estão envolvidas em diversas injúrias vascular (Balla *et al.*; 2005). O *Plasmodium* induz uma excessiva hemólise no hospedeiro vertebrado, liberando cerca de 40% da hemoglobina contida dentro dos pRBCs que podem ser rapidamente oxidadas em ferro-hemoglobinas, o que por sua vez , libera rapidamente o heme, molécula citotóxica para o parasita quando gerada dentro dos RBCs e para o hospedeiro quando liberada na circulação (Pamplona *et al.*;2007; Ferreira *et al.*;2008, Pamplona et al., 2009).

O heme livre atravessa facilmente a membrana celular e pode sinergicamente acentuar o dano oxidativo celular, além de promover a quebra da integridade da BHE. Para superar a geração de heme livre dentro dos pRBCs, o *Plasmodium* estrategicamente, o polimeriza dentro da hemozoína. A formação da hemozoína permite a forma eritrocítica do *Plasmodium* replicar livremente dentro dos pRBCs , visto que a replicação vai levar indubitavelmente a hemólise e a liberação de heme livre na circulação (Ferreira *et al.*;2008). Quando expostas ao heme livre as células hospedeiras (murinas e humanas) aumentam a expressão de hemo-oxigenase 1 (HMOX-1), enzima responsiva ao stress, que cataboliza o heme em ferro (Fe), biliverdina e monóxido de carbono (CO) (Hunt *et al.*;2006; Ferreira *et al.*;2008). Em estudo com crianças

africanas, a presença de HMOX só foi detectada no cérebro daquelas que tinham MC (Clark & Cowden., 2003; Hunt *et al.*,2006).

O CO liberado pode ter efeito protetor através de sua ligação com a hemoglobina livre liberada dos pRBCs durante o estágio eritrocítico da infecção pelo *Plasmodium*. Esta ligação previne a liberação do heme e a geração do heme livre (Ferreira *et al.*; 2008). A prevenção do acúmulo de heme livre na circulação pode ser o efeito chave na proteção da MC via CO prevenindo a quebra da BHE e o desenvolvimento da malária cerebral (Pamplona *et al.*; 2007; Ferreira *et al.*;2008).

O ferro livre por sua vez pode catalisar a degradação oxidativa de diversos compostos biológicos como ácidos graxos, proteínas e ácidos nucléicos (Balla *et al.*;2005). A deficiência de ferro prejudica a função de vários compostos que estão ligados a ele como a diminuição da concentração de mioglobina e hemoglobina. A morbidade devido às doenças infecciosas é aumentada nas populações deficientes em ferro devido aos efeitos adversos no sistema imune porque as enzimas que regulam a resposta imune e replicação do DNA necessitam de ferro.

A OMS recomenda a suplementação de ferro para crianças e grávidas que estão em risco de desenvolvimento de anemias ferroprivas (WHO, 2001). Mas, em regiões de prevalência da malária, crianças que receberam suplementação de ferro tiveram aumento do risco de morbidade e mortalidade causadas pela malária. Em estudos com camundongos, a deficiência de ferro foi protetora no desenvolvimento da malária por *P. yoelii* devido à maior susceptibilidade das células à fagocitose (Portugal *et al.*;2011). Pacientes e camundongos com variações na hemoglobina também apresentam proteção contra o desenvolvimento das formas graves de malária (Ferreira *et al.*; 2011).

Desta forma, apesar da grande maioria dos casos de MC apresentarem além do sequestro, hemorragias, inflamação e alterações metabólicas está claro que esta

síndrome não tem um padrão homogêneo. Sendo uma síndrome tão complexa é improvável que um único processo seja responsável pela patogênese (de Souza & Riley, 2002; Hunt & Grau, 2003; Taylor *et al.*, 2004; Van der Heyde *et al.*, 2006; Combes *et al.*, 2006, Desruisseaux *et al.*;2010) e as razões para a variação na sua patologia não estão claras, mas, podem ser devidas à variação genética do hospedeiro e/ou parasita, fatores ambientais e a resposta imune do hospedeiro ao parasita (Artvanis-Tsakonas *et al.*,2003;Girard *et al.*, 2007; Mishra & Wiese, 2009; Medana & Turner, 2006; de Souza *et al.*, 2009).

### **Receptor Aril Hidrocarbono (AhR)**

O receptor Aril hidrocarbono está expresso em vários tecidos constitutivamente, é um fator de transcrição gênica ativado por ligantes- moléculas de baixo peso molecular- que faz parte da superfamília de proteínas PAS (Per-AhR/Arnt-Sim), as quais contêm proteínas envolvidas na detecção de mudanças intracelulares ou ambientais, sensações luminosas, potencial de oxigênio e redox (Stonckinger *et al.*; 2011). É um sensor citosólico para uma variedade de estímulos controlando a neurogênese, a vascularização, o ritmo circadiano, o metabolismo e resposta ao stress entre outras (Esser *et al.*; 2009). O AhR foi encontrado em diversos tecidos estando amplamente expresso no córtex, cerebelo, hipocampo e hipotálamo sendo seu padrão de distribuição fortemente correlacionado com neurônios gabaérgicos (Kajta *et al.*;2009; Lin *et al.*; 2009). Além disso, o AhR contribui para a expressão dos receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) e na expressão de BDNF nos neurônios corticais (Lin *et al.*;2009).

A ativação do AhR por um agonista, leva-o a se desligar das proteínas acessórias-chaperonas, se deslocar para o núcleo onde forma um dímero com o

translocador nuclear de aril hidrocarbono (ARNT). Esse heterodímero pode se ligar a regiões específicas do DNA- domínio XREs- e ativar as transcrições de genes alvos. O AhR então é exportado para o citosol e degradado (Puga et al.;2005;Stonckinger et al.; 2011).

O AhR foi reconhecido primeiramente como o receptor de ligação de poluentes ambientais como a dioxina ou 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), que levava a uma série de efeitos como: alterações epiteliais, câncer, involução tímica e imunossupressão (Esser; 2009; Mezrich et al.; 2010). Mas, já foi mostrado em diversos estudos, que várias moléculas endógenas são agonistas do AhR, como metabólitos derivados da via de triptofano (FICZ, IDO, kinurenina), prostaglandinas, heme metabolitos, lipoxinas, bilirrubina e biliverdina, flavanóides e índoles (Denison e Nagy;2003; Stockinger; 2009; Puga et al.;2005; Stonckinger et al.; 2011; Esser et al.; 2009; Mezrich et al.; 2010, Veldhoen e Duarte; 2010).

O AhR possui um papel importante na promoção da diferenciação de células TH17 e na indução da secreção de IL-22 (Stonckinger, 2009;Veldhoen; 2010). O AhR então, participa da regulação de Treg e Th17 de maneira ligante-específica podendo induzir imunidade ou tolerância (Stockinger; 2009; Quintana et al.; 2008; Ramires et al.; 2010; Veldhoen; 2010, Veldhoen et al; 2008).

Entretanto, o seu papel na malária cerebral ainda não foi elucidado.

# *JUSTIFICATIVA*

## 2. Justificativa

A malária é uma doença parasitária que afeta milhões de pessoas em todo mundo. Sua forma mais grave, a malária cerebral, é a principal causa de morte em crianças na região sub-Saara africana, e as sequelas cognitivas decorrentes da malária cerebral causam um enorme prejuízo econômico aos países com grande taxa de transmissão agravando seus déficits socioeconômicos.

A patogênese da malária é complexa e multifatorial. Torna-se cada vez mais claro que a desregulação da resposta inflamatória e metabólica desempenha papel central na patogênese da MC. Entender como o sistema imune é ativado para controlar ou eliminar a infecção e, como controlar a resposta imune para prevenir danos ao hospedeiro, são questões ainda a serem elucidadas. Modelos animais que mimetizam vários aspectos da doença humana, além de permitir estudos de intervenções farmacológicas e terapêuticas, podem contribuir com a elucidação de diversas questões ainda obscuras nessa relação do *Plasmodium* com humanos.

O receptor aril hidrocarbono (AhR), é um fator de transcrição ativado por ligantes, que participa de diversas vias de sinalização envolvidas na modulação da resposta imune tanto frente a ligantes externos quanto a ligantes endógenos. O AhR contribui para uma resposta imune adequada e participa da regulação de vias metabólicas. Em conclusão, o AhR parece ter papel relevante para o resultado da resposta imune, atuando em vias de controle visando minimizar o risco de desenvolvimento de reações imunes adversas e também nas respostas desencadeadas por patógenos. Estudar o papel do AhR, no desenvolvimento da MC experimental, é importante tanto para o entendimento das relações entre o sistema imune e o sistema nervoso quanto para elucidarmos os mecanismos envolvidos na patogênese dessa doença, que afeta milhares de pessoas em todo o mundo.

As evidências mostram a existência de diversos fatores interferindo no resultado da infecção, fatores relacionados ao hospedeiro, ao parasita e ao ambiente, assim como, as relações entre esses fatores trazendo, como consequências, o controle da doença ou a morte do hospedeiro. Cada um desses fatores pode ser um alvo para a intervenção, através do desenvolvimento de novas ferramentas, como drogas mais eficazes tanto no controle da doença quanto no alívio dos sintomas ou vacinas que ajudarão a minimizar o impacto dessa doença na vida de milhares de pessoas.

## *OBJETIVOS*

### 3. Objetivos

#### Objetivo principal

Determinar o papel do receptor AhR em modelo experimental de MC causada pela infecção por *Plasmodium berguei ANKA*

#### Objetivos específicos:

- I. Identificar se a ausência do AhR interfere no comportamento e cognição dos camundongos
- II. Avaliar se a infecção por *P.berghei ANKA* altera parâmetros comportamentais e cognitivos em camundongos deficientes em AhR.
- III. Identificar a contribuição do AhR no controle da replicação do parasita e na modulação das respostas imunes.
- IV. Determinar o papel do AhR no desenvolvimento de patologias decorrentes da infecção.

## *MATERIAL E MÉTODOS*

## 4. Material e Métodos

### ❖ Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas, com idade de seis a oito semanas. Os camundongos C57BL/6 foram obtidos no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-ICB-UFMG) e camundongos AhRKO foram obtidos no nosso biotério de criação (ICB-UFMG). Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, sob o número de protocolo 202/2010.

### ❖ Parasita e infecção dos animais

Os camundongos foram infectados, com a cepa *Plasmodium berghei ANKA-GFP clone cl15cy1* (a qual expressa *Green Fluorescent Protein*, GFP, constitutivamente durante todo o ciclo de vida), doada pelo prof. Dr. Cláudio Romero Farias Marinho (Departamento de Parasitologia, Universidade de São Paulo, USP). A rota de infecção foi intraperitoneal (i.p.) com inoculo padronizado de  $10^5$  hemácias parasitadas/camundongo, em solução tampão fosfato estéril (PBS, 200ul), para garantir um grau de infecção uniforme nos diferentes grupos (Grau *et al.*, 1986). Os eritrócitos parasitados (pRBC) usados para infectar os camundongos dos grupos experimentais foram obtidos através de uma passagem *in vivo* em camundongos C57/BL6 até alcançarem um percentual de PRBC entre 5 a 8% (Jansen *et al.*, 2006). A parasitemia foi obtida através de análise da expressão de GFP por citômetro de fluxo. Os animais controle, sem infecção, receberam por via i.p., o mesmo volume de PBS.

### ❖ Determinação da parasitemia

Para determinação da evolução da parasitemia, foi coletada a partir do 3º dia pós infecção (dpi) até a morte dos animais, uma gota de sangue (~ 3 ul) em 2 ml de PBS

estéril para análise por citometria de fluxo (FACScan – BECTON DICKINSON, USA) Os dados foram analisados no programa FACS Diva. Eritrócitos não infectados de C57/BL6 foram usados como parâmetros para identificar as propriedades específicas de tamanho x granulosidade (FSC/SSC). Os pRBC foram identificados através do aumento da fluorescência verde e expressos em percentual de PRBC. Um total de 100.000 eventos foi adquirido para cada amostra.

#### ❖ **Peso e Sobrevida**

As variações de peso e a sobrevida dos animais foram monitoradas diariamente ao longo da infecção. Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum*.

#### ❖ **Análises de parâmetros cognitivos e comportamentais**

Os parâmetros cognitivos e comportamentais foram avaliados por meio da bateria SHIRPA, do teste do Labirinto em Cruz Elevado, Campo Aberto, Reconhecimento de Objetos e Esquiva Inibitória. Antes dos testes, os animais foram conduzidos e mantidos no local do experimento para minimizar os efeitos da transferência sobre o resultado dos testes (Takahashi *et al.*, 2006). Os aparelhos foram devidamente limpos após a avaliação de cada animal, para evitar a influência de odores durante o teste.

##### **(a) Bateria SHIRPA**

A bateria de testes SHIRPA (sigla que significa SmithKline Beecham Pharmaceuticals; Harwell MRC Mouse Genome Centre and Mammalian Genetics Unit Imperial College School of Medicine at St Mary's Royal London Hospital; St Bartholomew's; Royal London School of Medicine; Phenotype Assessment) foi utilizada nesse estudo para avaliar alterações comportamentais e neurológicas durante o curso da infecção por PbA (Rogers *et al.*, 2001). Constitui um paradigma dos estudos comportamentais em animais, com metodologia e materiais padronizados e vem sendo

utilizada em estudos longitudinais. A bateria preliminar consiste em uma escala de observações quantitativas e semiquantitativas de reflexos e funções sensoriais básicas. Esta série de 40 testes é baseada naquela desenvolvida por Irwin (1968), e fornece um perfil comportamental e funcional a partir da avaliação do desempenho individual de cada animal (Rogers *et al.*, 1997).

A bateria SHIRPA foi realizada com animais controle (n=7) e com camundongos infectados a partir do 3º dpi. Inicialmente, registrou-se o peso do animal. O camundongo então é colocado em uma jarra de observação, localizada em cima de uma grade suspensa, e avaliado durante cinco minutos em relação à posição corporal, atividade espontânea, taxa de respiração, tremor, defecação (número de bolos fecais), micção, número de "*explorações*"(apoio apenas sobre as patas traseiras) e "*groomings*"(movimentos de "limpar" dirigidos a cabeça ou corpo, efetuados com as patas dianteiras). Transcorrido o tempo, uma chapa de metal é inserida sob a jarra de observação e o animal é transferido rapidamente para uma arena (campo aberto) sem ser manuseado e é observado em relação à excitação de transferência, atividade locomotora (número de entradas, com as quatro patas, em quadrados demarcados na arena em 30 segundos), fechamento das pálpebras, ereção do pelo, ambulação, elevação pélvica, elevação da cauda, escape ao toque e passividade posicional. O animal é então suspenso pela cauda e avaliado, sobre uma grade colocada em cima da arena, quanto à presença de encurvamento do tronco, capacidade de segurar as patas traseiras, posicionamento visual, força ao agarrar, tônus corporal, "*pinna reflex*", reflexo corneal, beliscada nos dedos da pata traseira e manobra do arame. A seguir, o animal é contido pelo dorso em uma restrição supina e são avaliados o comprimento corporal, cor da pele, frequência cardíaca, tônus dos membros, tônus abdominal, lacrimação, salivação, mordida provocada, reflexo postural, "*geotaxis*" negativo, medo, irritabilidade, agressão e

vocalização. Comportamentos estereotipados, bizarros e convulsões são também registrados.

Os parâmetros observados foram classificados em cinco categorias funcionais: estado neuropsiquiátrico, função reflexa e sensorial, tônus e força muscular, comportamento motor e função autônoma, para facilitar a análise dos dados, como realizado por Lackner *et al.* (2006).

### ***(b) Labirinto em Cruz Elevado***

Constitui um dos principais testes para avaliação da ansiedade em camundongos, sendo um método válido de investigação comportamental (File, 2001; Carola *et al.*, 2002). Baseia-se no conflito entre o desejo de explorar novos ambientes e o medo de áreas abertas e desconhecidas, além da associação de elementos ansiogênicos tais como elevação e iluminação (Lau *et al.*, 2008).

O labirinto em Cruz Elevado (Insight<sup>®</sup>, SP, Brasil) possui dois braços abertos e dois fechados, que emergem de uma plataforma central em direções opostas formando uma cruz. A plataforma apresenta uma elevação da base (38,5 cm) e o aparato é iluminado por lâmpadas nos quatro braços e pela claridade do ambiente onde é aplicado o teste.

O teste foi realizado com camundongos no 5º dpi (n=7) e com animais controle, sem infecção (n=7). Inicialmente, cada camundongo foi colocado na plataforma central do labirinto com a cabeça direcionada para o braço aberto. A seguir, o animal percorreu livremente o labirinto durante cinco minutos. A frequência com que o camundongo entrou com as quatro patas nos braços abertos e fechados e o tempo total em que permaneceu em ambos os braços foram registrados pelo avaliador.

A medida da ansiedade é a porcentagem de entradas e de tempo gasto nos braços abertos (tempo ou entradas nos braços aberto/tempo ou entradas nos braços abertos e fechados X 100), sendo que baixas porcentagens indicam maiores níveis de ansiedade. O número absoluto de entradas nos braços fechados do labirinto tem sido descrito como uma medida da atividade locomotora.

### **(c) Campo Aberto**

O teste comportamental denominado Campo Aberto (Insight®, SP, Brasil) é utilizado em estudos experimentais para investigar simultaneamente a atividade locomotora e exploratória. O aparato consiste em uma base quadrada branca (50 cm X 50 cm) com desenho circular do campo (30 cm de diâmetro). O campo é composto por 12 divisões demarcadas com linhas pretas e envolto por uma cúpula de acrílico transparente de 30 cm de altura e 30 cm de diâmetro. Para iniciar o teste cada camundongo foi colocado no centro do campo. O animal moveu-se livremente durante cinco minutos, enquanto foi observado por um avaliador. O número de linhas cruzadas pelo animal com as quatro patas (atividade locomotora) e o número de explorações-apoio apenas sobre as patas traseiras (atividade exploratória) durante os cinco minutos de teste foram registrados. O maior número de linhas cruzadas e de explorações indica um aumento da atividade locomotora e exploratória, respectivamente.

O teste de campo aberto foi também utilizado para avaliar aspectos cognitivos. Após uma sessão inicial de treino, de acordo com o protocolo já descrito, o teste foi repetido 24 horas após, para nova avaliação dos animais. A redução significativa na atividade locomotora e exploratória nessa sessão indica a preservação da memória, uma vez que é esperado que o animal se lembre do ambiente explorado anteriormente, na

sessão de treino e reduza o número de exploração e de locomoção realizado durante a sessão teste (Reis et al., 2010).

#### **(d) Teste de Reconhecimento de Objetos**

O teste de Reconhecimento de Objetos é utilizado em modelos experimentais com roedores na avaliação de aspectos cognitivos, como a memória de curta e longa duração. É baseado na tendência natural dos animais em explorar preferencialmente objetos desconhecidos (Desruisseaux *et al.*, 2008, Reis *et al.*, 2010). O teste foi realizado em um campo aberto de 40 x 60 cm, delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo 3 de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto é dividido em 12 quadrados iguais demarcados por linhas pretas. No primeiro dia foi realizado a habituação: o animal foi cuidadosamente colocado no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho e explorou o ambiente durante por 5 minutos. No segundo dia o animal foi recolocado no aparelho, no qual estavam dois objetos iguais em forma, tamanho e cor (A e B). O animal explorou novamente o ambiente por 5 minutos e o tempo gasto na exploração de cada objeto foi registrado. Uma hora e trinta minutos depois, avaliamos a memória de curta duração. O animal explorou novamente o ambiente na presença do objeto familiar (A) e de um novo objeto (C), diferente em forma, tamanho e cor. Registramos novamente o tempo total de exploração de cada objeto. No dia seguinte (24 horas após) avaliamos a memória de longa duração. Colocamos um novo objeto (D) e retiramos o objeto (C). O tempo de exploração de cada objeto foi novamente registrado. Um índice de reconhecimento foi calculado para cada animal: tempo gasto para explorar o objeto novo / tempo gasto na exploração de ambos os objetos (novo e familiar). Uma porcentagem maior de tempo gasto na exploração do objeto novo indica normalidade da função cognitiva (Tuon *et al.*, 2008).

## ❖ **Histologia**

Para avaliar as alterações estruturais e patológicas durante a infecção, estudos histopatológicos do tecido cerebral foram realizados. Os camundongos foram sacrificados por doses excessivas de anestésico (xilazina, Rompun<sup>®</sup>, Bayer e quetamina, Laboratório Cristália, SP). Durante a necropsia, o tecido cerebral foi coletado e fixado por imersão em solução de formol tamponado a 10%. Após o período de fixação (12 horas), os tecidos foram recortados e seccionados transversalmente. A cada animal foi dado um código que apenas foi revelado ao final de todas as análises.

Os tecidos foram, em seguida, submetidos à desidratação, com a finalidade de remover a água presente nos mesmos. O processo de desidratação foi realizado em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e absoluto I, II e III), sendo que os fragmentos permaneceram imersos, por um período de 30 minutos, em cada álcool. Após a etapa de desidratação, foi realizado o processo de diafanização, que tem como objetivo tornar o tecido translúcido. A diafanização consistiu em submeter os fragmentos a dois banhos de xilol, com duração de 20 minutos cada. Posteriormente, os tecidos foram impregnados e incluídos em parafina.

Os blocos de parafina, contendo o fragmento do órgão, foram submetidos à microtomia, sendo obtidos cortes seriados com 4 µm de espessura. Os cortes obtidos foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE). As lâminas obtidas foram avaliadas ao microscópico óptico, para estudos histológicos.

## ❖ **Quantificação dos níveis de citocinas no cérebro e baço por ELISA**

### **- Homogenato de cérebro e baço de camundongos**

Retiramos cérebros e baços de animais infectados e controles, os quais foram acondicionados e estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, as amostras foram pesadas (100 mg) e colocadas em 1,0 mL de solução inibidora de proteases para extração de citocinas (NaCl 0,4 M; Tween 20 0,05%; Albumina de soro bovino (BSA) 0,5%; Fluoreto de fenilmetilsufonila (PMSF) 0,1mM; cloreto de benzetônio 0,1 mM; EDTA 10 mM; 20 UI de aprotinina), preparada a partir de uma solução de tampão fosfato salina (PBS). As amostras foram maceradas por um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125, Fisher Scientific Pennsylvania, EUA) a uma velocidade ótima e a solução resultante foi centrifugada. O sobrenadante foi recolhido e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a sua utilização para detecção da concentração das citocinas: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-17 e IL-12p70 pelo método ELISA (Ensaio imunoenzimático: *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*).

### ***Determinações de citocinas por ELISA***

Os kits para ELISA de citocinas murinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e IL-12p70) foram obtidos da R&D Systems (DuoSet). Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). O ensaio foi feito de acordo com os procedimentos previamente descritos pelo fabricante. Resumidamente, adicionou-se o anticorpo de captura específico, que foi incubado por 18h a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após esse tempo a placa foi lavada e bloqueada por 2hs. Colocamos as amostras diluídas e os padrões de citocinas a partir de concentrações decrescentes, para estabelecimento da curva padrão de diluição recomendada pelo kit em uso. As placas foram incubadas por mais 18h/4  $^{\circ}\text{C}$ .

O anticorpo de detecção foi adicionado em cada placa, incubado por uma hora. A placa foi novamente lavada e uma solução contendo estreptavidina ligada à peroxidase (Pharmingen) foi adicionada. Após 30 minutos, a placa foi novamente lavada e depois foi adicionado o tampão de substrato contendo o-fenilenodiamina (OPD, Sigma) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck). O produto de oxidação do OPD foi detectado por colorimetria em um leitor de placas de ELISA (450 nm) (Molecular Devices, USA).

#### ❖ **Microscopia Intravital**

A técnica de microscopia intravital foi utilizada para avaliar o rolamento e a adesão de leucócitos na microvasculatura cerebral de camundongos infectados e controles. Os animais foram anestesiados via intraperitoneal com uma combinação de xilazina (10 mg/kg) e Ketamina (150 mg/Kg). A veia da cauda foi canulada para administração do corante rodamina (corante fluorescente que permite a visualização dos leucócitos) 6G Sigma (0.3mg/kg). A temperatura corporal dos animais foi continuamente monitorada com um sensor e mantida a 37°C com uma manta térmica (Fine Science Tools, FST, Canadá). A craniotomia foi realizada na região parietal utilizando uma mini-broca (Dremel,USA). A dura-máter e a aracnoide foram removidas, originando uma janela para visualização dos vasos sanguíneos da pia-máter. Este procedimento não rompe a barreira vascular da microvasculatura cerebral. A superfície do cérebro foi continuamente perfundida com uma solução de fluido cérebro-espinhal (CSF) artificial (composição iônica em mmol/L: NaCl 132, KCl 2.95, CaCl<sub>2</sub> 1.71, MgCl<sub>2</sub> 0.64, NaHCO<sub>3</sub> 24.6, dextrose 3,71 e ureia 6.7) à temperatura de 37°C, pH 7,35, que mantém a preparação estável sem evidência de inflamação no nível basal (Vilela *et al.*, 2008). A solução foi continuamente aerada a fim de manter a tensão gasosa e pH em níveis normais. Um microscópio (Olympus BX40), com objetiva 10X,

foi utilizado para observar os eventos micro circulatório nos vasos cerebrais. Após a localização dos vasos a serem estudados, injetou-se por via intravenosa (i.v.) uma pequena quantidade (0,5mg/kg) do corante rodamina 6G (Sigma). A fluorescência associada à rodamina 6G foi visualizada com epi-iluminação a 510-560 nm, usando um filtro de emissão de 590 nm. Uma câmera de vídeo (Optronics) projetou as imagens que foram gravadas para posterior análise. O número de leucócitos em rolamento e adesão foi avaliado em um vaso escolhido num comprimento de 100µm. O rolamento de leucócitos foi definido como células movendo a uma velocidade menor que o fluxo sanguíneo. Os leucócitos foram considerados aderidos ao endotélio se permanecessem estacionários por um período de 30 segundos. O rolamento, por ser um processo dinâmico, foi expresso como número de células/minuto. A adesão leucocitária foi expressa em número de células aderidas ao endotélio vascular (em 100µm de comprimento do vaso).

#### ❖ **Análise de marcadores celulares por citometria de fluxo**

Camundongos WT e AhRKO foram sacrificados no sexto dia de infecção, com dose letal de anestésico e foram perfundidos com PBS/EDTA 0,02%. Amostras de cérebro, baço e timo foram coletadas para a investigação do perfil das populações leucocitárias nos tecidos durante a infecção por PbA em camundongos.

#### **Purificação de leucócitos sequestrados no cérebro**

O tecido cerebral foi removido e triturado em meio RPMI 1640 (Life Technologies, Paisley, U.K.) contendo 5% de soro fetal bovino (SFB), utilizando um macerador de vidro. O homogenato de tecido cerebral foi filtrado em peneiras estéreis (*Cell strainer* - Becton Dickinson, Brasil) e centrifugado a 1.700 g /4°C/10 minutos.

O *pellet* celular foi ressuspendido em 5mL Percoll 35% (Sigma-Aldrich) e depositado em 5mL de Percoll 70%. Após a centrifugação (3.400g/22°C/20 minutos), os leucócitos foram coletados na interfase entre os gradientes de Percoll. Após lavagem em meio RPMI 1640, os leucócitos foram ressuspendidos em solução tampão (PBS contendo 1% de SFB e 0.01% NaN<sub>3</sub>).

O tubo foi completado com RPMI completo e centrifugado em 600g/5min/temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspendido em FACS buffer (1% BSA, 0,02% sódio azida, PBS 1X estéril). As células foram transferidas para um tubo contendo Ficoll-Paque e centrifugadas em 600g/10min/temperatura ambiente, sem freio na centrífuga. A camada superior e a segunda camada foram coletadas e transferidas para outro tubo com FACS buffer. A mistura foi centrifugada novamente em 600g/5min/temperatura ambiente e o *pellet* de linfócitos foi ressuspendido em meio completo composto de RPMI-1640 com L-glutamina (Cultilab, Campinas, Brasil), 40 UI/mL de penicilina (Ariston, São Paulo, Brasil), 40 mg/mL de gentamicina (Nova Farma, Anápolis, Brasil), 25 mM de HEPES (Sigma, St. Louis, EUA), suplementado com SBF inativado (Sigma, St. Louis, EUA) na concentração de 10%. As células foram então diluídas em corante Azul de Trypan e a contagem realizada em câmara de Neubauer. A seguir, as células foram plaqueadas na concentração de  $1 \times 10^4$  células/mL /poço.

#### **Purificações de leucócitos do baço e timo**

O baço e timo de camundongos WT e AhRKO controle e infectados foram retirados e mantidos no gelo. As células do baço foram retiradas, lavadas e submetidas à incubação com tampão de lise de hemácias - ACK- Acetato de Potássio 5M (NH<sub>4</sub>Cl/KHCO<sub>3</sub>) por 4 minutos. Em seguida tanto o baço quanto o timo foram macerados em

peneiras estéreis (*Cell strainer* - Becton Dickinson, Brasil) o volume foi completado para 40ml com PBS1X/EDTA e centrifugado a 3500 g por 5 minutos.

O sobrenadante foi retirado e acrescentou-se RPMI com 10% SBF seguido por centrifugação a 3500 g por 5 minutos. As células foram ressuspensas em RPMI completo com 10% SBF. As células foram então diluídas em corante Azul de Tripán e a contagem realizada em câmara de Neubauer. A seguir, as células foram plaqueadas na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL /poço.

### **Marcação das populações de linfócitos**

A marcação das populações celulares foi realizada com os seguintes marcadores: CD4 (linfócitos T CD4 e/ou T regulatórios), CD25 (linfócitos ativados e/ou Treg), FoxP3 (linfócitos Treg), CD3 (linfócitos T), CD8 (linfócitos T citotóxicos), F4/80 (macrófagos), CD11c (células dendríticas) além das citocinas IL-12 e IFN- $\gamma$ . Foram utilizadas as seguintes marcações: CD3 (CY5), CD4 (PE), CD8 (FITC), CD11c (FITC), CD8 (PERCP), FOXP3 (PE), CD25 (Biotina StrepCy5), CD4 (CY7), F4/80 (FITC), IL-12(PE) em diversas combinações (*mix* de anticorpos).

O protocolo de marcação foi realizado de acordo com o manual do fabricante. Em resumo, soluções contendo  $2 \times 10^6$  células/mL ou  $1 \times 10^4$  foram transferidas para placas de placa de 96 poços. Os mixes de anticorpos de superfície foram diluídos em PBS-BSA-AZIDA e os intracelulares diluídos em PBS-SAPONINA. Para CD25 BIOTINA: Foram adicionados estreptavidina aos poços marcados para CD25 BIOTINA. Nos outros poços, acrescentou-se PBS-BSA-AZIDA; colocamos formaldeído a 4% em PBS em todos os poços. Células com marcação apenas extracelular foram transferidas para os tubos de leitura de Facs, as outras com marcação intracelular adicionou-se PBS/SAPONINA, incubou-se a temperatura ambiente por 10 min. ao abrigo da luz; centrifugamos a placa a 1200 g, a 4°C por 10 min; adicionamos

os mAbs intracelular, centrifugamos novamente ,incubamos ao abrigo da luz por 30min em temperatura ambiente; adicionamos PBS/SAPONINA, centrifugamos, adicionamos PBS1X/AZIDA/BSA, centrifugamos colocamos PBS, centrifugamos novamente e adicionamos PBS e formaldeído a 3% em PBS aos poços; transferimos para os tubos de leitura de Facs.

As populações foram analisadas no citômetro FACScan (Becton Dickinson, San José, CA, USA) usando o software FACS Diva selecionadas através da delimitação de *gates* em que as células em estudo situam-se de acordo com o seu tamanho e granulosidade e com os marcadores específicos de cada população celular.

**❖ Reação da cadeia de polimerase por transcrição reversa em tempo real (RT- PCR)**

Inicialmente o baço de animais WT e AhRKO controles e infectados com *Plasmodium berghei* ANKA foi removido e as amostras armazenadas a -80°C. O nível de expressão de proteínas SOCS1, SOCS2, SOCS3 e FOXP3 foi avaliado.

Primer	SEQUÊNCIA	
	SENDO	ANTI-SENDO
SOCS1	GCATCCCTCTTAACCCGGTAC	AATAAGGCGCCCCACTTA
SOCS2	CGCGTCTGGCGAAAGC	TTCTGGAGCCTCTTTTAATTCTCTT
SOCS3	TTTGCCTTTGATTTGGTTG	TGGTTATTTCTTTGGCCAGCA
FOXP3	Sondas TaqMan- Applied Biosystems código: Mm00475165_m1	
18S	Sondas TaqMan- Applied Biosystems código: Mm03928990_g1	

**- Extração do RNA**

Amostras de cérebro (50mg de tecido) de camundongos controle e infectados (6ºdpi) foram homogeneizadas em TRIZOL (Invitrogen), utilizando-se um homogeneizador de tecidos(Ultra-Turrax). As amostras homogeneizadas foram incubadas por 5 a 10 min a uma temperatura de 15-30°C, para permitir a completa dissociação de complexos núcleo-proteicos. Em seguida, foram adicionados 200µL de clorofórmio (MERCK -P.A.) para cada 1mL de TRIZOL. Foi realizada agitação em *vortex* e depois incubação por 3 min de 15-30 °C. O homogenato foi centrifugado a 12.000g por 15 min a 8°C. Após a centrifugação, o RNA presente na fase aquosa foi transferido para microtubos novos. O RNA foi precipitado com 500µL de isopropanol (MERCK - P.A). As amostras foram incubadas por 10 min a 15-30°C e então centrifugadas a 12.000g por 10 min a 8°C e foi formado um *pellet*. Após descarte do sobrenadante, foi adicionado 1mL de etanol 75% (diluído em água tratada com DEPC). Uma nova centrifugação foi realizada (7.500g por 5 min, a 8°C), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* permaneceu durante 5 min a temperatura ambiente. Em seguida, o *pellet* foi diluído em água tratada com DEPC, em volume suficiente para diluir toda a amostra. O RNA foi estocado a -70°C.

#### **- Quantificação do RNA**

A quantificação das amostras de RNA foi realizada no espectrofotômetro NanoDrop ND1000 (Nano Drop Technologies, Wilmington, DE, EUA). A leitura do branco foi feita com água tratada com DEPC. O RNA foi quantificado pela absorbância a 260nm utilizando-se 1µL da amostra pura. O aparelho fornece a concentração em ng/µL.

### **Preparo do cDNA por transcrição reversa**

A reação de transcrição reversa do mRNA dos tecidos animais foi realizada utilizando-se 2µg de RNA de cada amostra, aos quais foi adicionado 50µM do *primer* Oligo dT (15) (Promega Cor., Madison WI, EUA). Foi feita uma incubação por 5min a 70°C e em seguida por 5 minutos no gelo. Em seguida, foi adicionada uma mistura de reagentes contendo 1µL de dNTPs a 10 mM (Promega Cor., Madison, WI, EUA), 4µL tampão M-MLV 5X (Promega Cor., Madison WI,EUA) e 200U da enzima Transcriptase reversa-M-MLV (Promega Cor., Madison WI, EUA) e 8,5µL de água Milli-Q autoclavada. A mistura foi incubada por 2 horas a 42°C quando ocorreu a transcrição reversa do mRNA. As amostras de cDNA foram conservadas a -20°C.

#### **- PCR em tempo real**

Para as reações subseqüentes de amplificação, 1µL de cada amostra de cDNA foi utilizada. PCR foi realizado em um volume final de 10µL contendo 5µL de Power SYBR Green PCR Master Mix 2X (Applied biosystems, Foster City,CA, EUA), 1µL de *primer* senso (5µM), 1µL de *primer* anti-senso (5µM) e 2µL de água Milli-Q. A reação foi realizada utilizando-se o protocolo para PCR com SYBR Green do termociclador Step One PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Em resumo, foi feita uma incubação inicial de 1 minuto a 95°C e, em seguida, 15 segundos a 95°C para desnaturação, 1min para anelamento e extensão a 60°C. Esses dois últimos passos foram repetidos 40 vezes e depois foi feita a curva de *melting*: 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e uma rampa de subida lenta de temperatura até 95°C. As análises dos resultados foram realizadas utilizando-se o gene da subunidade ribossomal 18S como *housekeeping*.

### **❖ Medidas dos níveis de Nitrato/Nitrito no homogenato de tecido cerebral pelo método de Griess**

As mesmas amostras de cérebro utilizadas para as dosagens de citocinas pelo método de Elisa foram utilizadas para detecção da produção de nitrito/nitrato pela reação de Griess após redução enzimática de nitrato a nitrito com a enzima nitrato redutase (Sigma, cat nº N7265) em solução de redução.

As concentrações de nitrito/nitrato foram avaliadas em diluição 1:3 em PBS contendo 1% de soro albumina bovina BSA, onde 50µL de cada amostra em duplicata foram colocadas em placas de 96 poços de fundo chato (Nunc-Maxsorp, EUA). A redução de nitrato nas amostras homogenato de tecido cerebral foi realizada pela incubação com tampão de redução contendo nitrato redutase (Sigma, EUA) a 37°C por aproximadamente 18 horas. Seguiu-se a detecção do nitrito com a adição 50µL de reagente de Griess (preparado pela mistura de volumes iguais de sulfanilamida a 1% em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 2,5% e 0,1% de nãfiteletilenodiamida em água). Após 10 minutos, absorvãncia foi medida a 540nm usando um leitor automãtico de microplacas (Molecular Devices, USA). As concentrações de nitrito foram calculadas por extrapolação para uma curva padrão de NaNO<sub>2</sub> e os dados expressos em µmoles de nitrito e nitrato.

### **❖ Concentrações de ferro no soro por método colorimétrico**

O sangue de animais controle e infectados foi coletado pela veia cava inferior, colocado em tubos heparinizados, centrifugados 5000 g por 10 minutos para obtenção do soro. As dosagens de ferro no soro foram realizadas no 3º, 5º e 6º dpi utilizando-se Kit comercial (GOLDANALISA, Cat 438, MS: 80022230079, MG, Brasil).

Em pH ácidoo íons fêrricos ligados a transferrina são dissociados e reduzidos a íons ferrosos por ação do ácidoo ascórbico. A intensidade da cor magenta brilhante

formada após a adição da Ferrozina, cuja absorbância é lida em 560nm é proporcional à quantidade de ferro na amostra.

#### ❖ **Níveis séricos de Transaminase hepáticas**

O sangue de animais controle e infectados foi coletado pela veia cava inferior, colocado em tubos heparinizados, centrifugados 5000 rpm por 10 minutos para obtenção do soro. A dosagem das transaminases hepáticas foi realizada através de teste colorimétrico utilizando Kits específicos para cada uma. A transaminase TGO dosada pelo Kit K034 e a transaminase TGP pelo Kit K035, ambos da Bioclin/Quibasa. A leitura foi realizada em leitor de ELISA no comprimento de onda de 505 nm. Os valores foram expressos em unidades (U)/ml.

#### ❖ **Avaliações da Pressão arterial e Frequência Cardíaca**

A pressão arterial sistólica (PAS) e a frequência cardíaca (FC) foram mensuradas nos animais não infectados e durante a infecção no 3º, 4º e 5º dpi. Os animais foram ambientados ao pletismógrafo durante 5 dias. A PAS e a FC foram determinadas através da técnica de pletismografia de cauda (não invasiva) em animais acordados. Conforme previamente descrito por Krege et al, 1995.

#### ❖ **Avaliação da permeabilidade vascular**

Para a avaliação da permeabilidade vascular, utilizou-se o corante azul de Evans como um marcador do extravasamento de albumina, como descrito previamente por Belayev *et al.*, 1996, em protocolo modificado por Souza *et al.*, 2000. O método consiste na determinação espectrofotométrica da quantidade de azul de Evans extravasado para o tecido. Animais não infectados e, com 5 dias após a infecção, foram anestesiados via

intraperitoneal com uma mistura de xilazina (10 mg/kg, Rompun®, Bayer) e Ketamina (150 mg/Kg, Laboratório Cristália, SP). Posteriormente, a veia da cauda foi canulada e foi administrado 100 µL de Azul de Evans (0.5%) intravenosamente. Ao final de trinta minutos, os animais foram sacrificados e perfundidos com salina fisiológica (5 mL por animal). O cérebro, pulmão e fígado foram retirados e colocados em uma placa de petri para secagem por 24 horas em estufa a 40°C. Em seguida, as amostras foram pesadas e foi acrescentado ao tecido 1mL de formamida para extração do corante por 24 horas, em temperatura ambiente. O corante extraído do tecido foi quantificado em leitor de ELISA, utilizando-se o comprimento de onda de 620nm (Molecular Devices, USA) e a concentração determinada através de uma curva padrão com concentração de 0.375 a 10µg/mL de azul de Evans. Os resultados foram normalizados e expressos como quantidade (em µg) de azul de Evans por 100 mg de tecido.

#### ❖ **Análises Estatísticas**

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Prisma 4.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Os dados foram relatados de forma descritiva utilizando-se as medidas de tendência central média e desvio padrão e/ou mediana e erro padrão. O nível de significância considerado foi  $P < 0.05$ .

# *Resultados*

## 5. Resultados

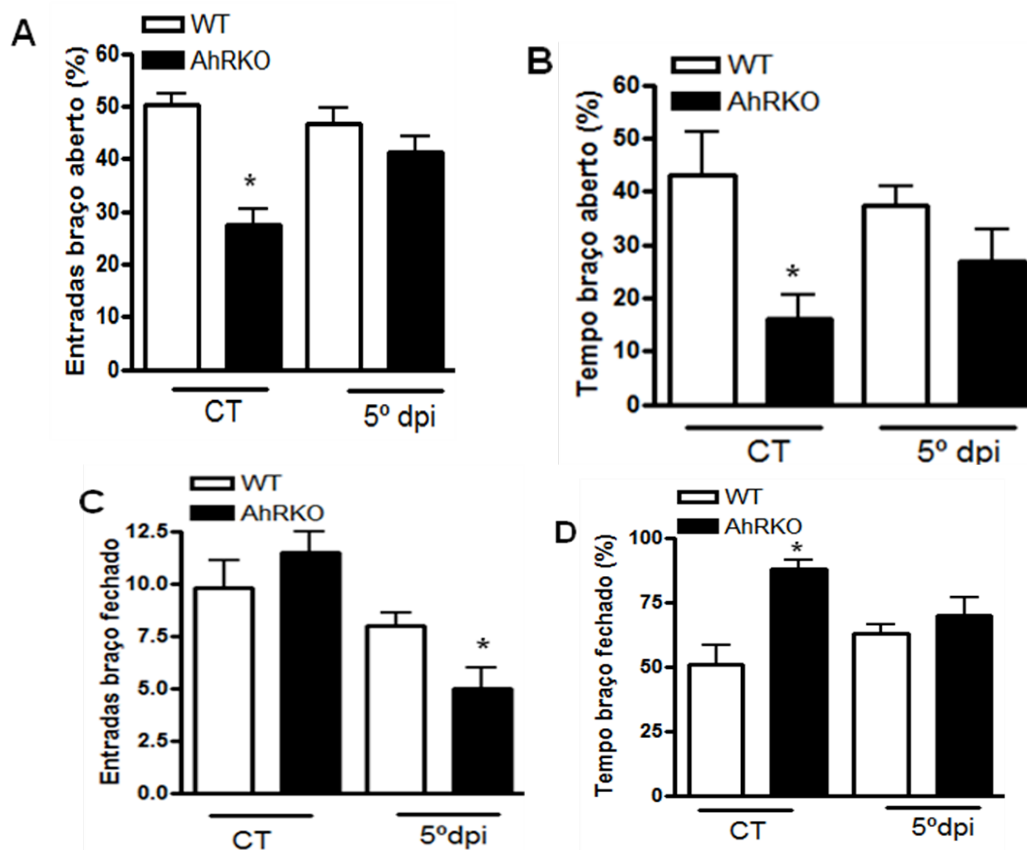
### AhR participa no controle da ansiedade em camundongos

O AhR está expresso em várias regiões cerebrais, entre elas hipocampo, hipotálamo e córtex, que participam de circuitos cerebrais de controle e modulação da ansiedade além de formação e consolidação de memórias. Entretanto, o papel desse receptor na modulação desses processos não é conhecido, tanto em indivíduos “saudáveis” quanto em indivíduos infectados com malária. De fato, durante a infecção por *P. falciparum* (humanos) ou *P. berghei* Anka (camundongos) a ocorrência de alterações cognitivas associadas à malária grave tem sido encontradas.

Para avaliar os estado de ansiedade dos animais WT e deficientes de AhR, infectados ou não com *P. berghei* Anka, primeiramente utilizou-se a tarefa do labirinto em cruz elevado, formado por dois braços fechados e dois braços abertos (sem parede) colocados em uma plataforma.

O estado de ansiedade foi avaliado pelo tempo de permanência e número de entradas no braço aberto - considerado aversivo, pois deixa o animal exposto. A maior porcentagem de tempo/entradas no braço aberto é indicativa de menor ansiedade. O número absoluto de entradas nos braços fechados do labirinto tem sido descrito como uma medida da atividade locomotora. Além disso, o animal tem a tendência natural em explorar um ambiente novo, o que provoca um aumento tanto do impulso para explorar quanto aumento do medo. Portanto, durante o teste o animal tem um conflito a vencer: exploração X proteção.

Nossos resultados indicam que deficiência de AhR resulta em um comportamento mais ansioso o qual foi parcialmente revertido no 5º dia pós infecção quando comparado com o WT (Figura 1A-D).



**Figura 1. Aumento da ansiedade em camundongos AhRKO no teste do labirinto em cruz elevado.** Fêmeas Wild-type (WT) e AhRKO controle (CT) e infectadas por PbA (5° dpi) foram avaliadas em relação a entradas e tempo de permanência nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado. Cada animal foi observado por 5 minutos e o tempo e n° de entradas nos braços abertos e fechados foi computado. (A) Porcentagem de entradas no braço aberto (B) Porcentagem de tempo no braço aberto (C) Porcentagem de entradas no braço fechado (D) Porcentagem de tempo no braço fechado. Barras representam a média e o SD do número total (n = 5/ grupo). Os dados foram analisados pelo teste t com correção de Welch  $p < 0.05$  (\*). Dados são representativos de 2 experimentos independentes.

## **Camundongos AhRKO apresentam diminuição da atividade locomotora e exploratória**

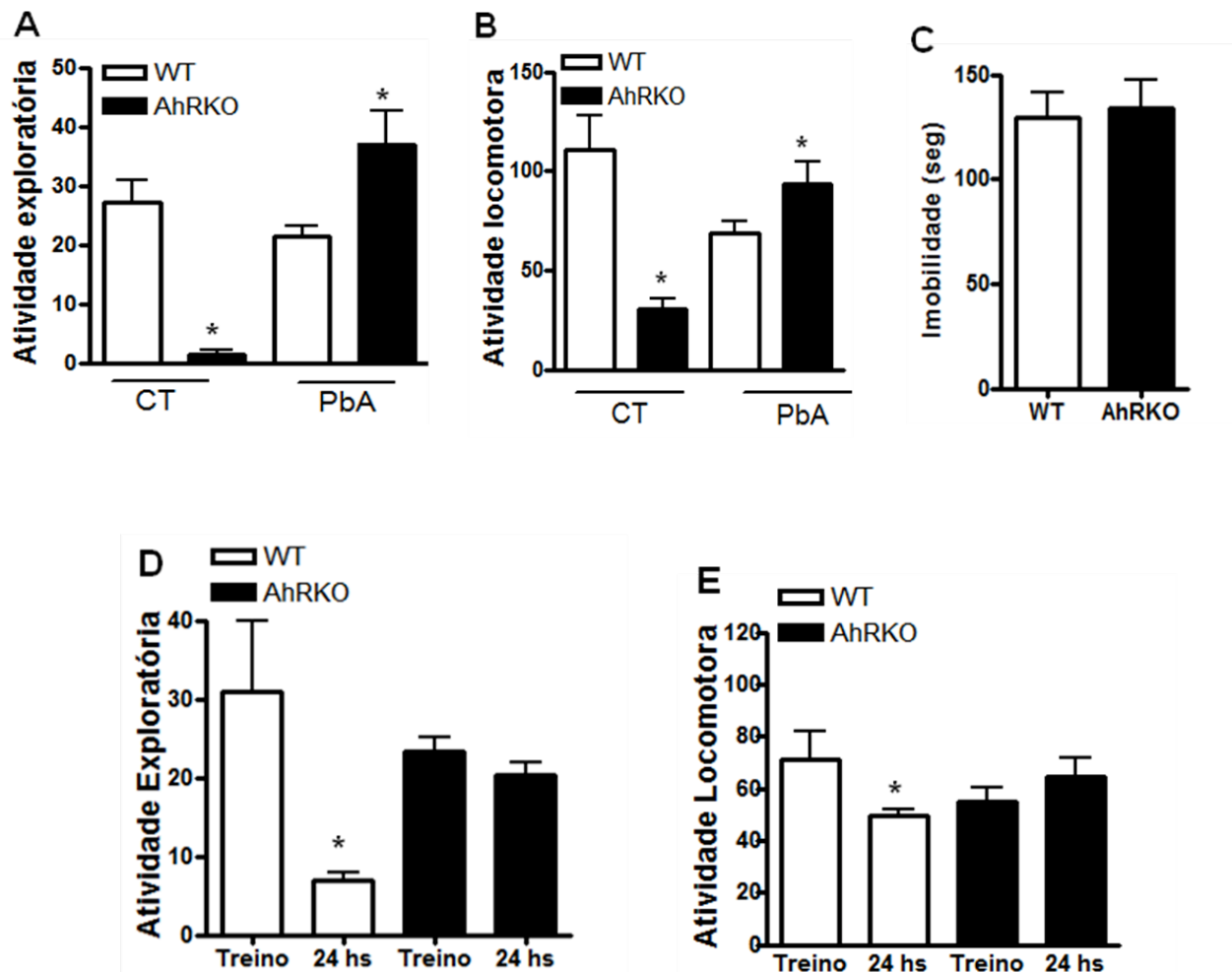
O teste do campo aberto (“open field”) foi concebido para medir respostas comportamentais tais como a atividade motora, a hiperatividade e comportamentos exploratórios. Os animais tendem a evitar espaços abertos, portanto o ambiente do teste funciona como um estímulo ansiogênicos. Sendo assim, o campo aberto também pode ser utilizado, secundariamente, como uma medida de ansiedade. Tanto a região anterior do hipocampo quanto a amígdala estão relacionadas com o comportamento ansioso e principalmente com a consolidação de memórias relacionadas à emoção, que pode modular a formação das memórias. Fatores estressantes como os estímulos ansiogênicos, podem comprometer a consolidação e formação de memórias.

A diminuição da locomoção e da exploração, sem nenhum *déficit* motor que justifique menor locomoção/exploração, sugere que os camundongos AhRKO antes da infecção apresentam um comportamento tipo ansioso, que foi observado tanto no labirinto em cruz elevado (Figuras 2A, B) quanto no teste do campo aberto (Figuras 1A-D). Durante a infecção (5° dpi) encontramos, novamente, uma reversão parcial deste fenótipo (Figuras 2A, B).

Muitos testes de ansiedade em modelo animal estão relacionados com a atividade do corpo (a locomoção). Para excluir algum déficit motor que poderia interferir no resultado do teste de campo aberto foi realizado também o teste do nado forçado, onde não houve diferenças entre WT e AhRKO (Figura 2C). O Teste do Nado Forçado é baseado na observação de que quando camundongos são colocados em um cilindro com água na qual não existe a possibilidade de escape, inicialmente realizam vários movimentos na tentativa de sair desta situação e após alguns minutos exibem

imobilidade. Caso haja um comprometimento motor, o tempo de imobilidade será maior.

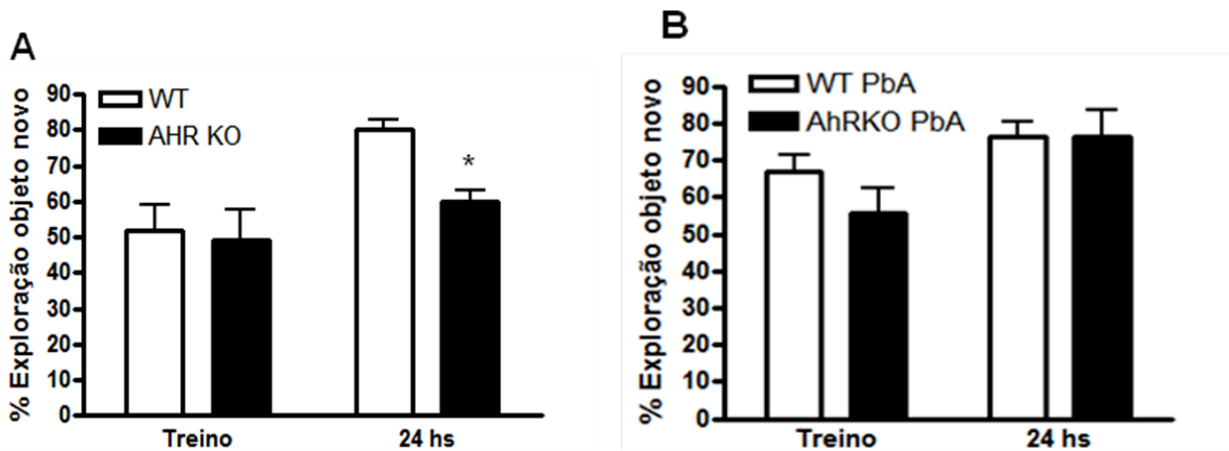
Como já foi dito, quando colocados em um ambiente novo, os camundongos têm a tendência em explorá-los. Quando o ambiente já é conhecido, a tendência é diminuir o comportamento exploratório. Camundongos AhRKO não têm diminuição na exploração no teste do campo aberto 24 hs após o treino, comparados com o WT (Figuras 2D, E). Esses dados sugerem que os camundongos AhRKO infectados apresentam um prejuízo cognitivo.



**Figura2. Reversão parcial do estado ansiogênico nos camundongos AhRKO durante a infecção por PbA.** Fêmeas WT e AhRKO foram avaliadas nos parâmetros de atividades locomotoras e exploratórias no teste do campo aberto. O n° total de quadrados percorridos em 5 minutos de observação foi usado como parâmetro de locomoção e o n° de “rearings” (elevação nas patas traseiras) foi o parâmetro de exploração. Atividades (A) exploratória (B) locomotora em camundongos WT e AhRKO controles (CT) e no 5ºdpi (PbA) no campo aberto. Animais WT e AhRKO -CTs foram colocados em um cilindro com água na temperatura ambiente (25°C) e durante 5 minutos foi computado o tempo de imobilidade que cada animal apresentava (C) Tempo de imobilidade dos animais WT e AhRKO controles no teste de nado forçado. Avaliação das atividades de exploração e locomoção na arena do campo aberto, em animais WT e AhRKO infectados (PbA), sendo a primeira sessão de treino e 24 hs após o teste para avaliar a cognição. Atividades (D) exploratória e (E) locomotora dos animais WT e AhRKO PbA. Barras representam a média e o SD do número total para WT (n = 5) e AhRKO (n=5). Os dados foram analisados pelo teste t com correção de Welch  $p < 0.05$  (\*). Dados são representativos de 2 experimentos independentes.

### **Comprometimento da memória de longa duração em camundongos AhRKO**

O AhR é altamente expresso no hipocampo, região cerebral que participa da formação de memórias de curto e longo prazo. Baseado na premissa de que os roedores possuem um comportamento inato de exploração e que têm a tendência de explorar por mais tempo aqueles objetos que desconhecem, quando apresentados simultaneamente a um objeto familiar, os animais foram colocados em uma arena de observação na presença de objetos (novos e familiares- conhecidos). Durante 5 minutos o tempo de exploração de cada um dos objetos foi cronometrado. O teste foi feito em intervalos de tempo distintos para avaliar a memória de longa duração (24hs). Os camundongos AhRKO apresentaram um déficit basal em relação a memória de longa duração (Figura 3A), cujo fenótipo parcialmente foi revertido ao serem infectados com *P. berghei* ANKA (Figura 3B).

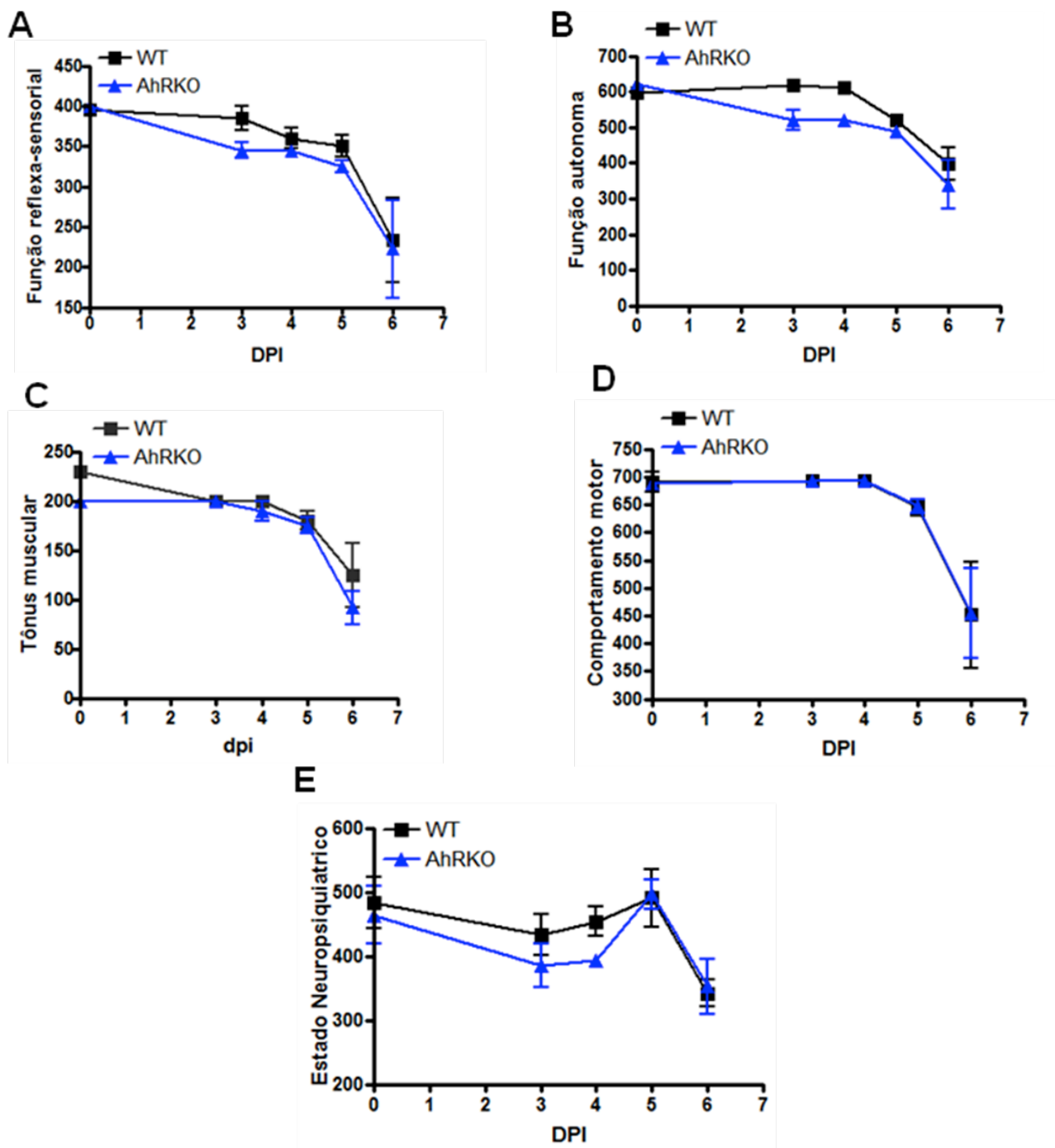


**Figura 3. Comprometimento na retenção da memória de longa duração em animais AhRKO durante a tarefa de reconhecimento de novos objetos** As habilidades de memória e aprendizagem foram avaliadas nos camundongos AhR KO (n= 5) e WT (n= 5) foi avaliada usando o teste de reconhecimento de novos objetos.. Na sessão de treino os animais foram expostos a dois objetos iguais por 5 minutos. Vinte e quatro horas após o treino, os animais foram expostos a um objeto familiar e um objeto novo por 5 minutos (Memória de longa duração). Animais WT e AhRKO (A) Controles (B) Infectados com PbA. Dados são representativos da média  $\pm$  SD e foram expressos como porcentagem do tempo total de exploração. Para análise estatística foi usado o teste t de Student com correção de Welch's  $*p < 0,05$ . Dados são representativos de 2 experimentos independentes.

### **Deterioração do estado clínico dos camundongos AhRKO e WT ao longo da infecção por *P. berghei* ANKA (PbA)**

A bateria SHIRPA foi utilizada nesse estudo para avaliar alterações comportamentais e neurológicas durante o curso da infecção por PbA. A bateria preliminar consiste em uma escala de observações quantitativas e semiquantitativas de reflexos e funções sensoriais básicas. Esta série de 40 testes fornece um perfil comportamental e funcional a partir da avaliação do desempenho individual de cada animal. Cada animal recebe uma pontuação em cada um dos testes avaliados diariamente. A média diária de cada grupo (WT e AhRKO) foi usada como o valor da pontuação dos animais, sendo que a pontuação do dia zero (antes da infecção) é considerada como o valor máximo alcançado por cada grupo em cada domínio. Para facilitar a análise dos dados os parâmetros observados foram classificados em cinco categorias funcionais: função reflexa e sensorial (Figura 4A), função autônoma (Figura 4B), tônus e força muscular (Figura 4C), comportamento motor (Figura 4D) e estado neuropsiquiátrico (Figura 4E).

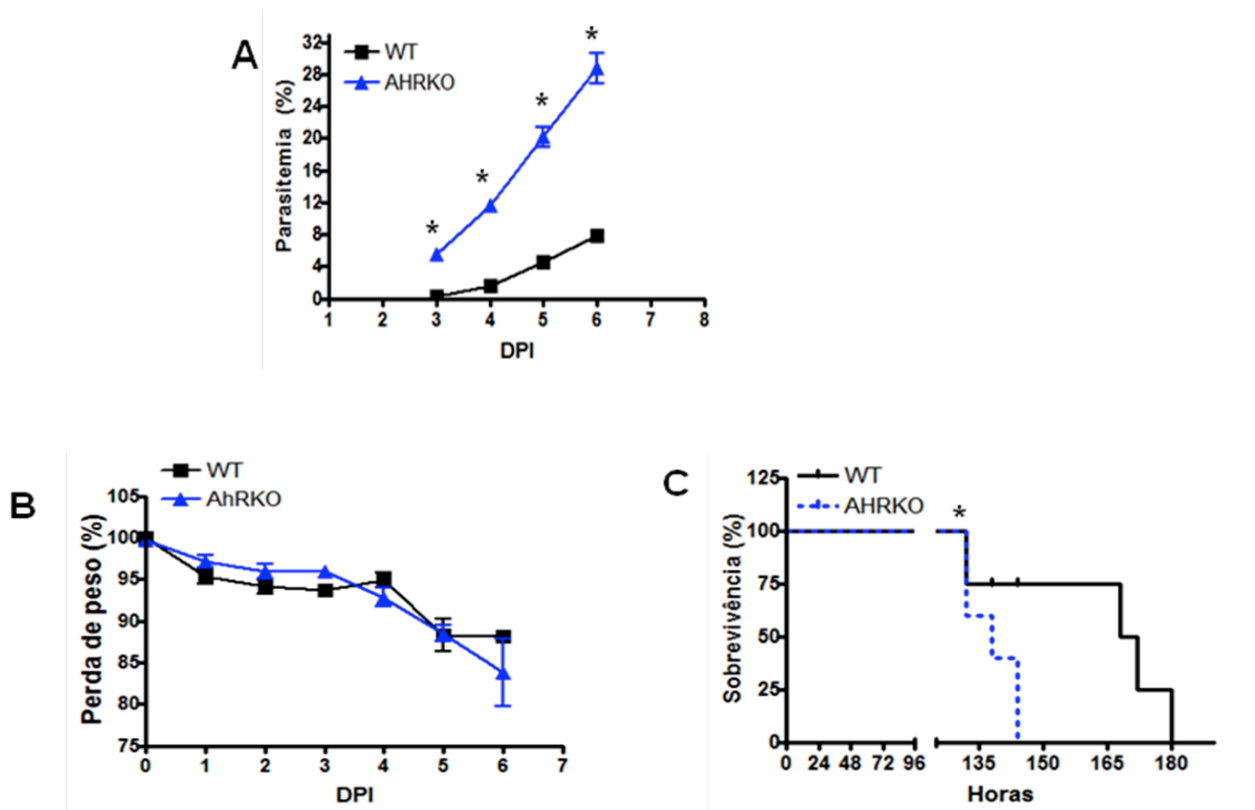
Ao longo da infecção, os animais WT e AhRKO igualmente apresentaram uma piora gradativa no desempenho dos testes em todos os cinco domínios funcionais avaliados, representados pela diminuição da média geral de pontuação diária de cada grupo (Figuras 4 A-E).



**Figura 4. Desempenho dos camundongos AhRKO e WT ao longo da infecção por *Plasmodium berghei* ANKA (PbA).** Os animais foram avaliados através da bateria de testes SHIRPA em 5 parâmetros funcionais (A) função reflexa e sensorial (B) função autônoma (C) tônus e força muscular (D) comportamento motor (E) estado neuropsiquiátrico ao longo da infecção por *P. berghei* ANKA. Cada animal foi avaliado individualmente nos testes e a pontuação média geral do grupo/dia foi usada para ser representada no gráfico. Dados são representativos da média  $\pm$  SD. Para análise estatística foi usado o teste two-way ANOVA com Boferroni pós-teste \* $p < 0,05$ . Dados são representativos de 2 experimentos independentes.

**Camundongos AhRKO são mais suscetíveis à infecção por *P. berghei* ANKA (PbA).**

Os camundongos WT e AhRKO foram infectados com o *P. berghei* ANKA com o inóculo de  $1 \times 10^5$  parasitas via intraperitoneal a fim de avaliarmos a progressão da doença nos camundongos. A partir do 3º dia pós-infecção (dpi), até a morte dos animais, foram avaliados diariamente a parasitemia, o peso e a sobrevivência. Os camundongos AhRKO tiveram maiores porcentagens de parasitemia desde o início da infecção, quando comparados com o WT (Figura 5A). Em relação ao peso, ambas as linhagens perderam igualmente peso ao longo da infecção (Figura 5B), sendo que os camundongos AhRKO foram mais suscetíveis à infecção em relação aos WT, apresentando mortalidade precoce (Figura 5C).



**Figura 5.** Curso natural da infecção em camundongos AhRKO infectados por *P. berghei* ANKA. Camundongos WT e AhRKO foram infectados com *P. berghei* ANKA ( $1 \times 10^5$  parasitas via intraperitoneal) e acompanhados diariamente em relação (A) parasitemia (B) perda de peso e (C) sobrevivência. Dados são representativos da média  $\pm$  SD de 2 experimentos independentes. Para análise estatística foi usado o teste two-way ANOVA com Boferroni pós-teste \* $p < 0,05$ .

**Perfil de produção de mediadores inflamatórios no baço de camundongos WT e AhRKO no transcorrer da infecção por *P. berghei* ANKA.**

Durante a infecção por PbA ocorre a produção de mediadores inflamatórios cujo objetivo é o controle da infecção. Caso haja uma produção excessiva desses mediadores, poderão ocorrer danos graves aos hospedeiros, levando ao desenvolvimento de patologias. Entretanto, se a produção desses mediadores não for suficiente para controlar a infecção, o patógeno poderá se multiplicar e ocasionar a morte do hospedeiro. Neste cenário, onde a resposta Th1 é importante para controlar a infecção e deve ser regulada para não induzir patologias, mediadores imunomodulatórios e anti-inflamatórios têm participação essencial. Assim, o organismo frente à uma infecção estará sempre tentando buscar este sutil balanço da resposta imune: a morte do patógeno sem o desenvolvimento de patologias.

Afim de avaliarmos qual seria a participação do AhR na modulação do perfil de citocinas produzidas durante a infecção por PbA, retiramos os baços de camundongos WT e AhRKO infectados com PbA em diferentes dias ao longo da infecção e analisamos a produção das citocinas inflamatórias e imuno modulatórias através de ELISA.

Encontramos que no 5<sup>a</sup> dpi camundongos AhRKO apresentam aumento da produção de IL-12p70, significativamente maior, que os WT (Figura 6A). Nossos resultados de citometria de fluxo (FACS) mostraram que, as células dendríticas seriam as principais responsáveis pela produção de IL-12 nos WT (Figura 6B). Entretanto, nos camundongos AhRKO o aumento da produção dessa citocina inflamatória seria devido principalmente aos macrófagos (Figura 6C). IL-12 pode estimular a produção de IFN- $\gamma$ , portanto, fomos analisar a sua produção (Figura 6D), e observamos o aumento similar

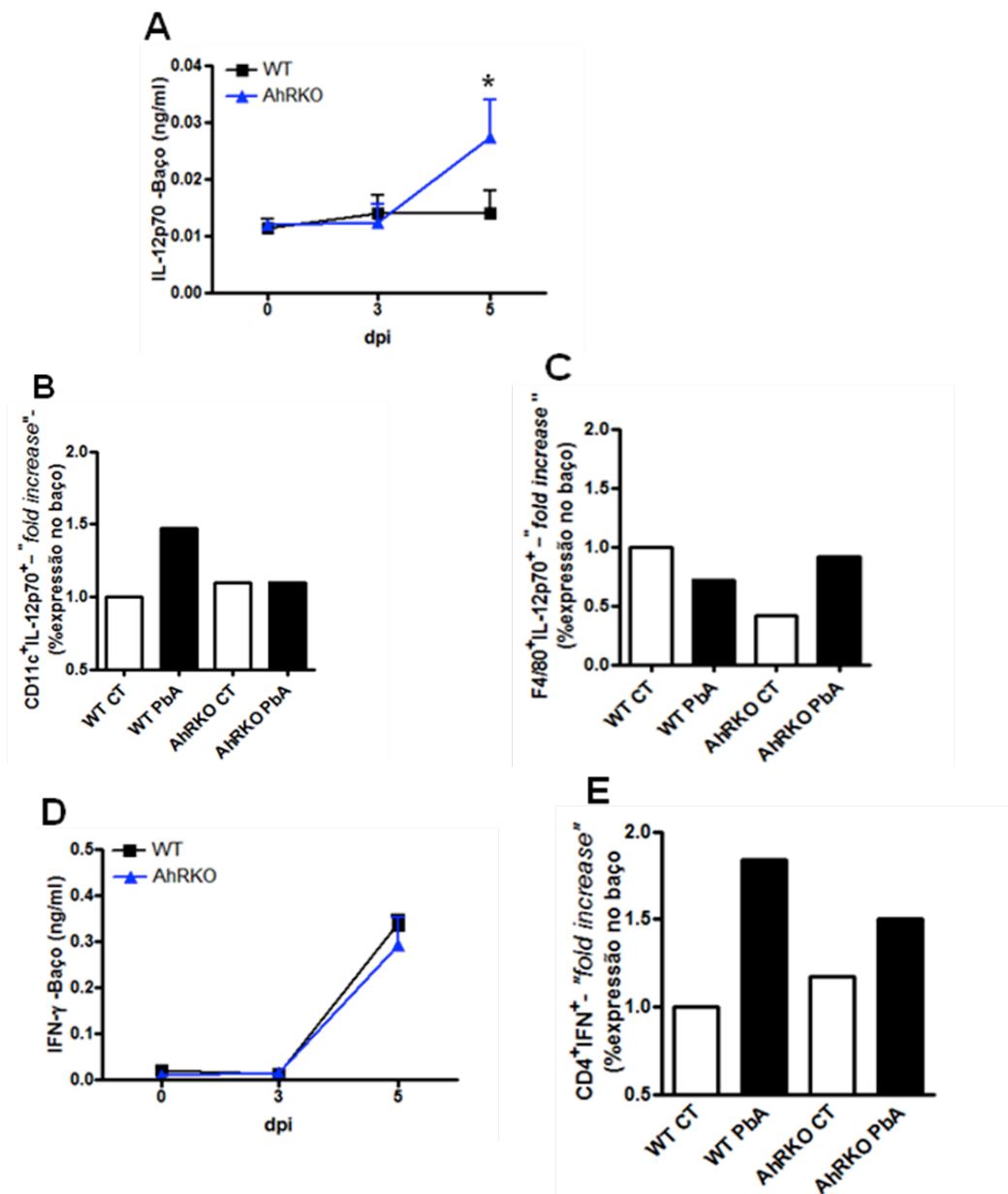
da produção da citocina no baço, e um aumento da expressão de células  $CD4^+IFN^+$  nas duas linhagens (Figura 6E).

Quanto à produção de  $IL-1\beta$ , uma citocina que pode ter um papel neuroprotetor durante a malária, também foi observado em ambas as linhagens um aumento no 5ºdpi (Figura 7A). Camundongos AhRKO apresentaram uma “falha” na indução da produção de  $TNF-\alpha$  em todos os dias de infecção avaliados. Já nos WT, houve um aumento estatisticamente significativo no 5º dpi (Figura 7B). Ao analisarmos a produção de  $IL-10$  observamos o mesmo aumento da concentração/produção dessa citocina no 5º dpi nas duas linhagens, (Figura 7C).

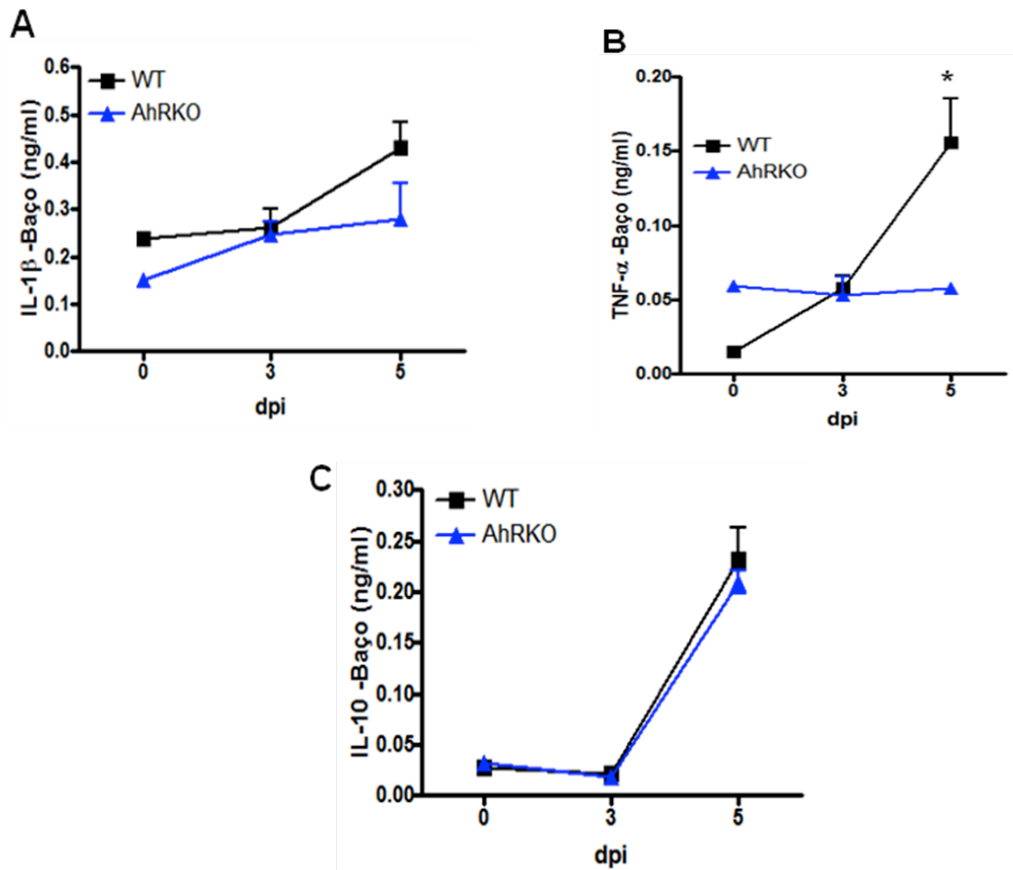
As células Treg, que têm papel importante na resposta imune durante a MC, são as principais produtoras de  $TGF-\beta$ . Ao avaliarmos a produção de  $TGF-\beta$  encontramos que camundongos AhRKO tiveram uma redução da produção quando comparados com WT no 3º e 5º dpi (Figura 8A). Em ambas as linhagens ocorreu uma diminuição da produção  $TGF-\beta$  ao longo da infecção, sendo que no 5º dpi os camundongos AhRKO tiveram uma produção menor que o nível basal encontrado nessa linhagem (Figura 8A). Observamos também no baço tanto de WT quanto em AhRKO uma redução dos níveis de FOXP3 durante a infecção através de “Real Time”-PCR (Figura 8B). Nossos dados de FACs mostraram uma redução da presença de células Treg no baço de camundongos WT após a infecção por PbA (Figura 8C). Entretanto, apesar de camundongos AhRKO não infectados já apresentarem menor porcentagem de Treg nesse tecido, a infecção por PbA não alterou esse fenótipo (Figura 8C).

A produção de citocinas é regulada através de várias vias de sinalização intracelular, entre elas temos a via ativada pelos membros da família SOCS, que atuam através da via de JAK/STAT e, podem regular, negativamente ou positivamente, a produção de várias citocinas (Rico-Bautista et al.,2006). Portanto, resolvemos avaliar se

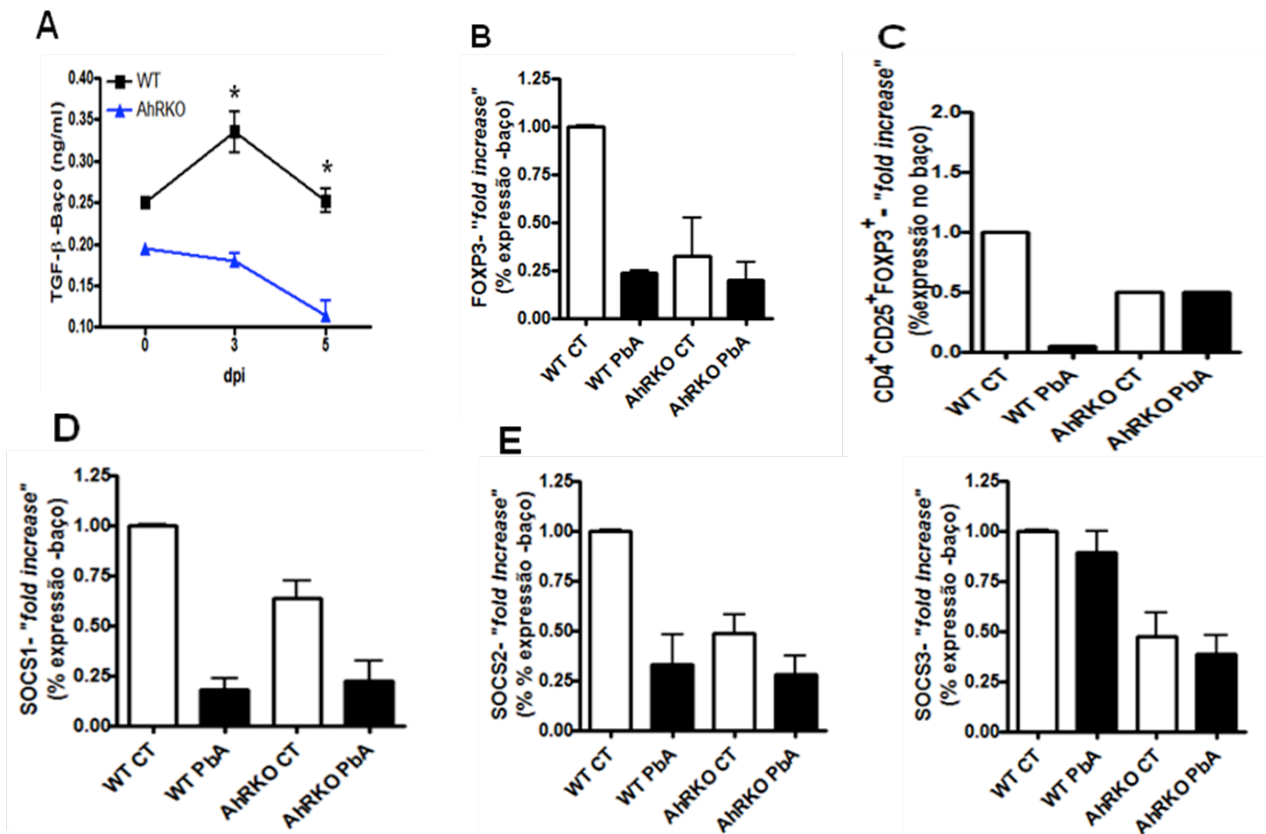
durante a infecção por PbA em animais WT e AhRKO haveria a modulação da expressão de SOCS1-3. Por RT-PCR, nossos resultados mostraram uma diminuição nos níveis de mRNA para SOCS1 e SOCS2 durante a infecção nas duas linhagens, sendo que a expressão de SOCS3 não foi alterada (Figura 8 D-F). Os camundongos AhRKO já possuem uma menor expressão basal de SOCS1, SOCS2 e SOCS3 comparados aos WT (Figura 8 D-F).



**Figura 6. Aumento da produção de IL-12p70 e IFN- $\gamma$  no baço de animais WT e AhRKO infectados com *P. berghei* ANKA.** Camundongos WT e AhRKO foram infectados com  $1 \times 10^5$  parasitas de *P. berghei* ANKA, recolhemos os baços e avaliamos a produção de citocinas IL-12 p70 e IFN $\gamma$  ao longo da doença por ELISA e através de marcações para a detecção intracelular de IL-12p70 e IFN- $\gamma$  nas células F4/80, CD11C<sup>+</sup> e TCD4<sup>+</sup>, respectivamente, utilizando a citometria de fluxo no 6º dpi. (A) IL-12p70 (ELISA) (B-C) Marcação intracelular para IL-12 (D) IFN- $\gamma$  (ELISA) (E) Marcação intracelular para INF- $\gamma$ . Dados são representativos da média  $\pm$  SD. Para análise estatística foi usado o teste two-way ANOVA com Boferroni pós-teste \* $p < 0,05$ . Dados são representativos de 2 experimentos independentes.



**Figura7. Redução da produção de TNF- $\alpha$ , mas não de IL-1 $\beta$  e IL-10, no baço de camundongos AhRKO infectados com *P. berghei* ANKA.** Camundongos WT e AhRKO foram infectados com  $1 \times 10^5$  hemácias/parasitadas com *P.berghei* ANKA, retiramos os baços e avaliamos a produção de citocinas (A) IL-1 $\beta$  (B) TNF- $\alpha$  (C) IL-10 ao longo da infecção por ELISA. Dados são representativos da média  $\pm$  SD. Para análise estatística foi usado o teste two-way ANOVA com Boferroni pós-teste \* $p < 0,05$ . Dados são representativos de 2 experimentos independentes.



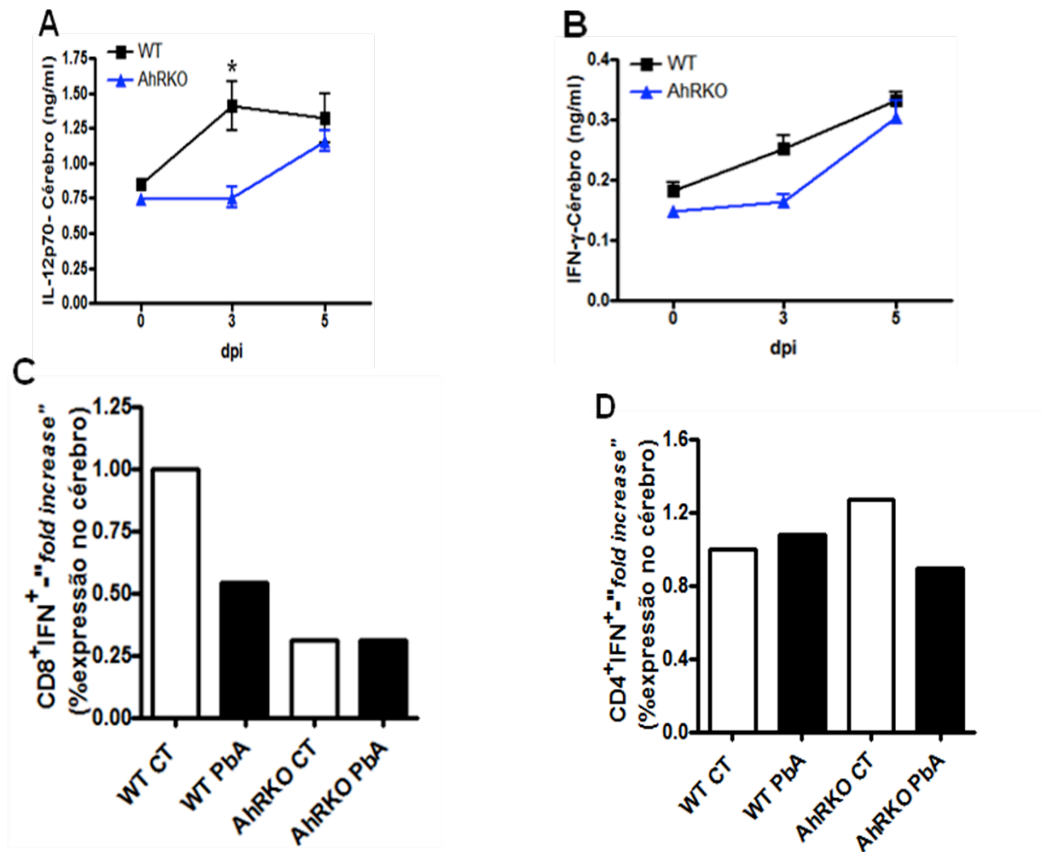
**Figura 8. Redução esplênica da produção de TGF- $\beta$ , FOXP3, SOCS1, SOCS2 e SOCS3 em camundongos AhRKO infectados com PbA.** Camundongos WT e AhRKO foram infectados com  $1 \times 10^5$  parasitas de *P. berghei* ANKA, retiramos o baço e avaliamos a cinética de produção por Elisa de TGF- $\beta$  durante o curso da infecção, a expressão por real time PCR para FOXP3, SOCS1, SOCS2 e SOCS3, além de marcação intracelular para FOXP3 em células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> por FACS. (A) TGF- $\beta$  (B) FOXP3 (C) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup>FOXP3<sup>+</sup> (D) SOCS1 (E) SOCS2 (F) SOCS3. Dados são representativos da média  $\pm$  SD. Para análise estatística foi usado o teste two-way ANOVA com Boferroni pós-teste \* $p < 0,05$ . Dados são representativos de 2 experimentos independentes.

### **Produção de mediadores inflamatórios e modulatórios no SNC de camundongos WT e AhRKO infectados por *P. berghei* ANKA**

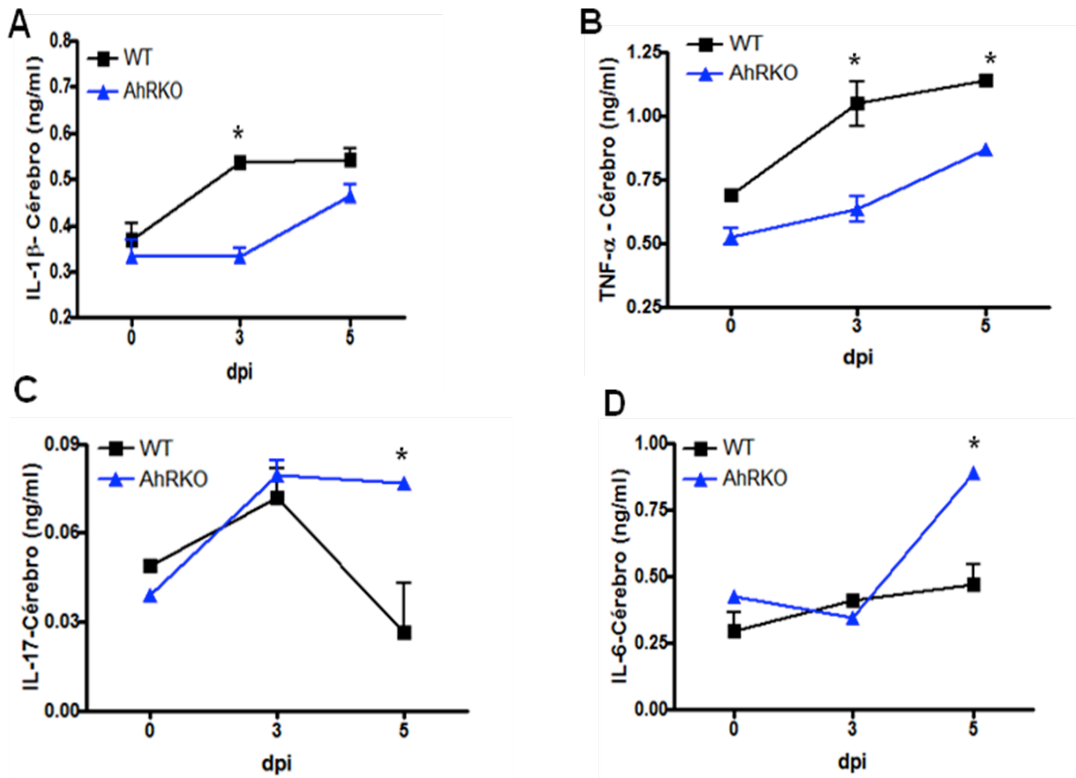
O SNC é o órgão alvo da infecção por PbA levando ao desenvolvimento da MC. Mediadores inflamatórios e modulatórios produzidos localmente, em resposta ao parasita e/ou aos seus metabolitos podem contribuir para o desenvolvimento de patologias, levarem à morte do parasita, além de poderem ocasionar sequelas cognitivas. Para isso, retiramos o cérebro de animais WT e AhRKO e dosamos a produção de citocinas por ELISA na mesma cinética utilizada na resposta esplênica. Encontramos no 3º dpi, uma redução significativa de IL-12p70 e IFN- $\gamma$  no cérebro de camundongos AHRKO, quando comparados com os níveis detectados nos WT (Figuras 9A-B). Nos outros pontos da cinética não houve diferenças estatísticas nos níveis dessas duas citocinas entre as duas linhagens. Sabe-se que no desenvolvimento da MC um dos eventos chaves é o aumento de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> no cérebro tanto em humanos quanto em modelo animal. Assim, com o objetivo de identificar a presença dessas células e se estariam produzindo IFN- $\gamma$ , fizemos uma análise por citometria de fluxo das células infiltrantes e observamos que, durante a infecção, camundongos AhRKO apresentaram menor expressão de células CD4<sup>+</sup>IFN<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>IFN<sup>+</sup> quando comparados com WT (Figuras 9C-D). Entretanto, vale ressaltar que animais KO apresentaram menor expressão de células CD8<sup>+</sup>IFN<sup>+</sup> mesmo antes da infecção, quando comparados com WT (Figura 9C). Além disso, animais WTPbA apresentaram no dia da infecção analisado, uma redução na porcentagem de expressão de células CD8<sup>+</sup>IFN<sup>+</sup> quando comparados aos WT sem infecção (Figuras 9C).

Deficiência de AhR resultou em uma diminuição da produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Figuras 10 A-B) e aumento de IL17 (Figura 10 C) no 3º dpi. AhR pode promover a polarização TH17, que está envolvido na resposta imune contra patógenos invasores.

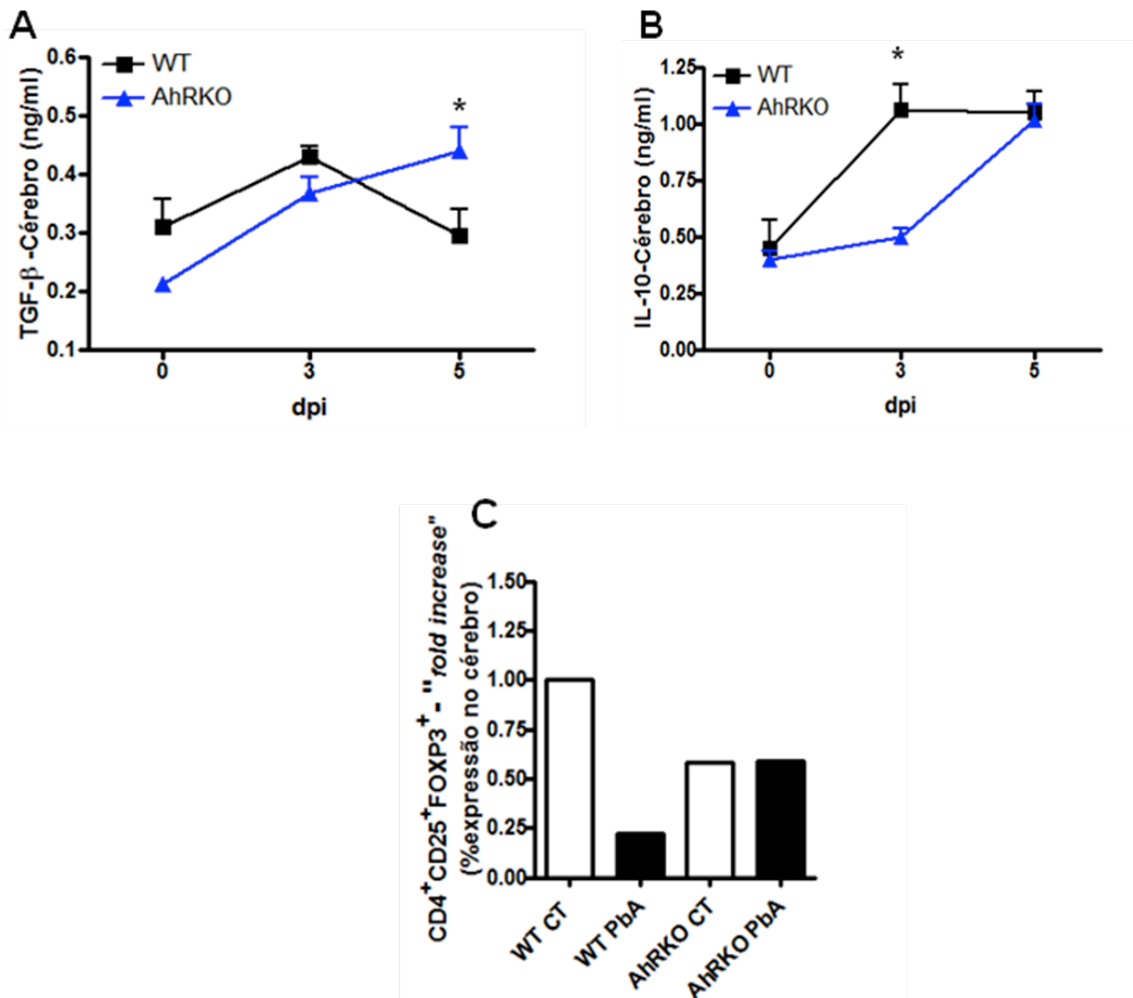
Dentre os fatores requeridos para a diferenciação das células TCD4<sup>+</sup> em TH17 podemos citar a presença de IL-6 e TGF-β (Korn *et al.*,2009). Assim, resolvemos avaliar a produção dessas citocinas no cérebro de animais WT e AhRKO. Observamos um aumento significativo nos animais AhRKO no 5º dpi se comparados com os animais WT de IL-6 (Figura10D) e TGF-β (Figura 11A).Contrariamente, camundongos AhRKO apresentaram redução da produção de IL-10 (Figura 11B). Posteriormente, investigamos se o aumento de TGF-β estaria relacionado com as células Treg, já que essas células são as principais produtoras de TGF-β. Nossos resultados de FACs mostram uma maior expressão de células Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup>FOXP3<sup>+</sup>) nos animais AhRKO infectados em relação aos WT infectados (Figura11C).



**Figura 9. Diminuição da produção de IL-12p70 e IFN- $\gamma$  no cérebro de camundongos WT e AhRKO infectados com PbA.** Camundongos WT e AhRKO foram infectados com  $1 \times 10^5$  parasitas de *P. berghei* ANKA, recolhemos os cérebros e fizemos uma cinética da produção de IL-12p70 e IFN- $\gamma$  ao longo da doença por ELISA e marcação intracelular para IFN em células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> por FACS. (A) IL-12p70, (B) IFN- $\gamma$ , (C) CD8<sup>+</sup>IFN<sup>+</sup>, (D) CD4<sup>+</sup>IFN<sup>+</sup>. Dados são representativos da média  $\pm$  SD. Para análise estatística foi usado o teste two-way ANOVA com Boferroni pós-teste \* $p < 0,05$ . Dados são representativos de 2 experimentos independentes.



**Figura 10. Aumento da produção de IL-6 e IL-17 no cérebro de camundongos WT e AhRKO infectados com *P. berghei* ANKA.** Camundongos WT e AhRKO foram infectados com  $1 \times 10^5$  parasitas de *P.berghei* ANKA, recolhemos os cérebros e avaliamos a produção ao longo da infecção de (A) IL-1 $\beta$  (B) TNF- $\alpha$  (C) IL-17 (D) IL-6 por ELISA. Dados são representativos da média  $\pm$  SD. Para análise estatística foi usado o teste two-way ANOVA com Boferroni pós-teste  $*p < 0,05$ . Dados são representativos de 2 experimentos independentes.

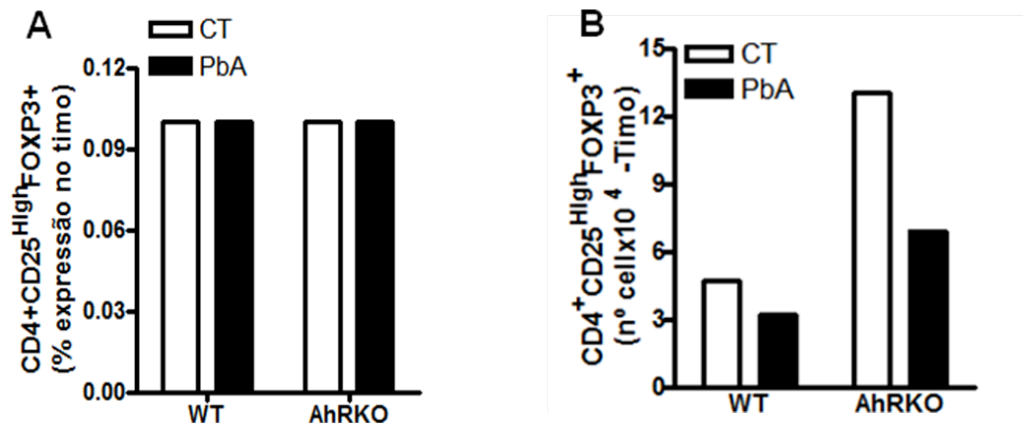


**Figura 11. Aumento da produção de TGF- $\beta$  mas não de IL-10 no cérebro de camundongos WT e AhRKO infectados com *P. berghei* ANKA.** Camundongos WT e AhRKO foram infectados com  $1 \times 10^5$  parasitas de *P. berghei* ANKA, recolhemos os cérebros e avaliamos a produção de (A) TGF- $\beta$  (B) IL-10 no 3<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> dpi por Elisa e a (C) expressão de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup>FOXP3<sup>+</sup> no 6<sup>o</sup> dpi através de citometria de fluxo utilizando anticorpos específicos. Dados são representativos da média  $\pm$  SD. Para análise estatística foi usado o teste two-way ANOVA com Boferroni pós-teste \* $p < 0,05$ . Dados são representativos de 2 experimentos independentes.

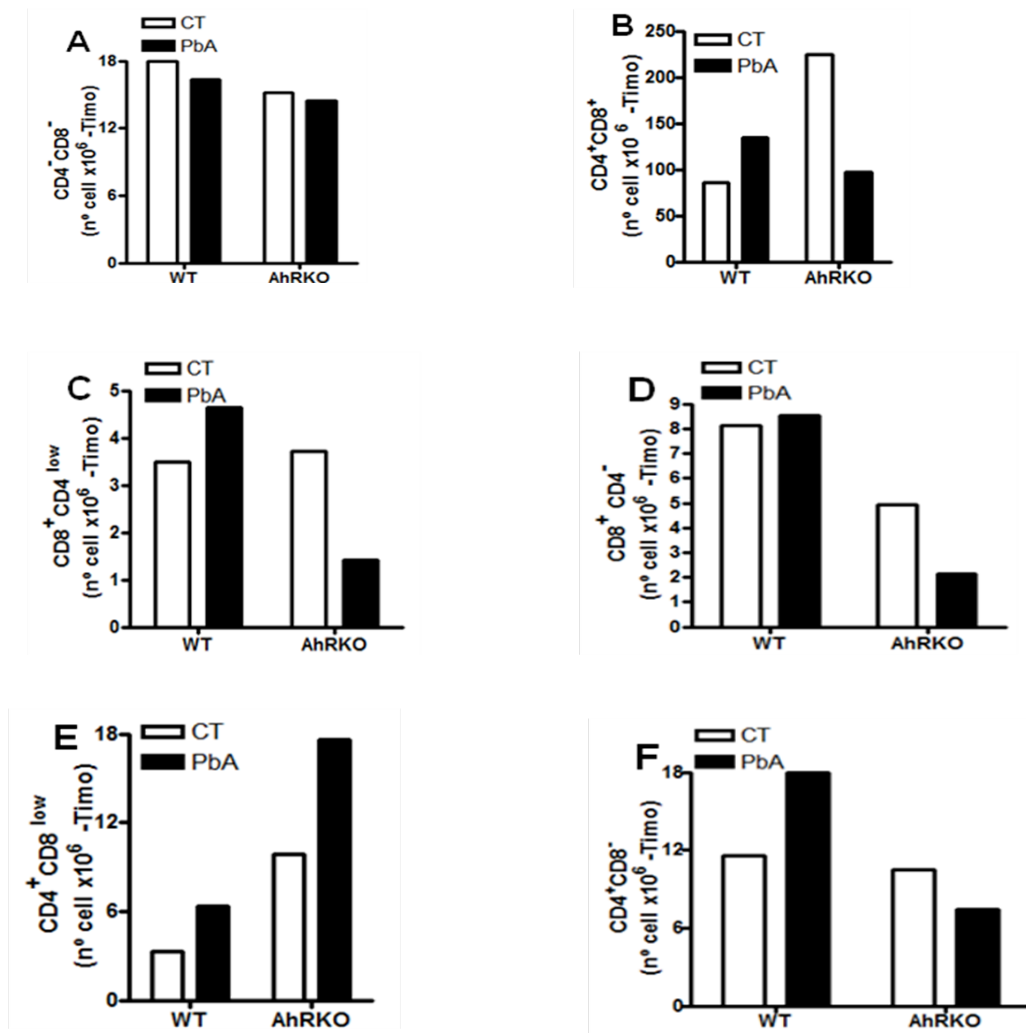
## **Diminuição da geração de células Treg no timo de animais AhRKO infectados por *P. berghei* ANKA.**

Como vimos alterações da frequência de células Treg ( $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+$ ) no baço e cérebro dos animais WT e AhRKO infectados com PbA, resolvemos verificar se havia diferenças na geração dessas células no Timo. Para isso, retiramos os timos de animais WT e AhRKO no 6º dpi e realizamos a marcação para essas células. Nossos resultados mostraram uma expressão de  $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+$  semelhante entre WT e AhRKO (Figura 12A). É importante salientar que o timo de camundongos AhRKO possui um tamanho maior, quando comparado WT, o que resulta em maior nº de células Treg geradas na deficiência de AhR. Durante a infecção com PbA camundongos AhRKO reduziram dramaticamente o nº de células Treg no timo apesar de ainda manter um número de Tregs maior que os WT (Figura 12B).

Também olhamos a diferenciação de células T no timo a fim de avaliarmos se as diferenças observadas no baço e cérebro estariam relacionadas à geração das células TCD4 e TCD8 no timo. Em relação às células duplo-negativas, ambas as linhagens - controle e infectadas-possuem níveis similares (Figura 13A). Já nas células duplo-positivas, o AhRKO possui maior quantidade no controle, diminuindo no 6º dpi. (Figura 13B). Deficiência de AhR resulta em menor nº de células TCD8 geradas quando comparado com o WT (Figura 13D) e durante a infecção, ocorre ainda uma diminuição dessas células no camundongo AhRKO (Figura 13C). O mesmo perfil de diminuição TCD8 no AhRKO, foi observado em relação à geração de células TCD4 (Figura 13F). Entretanto, durante a infecção, o camundongo AhRKO teve uma maior expressão de células  $CD4^+CD8^{LOW}$  (Figura 13D).



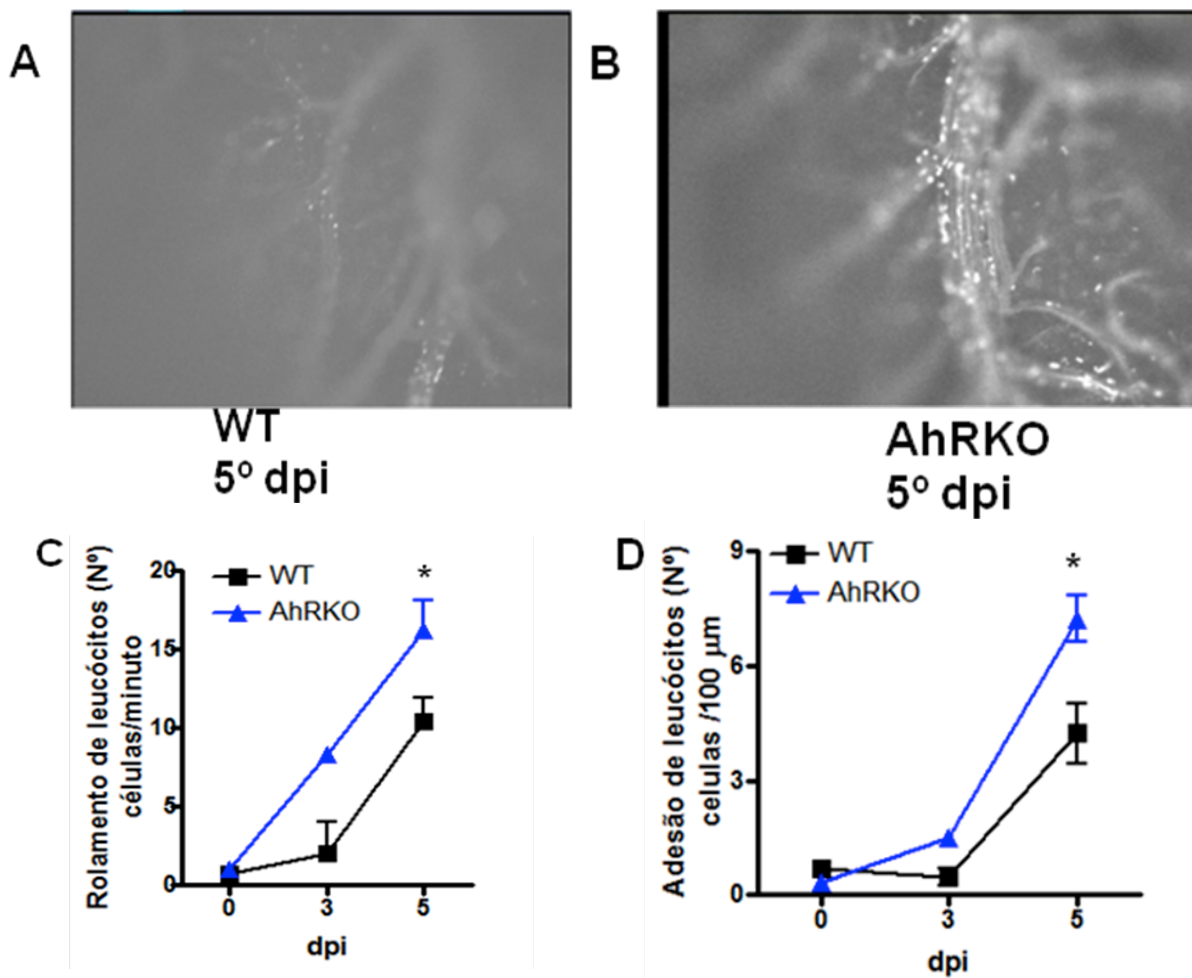
**Figura 12. Redução da geração de células Treg no timo de camundongos AhRKO infectados com *P. berghei* ANKA.** Camundongos WT e AhRKO foram infectados com  $1 \times 10^5$  parasitas de *P. berghei* ANKA, recolhemos o timo e avaliamos expressão  $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+$  no 6º dpi através de citometria de fluxo utilizando anticorpos específicos. (A) Porcentagem de expressão das células (B) Número de células. Dados são representativos da média  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$ . Dados são representativos de 2 experimentos independentes.



**Figura 13. Diminuição da geração de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no timo de camundongos AhRKO infectados com *P. berghei* ANKA.** Camundongos WT e AhRKO foram infectados com 1x10<sup>5</sup> parasitas de *P.berghei* ANKA, recolhemos o timo e avaliamos a geração de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no 6º dpi através de citometria de fluxo utilizando anticorpos específicos. (A) CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (B) CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (C) CD8<sup>+</sup>CD4<sup>LOW</sup> (D) CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> (E) CD4<sup>+</sup>CD8<sup>LOW</sup> (F) CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> Dados são representativos da média ± SD de 2 experimentos independentes. \*p<0,05.

## **Aumento das interações leucocitárias no endotélio cerebral de animais AhRKO infectados por *P. berghei* ANKA**

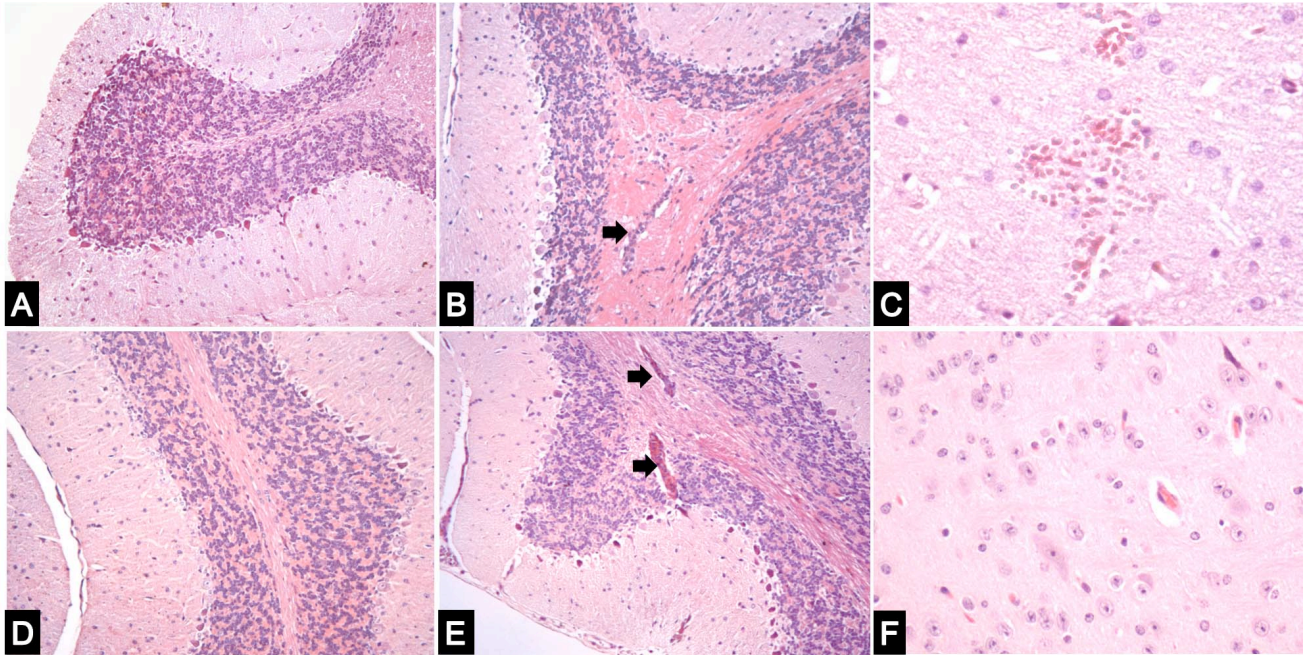
As interações leucócito-endotélio na microvasculatura da pia-máter foram avaliadas através da visualização de leucócitos marcados com o fluorocromo rodamina 6G, utilizando a técnica de microscopia intravital. Os processos de rolamento e adesão leucocitária no endotélio cerebral são etapas envolvidas no mecanismo de recrutamento de leucócitos durante o processo inflamatório. Visto que os nossos resultados apresentaram alterações marcantes, a partir do 5ºdpi e que no 6ºdpi os animais se encontram muito debilitados, escolhemos realizar uma cinética avaliando estes processos de adesão e recrutamento até o 5ºdpi. Apesar de ambas as linhagens apresentarem aumento de rolamento e adesão leucocitária ao longo da infecção, no 5ºdpi os camundongos AhRKO tiveram um aumento significativo em ambos os processos quando comparados com WT no mesmo período (Figuras 14 A-D).



**Figura 14. Aumento dos processos de rolamento e adesão em camundongos AhRKO infectados com *P. berghei* ANKA.** Micrografia de vídeo-microscopia intravital demonstrando o aumento de leucócitos em processo de rolamento e adesão na microvasculatura da pia-máter de camundongos WT e AhRKO infectados com *P. berghei* ANKA (A) WT e (B) AhRKO. Número de leucócitos em processos (C) de rolamento e (D) de adesão na microvasculatura da pia-máter dos camundongos. Dados são representativos da média  $\pm$  SD de 2 experimentos independentes. Para análise estatística foi usado o teste two-way ANOVA com Boferroni pós-teste  $*p < 0,05$ .

### **Alterações histológicas nos camundongos WT e AhRKO infectados co PbA.**

A análise morfológica do cérebro permitiu observar alterações histopatológicas ao longo da infecção. Os animais WT (Figura15A) e AhRKO (Figura 15D) não infectados não mostraram alterações histopatológicas significativas no encéfalo. Os animais WT e AhRKO infectados com *P.berghei* ANKA apresentaram sequestros intravasculares, caracterizados pelo acúmulo de leucócitos no interior dos vasos sanguíneos (Figuras 15B e E). Além disso, foram observados infiltrados de linfócitos e macrófagos na leptomeninge de 40% e de 33% de camundongos WT e AhRKO infectados, respectivamente. A presença de foco hemorrágico no encéfalo foi encontrada em WT infectados, mas não em AhRKO (Figuras15C e 15F, respectivamente).



**Figura 15.** Alterações histológicas no cérebro de camundongos WT e AhRKO infectados por *P.berghei* Anka. Foto-micrografias de secções do cerebelo (A-B, D-E) e do cérebro (C e F), H&E. Cerebelo com aspecto histológico normal de camundongos (A) WT e (D) AHRKO não infectados. Sequestros intravasculares nos córtices cerebelares (setas) de animais (B) WT e (E) AHRKO infectados com *P.berghei* ANKA. Foco de hemorragia no cérebro de WT infectado (C). Cérebro de camundongo AHRKO com vasos sanguíneos íntegros (F). A-B, D-E, 200x. C e F, 400x.

## **Alterações vasculares e endoteliais nos camundongos WT e AhRKO infectados com *P.berghei* ANKA**

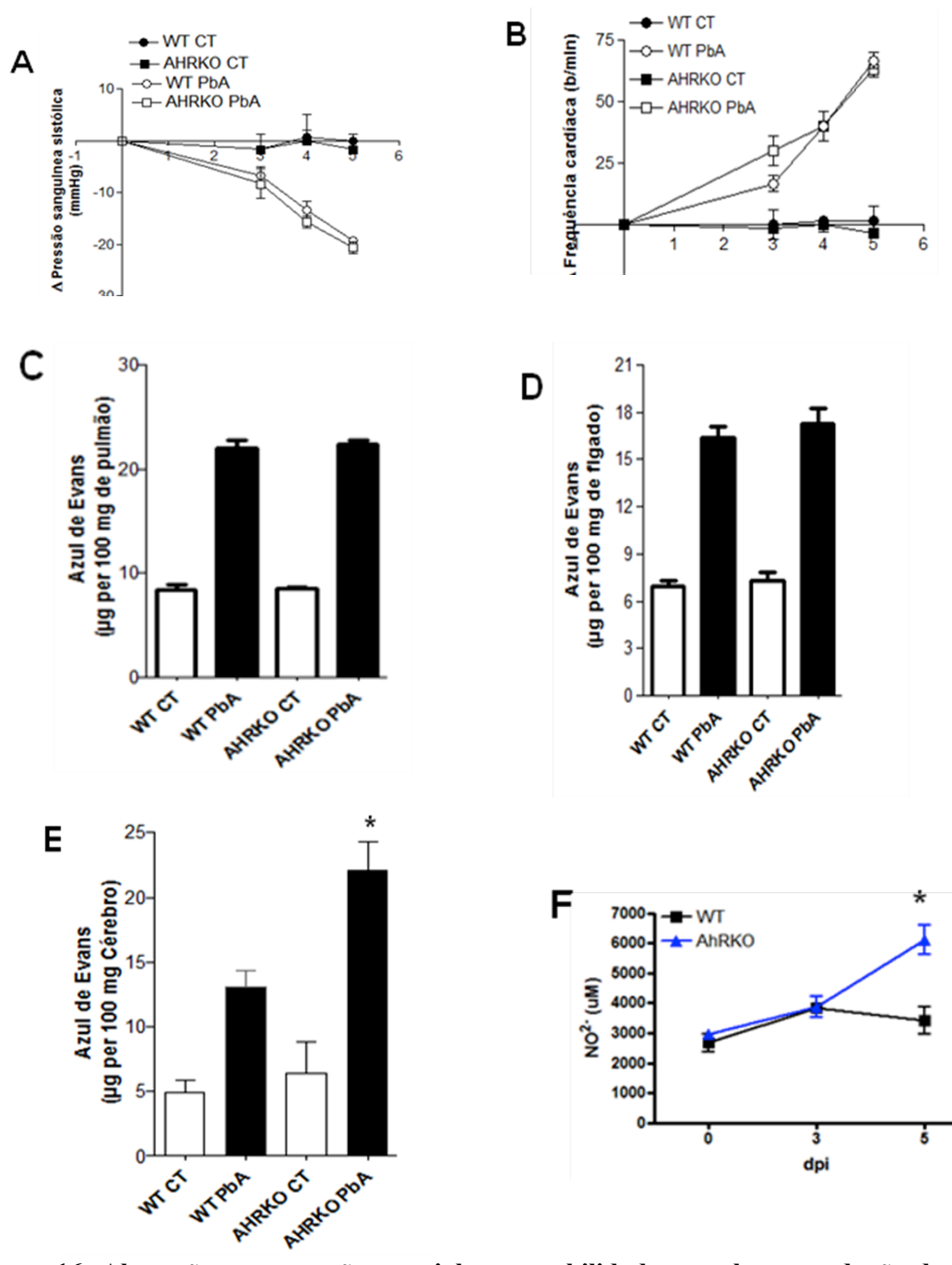
Durante a infecção malárica, ocorre uma diminuição da pressão arterial - hipotensão- que está associada à gravidade da doença em humanos e em camundongos. A hipotensão arterial é frequentemente associada a alterações nas vias de controle do tônus vascular durante uma inflamação sistêmica. Portanto, a fim de avaliar possíveis variações na pressão arterial, durante a infecção por *P. berghei* ANKA em camundongos WT e AhRKO, aferimos a pressão dos mesmos do 3º até o 5º dpi pelo método de pletismografia. Animais AhRKO e WT igualmente apresentaram diminuição da pressão arterial ao longo da infecção (Figura 16A). Como alterações na pressão arterial podem interferir na frequência cardíaca, a mesma foi também mensurada nos mesmos dias usados para avaliar a pressão arterial. Tanto animais WT quanto AhRKO infectados apresentaram o mesmo aumento na frequência cardíaca (Figura 16 B).

A hipotensão arterial pode ser consequência da vasodilatação ocasionada pelo extravasamento de líquidos devido à perda da integridade das células endoteliais, durante o processo de inflamação. No SNC, além da formação de edemas e vasodilatação, o aumento na permeabilidade da BHE tem sido correlacionada positivamente com a gravidade da malária cerebral já que provoca profundas alterações neurofisiológicas, tendo implicações com o estado de coma e déficits cognitivos, tanto em humanos quanto em camundongos.

Assim, verificamos o aumento da permeabilidade vascular do pulmão, fígado e no cérebro, através da quantificação do extravasamento do corante de azul de Evans da barreira endotelial lesada para os tecidos cerebral, pulmonar e mesentérico. Observamos no 5º dpi um aumento significativo da concentração do corante nos tecidos pulmonares (Figura 16C) e mesentéricos (Figura 16D) nos animais WT e AhRKO infectados em

relação aos animais controles. No 6º dpi os cérebros dos animais AhRKO apresentaram valores significativamente maiores do que os WT infectados (Figura 16E).

A produção de NO pelas células imunes, além de poder participar do controle da replicação do *Plasmodium*, se produzido em excesso pode contribuir também para o desenvolvimento da patologia. No SNC o aumento de NO pode levar a vasodilatação, edemas, que comprometem as funções cerebrais podendo induzir o estado de coma e sequelas cognitivas permanentes. Avaliamos a produção de NO no cérebro de animais WT e AhRKO durante a infecção por *P. berghei* ANKA. Camundongos AhRKO infectados tiveram um aumento da produção de NO cerebral no 5º dpi comparados com os animais WT infectados (Figura 16F).



**Figura 16: Alterações na pressão arterial, permeabilidade vascular e produção de óxido nítrico nos camundongos WT e AhRKO infectados com *P. berghei* Anka.**

Avaliação nos animais WT e AhRKO infectados por *P. berghei* ANKA (A) pressão arterial por pletismografia (B) frequência cardíaca. Avaliamos também a permeabilidade vascular utilizando o extravasamento de Evans em animais WT e AhRKO (C) pulmão (D) fígado (E) cérebro. Produção de NO no homogenato cerebral utilizando o método de Griess (F). Dados são representativos da média  $\pm$  SD. Para análise estatística foi usado o teste two-way ANOVA com Boferroni pós-teste \* $p < 0,05$ . Dados são representativos de 2 experimentos independentes.

**Camundongos AhRKO infectados com *P.berghei* ANKA apresentam aumento de inflamação e degeneração hepática.**

Durante a infecção por *Plasmodium*, o órgão primário de entrada do parasita no organismo é o fígado, onde ocorre o desenvolvimento das formas infectantes eritrocíticas além de um intenso processo de replicação. Diversos estudos usando parasitas marcados (GFP ou luciferase) têm mostrado enormes quantidades de biomassa do parasita nesse órgão durante o curso da infecção (Rankin *et al.*,2010).

Camundongos AhRKO possuem alterações importantes na circulação hepática além de diminuição no número de hepatócitos e reduzido tamanho do fígado comparado ao WT (Fernandez-Salgueiro *et al.*,1997). Assim resolvemos avaliar a histopatologia hepática dos camundongos WT e AhRKO durante a infecção por *P.berghei* ANKA.

O fígado dos animais WT não infectados apresentaram aspecto histológico normal (Figura 17A). Camundongos AHRKO não infectados apresentaram alguns focos inflamatórios, formados por linfócitos e macrófagos, dispersos pelo parênquima hepático (Figura 17E). Ao 3º dpi, WT (Figura 17B) e AHRKO (Figura 17F) infectados com PbA ANKA apresentaram graus variados de degeneração hepática, caracterizada por tumefação celular e vacuolização citoplasmática. Além disso, acúmulo intravascular de leucócitos e focos inflamatórios foram visualizados nos fígados dos camundongos AHRKO infectados com PbA (Figura 17F). Os animais selvagens e infectados com PbA apresentaram processos degenerativos similares ao 3º, 5º e 6º dpi (Figura 17C-D). Lesões mais extensas e intensas foram visualizadas nos animais AHRKO infectados neste mesmo período (Figura 17G), quando comparados com WT. Ambos os grupos de animais infectados apresentaram deposição de pigmento malárico no interior das células de Kupffer aos 5º e 6º dpi. Os processos degenerativos se intensificaram no 6º dpi nos

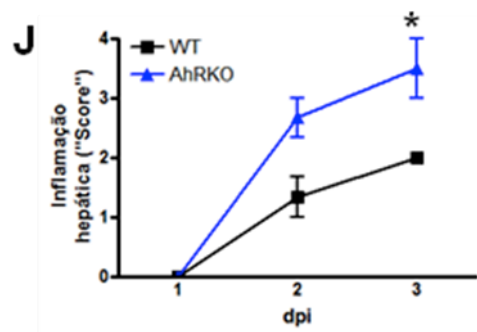
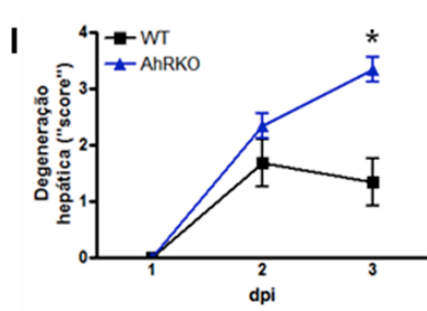
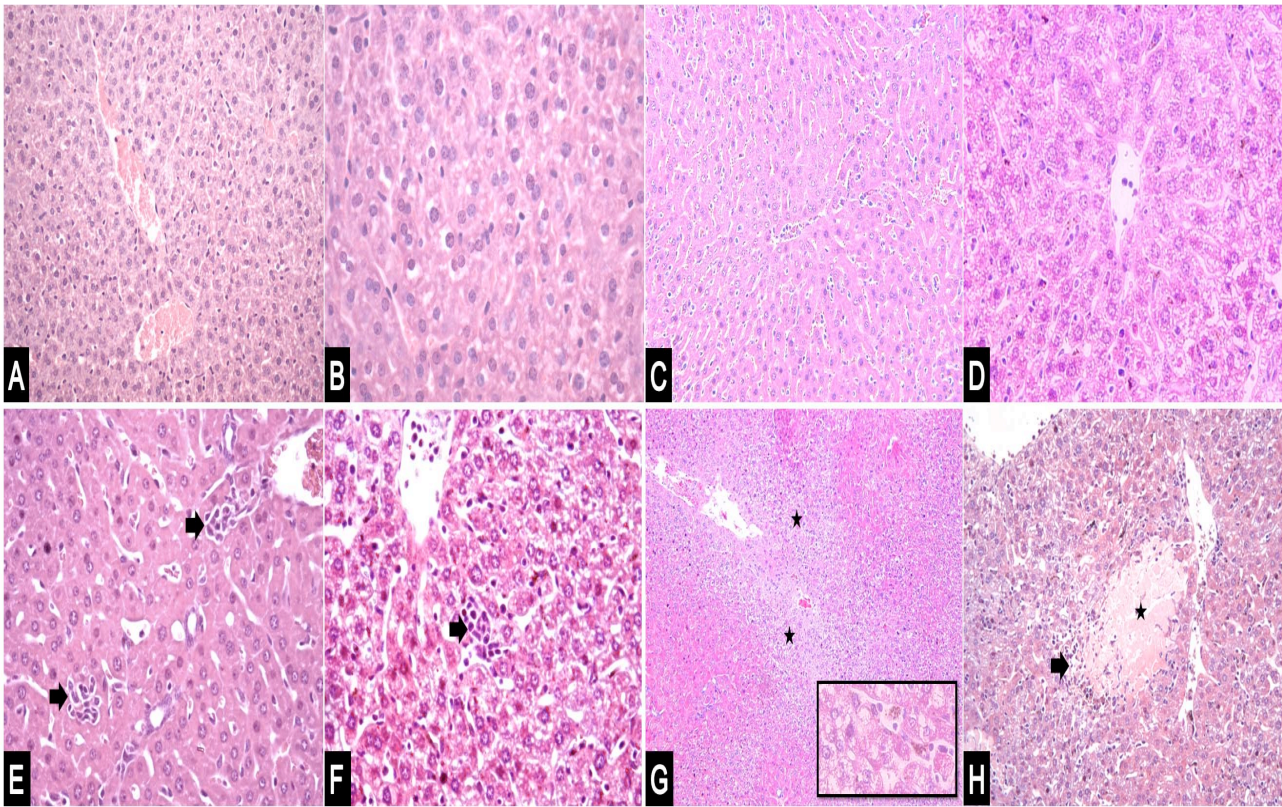
animais AHRKO infectados com PbA, e focos de necrose isquêmica e intensa inflamação foram observados (Figura 17H). Os resultados foram confirmados com a quantificação do número de áreas degeneradas e inflamadas, demonstrando que camundongos AhRKO possuem maior número tanto de degeneração (Figura 17I) quanto de inflamação (Figura 17J).

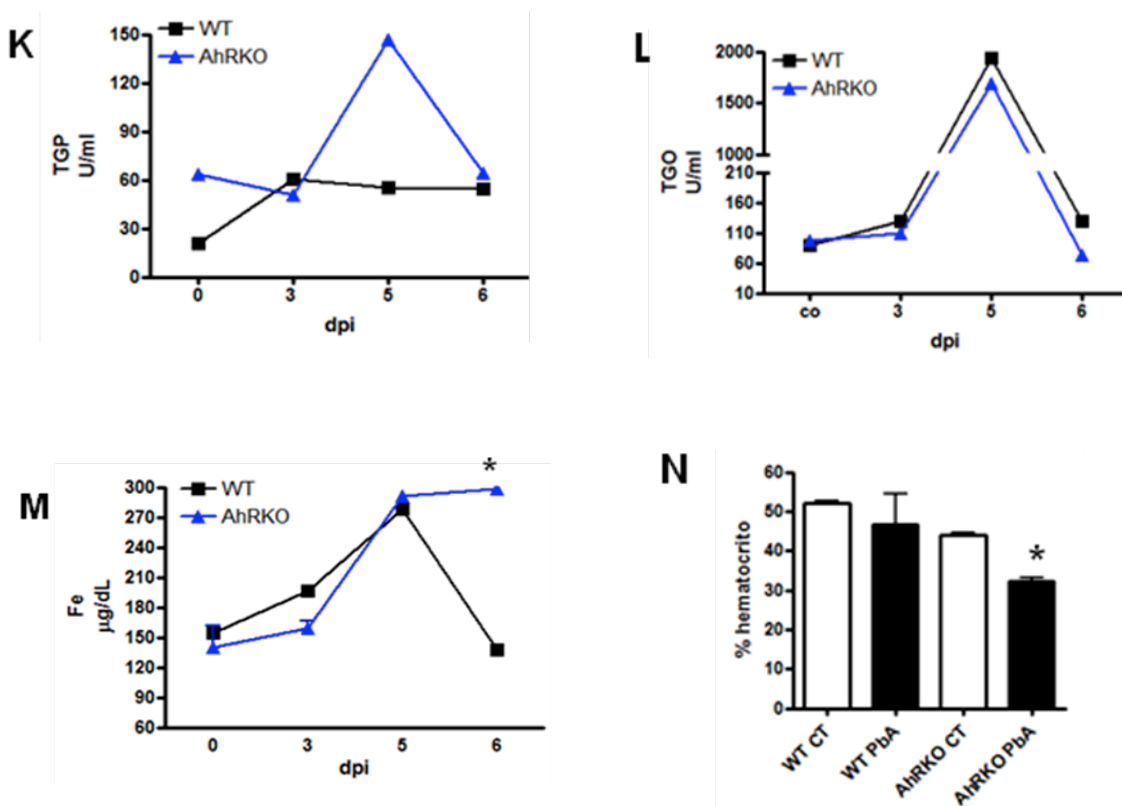
A fim de avaliarmos a existência de comprometimento no funcionamento hepático, dosamos no soro dos animais controle e infectados as transaminases hepáticas: transaminase glutâmico- pirúvica (TGP) e transaminase glutâmica-oxalacética (TGO). Tais dosagens podem indicar dano hepático, principalmente TGP que tem seus níveis rapidamente elevados logo após dano hepático, sendo um marcador sensível de disfunção dos hepatócitos. Camundongos AhRKO no 5º dpi tiveram um aumento significativo nos níveis de TGP (Figura 17K) comparados ao WT, cujos níveis não sofreram alterações significativas ao longo da infecção. Já em relação ao TGO, tanto WT como AhRKO tiveram aumento no 5º dpi (Figura 17L).

O ferro é um elemento essencial para hospedeiros e patógenos e desempenha um papel indispensável em vários processos fisiológicos sendo parte constituinte da hemoglobina, mioglobina, citocromos, entre outras. A disponibilidade de ferro livre no hospedeiro está relacionada com o aumento da patogenicidade, assim como queda da concentração do ferro sérico, que ocorre durante a infecção, pode ser uma forma de defesa do hospedeiro. Portanto, a hipoferremia durante a inflamação ou infecção pode ser um mecanismo de defesa inato do hospedeiro, o qual limita a disponibilidade deste elemento para a replicação do patógeno. Dessa forma, para tentarmos entender o aumento exacerbado da replicação do parasita e a maior susceptibilidade dos animais AhRKO, sugerimos que a disponibilidade de ferro poderia estar alterada nesses animais. Ao avaliarmos o nível de ferro sérico nos camundongos WT e AhRKO constatamos que

os animais AhRKO não infectados possuem um nível ligeiramente menor do que os animais WT e no 5º dpi ambos camundongos aumentam significativamente o nível sérico de ferro (Figura 17M). Entretanto, encontramos que no 6º dpi os camundongos WT reduziram dramaticamente o nível de ferro sérico, o que não foi observado nos AhRKO (Figura 17M).

A malária é uma infecção com características hemolíticas, onde ocorre uma ruptura de eritrócitos parasitados (pRBCs), mas também uma diminuição dos eritrócitos não parasitados (RBCs), o que pode levar a anemias severas e morte. Avaliamos o hematócrito dos camundongos WT e AhRKO e observamos que os camundongos AhRKO no 5º dpi têm valores no hematócrito menores, se comparados com os WT no mesmo período (Figura 17 N).





**Figura 17. Alterações hepáticas nos camundongos AhRKO durante a infecção por *P. berghei* ANKA com inoculo de  $1 \times 10^5$  hemácias parasitadas**

Foto micrografias de seções do fígado, H&E. Arquitetura histológica normal do fígado, animal selvagem não infectado (A). Focos inflamatórios (setas) dispersos pelo parênquima hepático, camundongo deficiente para AHR não infectado (E). Degeneração hepática leve, animal WT 3º dpi (B). Degeneração hepática e infiltrado inflamatório (seta), camundongo AHRKO infectado com PbA, 3º dpi (F). Alterações degenerativas e inflamatórias moderadas, animais WT e infectados com PbA, 5º (C) e 6º (D) dpi. Processos degenerativos mais extensos e intensos (estrelas), animal AHRKO, 5º dpi (G). Detalhe mostrando células hepáticas vacuolizadas e células de Kupffer contendo pigmento malárico. Foco de necrose isquêmica (estrela) associada a intensa infiltração de células inflamatórias (seta) (H), animal AHRKO, 6º dpi. A, C, G e H, 100x. B, D, E-F, 400x. Quantificação do número de áreas (I) degeneradas e (J) inflamadas no fígado de camundongos AhRKO comparados com WT. Níveis séricos de (K) TGP (L) TGO e (M) Fe. (N) Porcentagem de hemácias no 5º dpi -hematócrito. Dados são representativos da média  $\pm$  SD de 2 experimentos independentes. Para análise estatística foi usado o teste two-way ANOVA com Boferroni pós-teste \* $p < 0,05$ .

# *DISCUSSÃO*

## 6. Discussão

Nossos resultados mostraram que AhR participa na modulação da resposta imune durante a infecção por *Plasmodium berghei* ANKA. Camundongos AhRKO infectados com PbA foram mais susceptíveis do que os WT, sucumbindo a infecção mais rápido e apresentando altas taxas de parasitemia. Camundongos AhRKO, a partir do 5º dpi desenvolveram sinais clínicos de MC, apresentaram perda de peso, alterações histopatológicas no 5º/6º dpi condizentes com o desenvolvimento da MC (sequestro, aumento de rolamento e adesão de leucócitos no cérebro) e morte dos animais até o 6ºdpi. A infecção com PbA é fatal para camundongos WT, que desenvolvem os sintomas da MC a partir do 5º/6º dpi e morrem até o 12º dpi com a moderada parasitemia (6- 15%) (Belnoue *et al.*;2002; Randall *et al.*;2008; Desruisseaux *et al.*;2008; Batista *et al.*; 2010). A carga parasitária na infecção por PbA parece ser crítica somente poucas horas antes da morte, para a quebra da BHE e o consequente agravamento da patologia (Batista *et al.*;2010).

Um dos elementos chaves para o controle da infecção são as citocinas do tipo Th1 que podem interferir no resultado e na gravidade da infecção (Artvanis *et al.*,2003; Bakir *et al.*,2011), uma vez que a rápida indução de citocinas como IL-12 e IFN- $\gamma$  podem ser capazes de efetivamente controlar a replicação exponencial do parasita, durante a fase eritrocítica da doença (Miller *et al.*;2002; Haldar *et al.*; 2007; Bakir *et al.*;2011). Nos camundongos AhRKO encontramos uma aumento na produção de IL-12 no 5º dpi no baço, mas a produção de IFN- $\gamma$  foi semelhante ao WT. A produção dessas citocinas não foi efetiva o suficiente para controlar a replicação do parasita na ausência de AhR.

Não foi detectada a produção de TNF- $\alpha$  no baço dos animais AhRKO e no cérebro a produção foi significativamente menor comparado aos WT. TNF- $\alpha$  pode ativar as defesas do hospedeiro e promover a resistência contra a infecção, como

também pode estar envolvido na toxicidade, no processo inflamatório e nos prejuízos cognitivos decorrentes da infecção (Grau *et al.*; 1987; Gimenez *et al.*;2003, Engwerda *et al.*; 2002; Clark, 2007; Clark, 2010). Na MC foi encontrado em altos níveis no cérebro de animais e também está envolvido na superexpressão de moléculas de adesão endoteliais, tanto em humanos quanto em camundongos (Engwerda *et al.*; 2002). No entanto, injeções sistêmicas de TNF- $\alpha$  não induzem sintomas de MC, sugerindo que o TNF- $\alpha$  pode estar sendo produzido localmente nos casos de MC (Gimenez *et al.*;2003). Assim, no nosso modelo, nos camundongos AhRKO infectados, a deficiência na produção de TNF- $\alpha$  pode estar associada ao aumento da carga parasitária, uma vez que essa citocina é importante para o controle da infecção no estágio eritrócito do *Plasmodium*.

Trabalhos mostram que o aumento na produção de IL-6 está relacionado ao pior prognóstico em humanos infectados por *P. falciparum* (Lyke *et al.*; 2004; Wassmer *et al.*; 2011). No cérebro no 5ºdpi a produção de IL-6 e IL-17 foi maior nos animais AhRKO quando comparados com WT(Figura 10). O AhR tem sido implicado na modulação da diferenciação de células Treg/TH17, via ligantes dependentes, ou seja, o AhR pode aumentar ou suprimir a resposta dependendo do ligante que o ativou (Quintana *et al.*;2008; Veldhoen *et al.*; 2008;Veldhoen & Duarte, 2010; Mezrich *et al.*;2010). IL-17 também está envolvida nas alterações da BHE (Veldhoen *et al.*; 2008), assim, o aumento da produção dessa citocina pode ter contribuído para o aumento da permeabilidade observado nos camundongos AhRKO no 6ºdpi. Além disso, a diferenciação em TH17 requer a presença de IL-6 e TGF- $\beta$  (Veldhoen *et al.*;2006;Veldhoen *et al.*;2008; Korn *et al.*;2009), que estavam aumentados no cérebro de animais AhRKO no 5º dpi. Neste contexto, pode ter havido a indução do perfil TH17, o que levou ao aumento da produção de IL-17 observado nos animais AhRKO.

Durante a infecção por *Plasmodium* o balanço entre a resposta pro e anti-inflamatória pode prevenir o desenvolvimento da MC. Entretanto, nossos resultados mostraram uma produção de IL-10 significativamente menor no 3º dpi nos camundongos AhRKO comparados com WT. Mas, no 5º dpi ambas as linhagens apresentaram o mesmo nível de produção dessa citocina. A coordenação dos mecanismos imunes efetores através de uma apropriada resposta TH1/TH2 levaria a uma eliminação do parasita e controle da infecção. Por outro lado, quando este sistema se encontra desregulado, podemos ter como consequência o desenvolvimento de patologias (Mitchell *et al.*,2005; Lyke *et al.*,2004; Bakir *et al.*; 2011). Portanto, concomitante com a desregulação da produção de citocinas no 5º dpi houve o aumento de lesões hepáticas e cerebrais que podem ter contribuído para a morte precoce dos animais AhR KO.

As proteínas da família SOCS podem estar envolvidas na modulação da resposta imune (Rico-Bautista *et al.*;2006). Nossos resultados mostram uma diminuição tanto de SOCS1 e SOCS2 durante a infecção em ambas as linhagens. Já com SOCS3 não houve alteração. SOCS está associado com a inibição de IL-6, podendo então, o aumento de IL-6 nos AhRKO ser devido à diminuição de SOCS1 e SOCS2. De fato, nosso grupo demonstrou que a expressão de SOCS2 está associada com a modulação do AhR (Machado *et al.*;2006). Na infecção com *T.gondii*, a ausência de SOCS2, aumentou a produção de citocinas pro-inflamatórias como IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , além de alta mortalidade (Machado *et al.*;2006), o que também ocorreu nos camundongos AhRKO infectados com PbA., onde observamos aumento da produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  (Figura 6).

Células Treg, que são definidas como imuno modulatórias/inibitórias podem contribuir para a patogênese da malária. Trabalhos mostraram que a depleção de células

Treg FOXP3<sup>+</sup> protege o camundongo da malária na infecção por *P.yolli* (Amante *et al.*; 2007; Nie *et al.*; 2009). Entretanto, na infecção por *P.berguei* Anka, trabalhos mostraram que essas células possuem somente um efeito moderado na patologia geral e atenuam a ativação de células T na periferia, mas não protegem os camundongos do desenvolvimento da MC (Steeg *et al.*;2009;Vigario *et al.*;2007), enquanto outros mostraram que as células Treg podem reduzir o sequestro limitando a patologia (Haque *et al.*;2010).

Esta controvérsia em relação ao papel das células Treg pode ser devido à metodologia utilizada, já que, a maioria dos trabalhos considera que a marcação CD25<sup>+</sup> são indicativos de Treg e usam tratamento dos camundongos com anti-CD25 para depleção de das mesmas, o que pode estar suprimindo além de Treg, células TCD4<sup>+</sup> efetoras que contribuem para o desenvolvimento da MC (Steeg *et al.*;2009). Por outro lado, observando o perfil de atuação das células Treg, que têm participação importante em processos inflamatórios crônicos, como durante a EAE (encefalomielite autoimune experimental), elas podem não ser dinâmicas o suficiente para controlar o rápido desenvolvimento da patologia, durante a MC (Vigario *et al.*; 2007; Steeg *et al.*;2009).

Nossos resultados mostraram que durante a infecção observamos no cérebro de animais WT infectados uma diminuição na porcentagem de FOXP3<sup>+</sup>. No entanto, nos animais AhRKO infectados a porcentagem de FOXP3<sup>+</sup> foi mantida. Vale a pena ressaltar, que o nível basal de expressão de FOXP3<sup>+</sup> no cérebro de AhRKO é menor do que o do WT. Observamos também que, durante a infecção houve um aumento de células TCD4<sup>+</sup> no cérebro dos camundongos AhRKO infectados. Esses dados sugerem que, as células FOXP3<sup>+</sup> dos animais WT, mas não as do AhRKO, durante a infecção por PbA, não têm a mesma habilidade das células TCD4<sup>+</sup> convencionais para migração

e/ou para permanecerem no cérebro durante a infecção por PbA (Vigario *et al.*;2007; Steeg *et al.*;2009).

TGF- $\beta$  é uma citocina imuno modulatória, que além de participar da indução TH17/Treg, está envolvida no controle da resposta TH1/TH2 e pode inibir a produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  durante a infecção malárica (Medana &Turner, 2006, Scholzen *et al.*;2009). O papel do TGF-  $\beta$  durante a malária depende tanto da fase quanto do local de produção (circulante ou tecidual). Assim, o aumento na produção de TGF- $\beta$  no 5º dpi no cérebro de animais AhRKO pode ter contribuído para o aumento da patologia aumentando os danos endoteliais e as alterações na BHE (Figura 11) (Wassmer *et al.*, 2006). Este aumento de TGF-  $\beta$  observado no 5º dpi no cérebro dos camundongos AhRKO pode ser devido à permanência das células FOXP3<sup>+</sup> no cérebro destes animais, visto que, essas células são produtoras de TGF- $\beta$ .

A ativação de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> tem implicado no desenvolvimento da MC, na produção de citocinas pro e antiinflamatória que culminariam no desenvolvimento da patologia e/ou proteção do hospedeiro (Renia *et al.*; 2006; Amante *et al.*; 2007; Haque *et al.*;2010; Nie *et al.*;2009; Steeg *et al.*;2009; Scholzen *et al.*;2009; Batista *et al.*; 2010). Células TCD4+CD25+Treg suprimem a ativação de TCD4+ e TCD8+ limitando a auto-reatividade. A depleção de TCD8 diminuiu as alterações da permeabilidade vascular no cérebro, enquanto a depleção de células TCD4 no início da infecção, preveniu o desenvolvimento da MC (Belnoue *et al.*;2002). Células TCD8 parecem ser necessárias, mas não suficientes para desenvolver a MC em camundongos, uma vez que tratamento com antimalárico preveniu o desenvolvimento de MC, mas os camundongos continuavam apresentando células no cérebro (Batista *et al.*;2010). Nossos resultados mostram um aumento da expressão de TCD4+ no cérebro de camundongos AhRKO infectados com PbA (dados não mostrados). Mas, ao olharmos a

geração dessas células no timo, vemos que os camundongos deficientes em AhR infectados têm diminuição na geração dessas células. Outro cenário possível seria um aumento da geração de Treg no timo associada a uma rápida migração dessas células para os órgãos alvos da infecção, como o cérebro. Vários fatores afetam a migração das células do timo para os órgãos alvos, como por exemplo, quimiocinas, citocinas e GH (Smaniotto et al.;2011), assim, a alta produção desses mediadores pode acelerar a migração das células T.

No entanto, animais AhRKO têm aumento de rolamento e adesão leucocitária no 5º dpi na microvasculatura cerebral, mas no 6º dpi apresentam menor número de sequestros no cérebro (Figura 14), o que pode estar associado à expressão das moléculas de adesão que medeiam o sequestro. Os grandes números de leucócitos aderidos na microvasculatura cerebral podem induzir modificações, ativando cascatas de sinalizações tanto diretamente pelos leucócitos quanto por toxinas liberadas do parasita, que propiciam um “microambiente tóxico”, que pode atuar diretamente ou de forma parácrina, nas células endoteliais cerebrais, afetando a BHE e podendo induzir sua perda de integridade (Medana & Turner, 2006). Na malária, as moléculas de adesão estão envolvidas no sequestro das células dentro da microcirculação cerebral e em outros órgãos (Wassmer et al.;2006). Outra possibilidade seria que camundongos AhRKO possuam alterações nas moléculas de adesão, o que por sua vez dificultaria a entrada dessas células no cérebro. Além desse fator, o sequestro de células TCD8<sup>+</sup> no cérebro, e a consequente mortalidade, somente acontece em animais infectados com PbA, quando os sintomas neurológicos aparecem (Belnoue *et al.*;2002). Além disso, o sequestro de células TCD4<sup>+</sup> no cérebro não é suficiente para o desenvolvimento da MC, é necessário conjuntamente a presença de pRBC (Batista *et al.*; 2010). O sequestro do parasita pode ocasionar a ativação das células endoteliais e a obstrução vascular. A combinação dos

efeitos da ativação das células TCD4+ e TCD8+ e a resposta inflamatória têm sido positivamente correlacionada com a gravidade da MC (Van der Heyde et al.;2001;Hunt et al.;2006).Assim, devemos fazer uma análise tanto histopatológica quanto para verificar a ativação das células T, utilizando uma janela temporal determinada pelo início dos sinais clínicos da doença. Entretanto, como salientado na introdução, nem sempre o sequestro de hemácias infectadas é encontrado em cérebro de pacientes que sucumbem à infecção malárica.

Nossos dados mostraram que camundongos AhRKO infectados com PbA apresentaram maior aumento na permeabilidade cerebral em relação aos animais WT PbA. A integridade funcional da BHE depende de fatores induzidos pelos astrócitos vizinhos, células endoteliais, pericitos e macrófagos perivasculares do espaço de Virchow-Robin e dos neurônios (Medana &Turner, 2006). Os astrócitos desempenham um papel crítico na regulação do fluido intersticial e contribuem para a manutenção da BHE; a perda funcional dos astrócitos pode induzir a produção de mediadores inflamatórios pela micróglia, reforçados posteriormente pelas citocinas liberadas pelos leucócitos circulantes e pelos monócitos aderidos. A ligação dos pRBC a receptores dos vasos sanguíneos cerebrais pode desencadear uma cascata de sinalização, que altera as junções oclusivas das células endoteliais da BHE permitindo a entrada de citocinas circulantes, leucócitos e outros mediadores aumentando ainda mais a permeabilidade da BHE o que, aliado à degradação dos astrócitos, poderia causar uma perda do suporte funcional, contribuindo para o distúrbio do SNC, levando ao coma e morte (Medana & Turner, 2006). Em modelo animal foi observado tanto o aumento na permeabilidade vascular a proteínas como também sinais de dano nas células endoteliais (Hunt et al., 2006). Essas mudanças na BHE facilitariam a entrada no compartimento cerebral de citocinas inflamatórias e antígenos da malária, ativando a micróglia, o que pode induzir

alterações morfológicas e a liberação de mediadores inflamatórios (Desruisseaux et al., 2008) causando danos aos astrócitos, observados tanto em modelo murino quanto em humanos (Medana et al., 2001). O aumento da disponibilidade de NO cerebral pode levar a vasodilatação e contribuir com o aumento do extravasamento vascular e/ou hemorragia dentro do cérebro (Gramaglia *et al.*;2006;Amante *et al.*;2010). Mas, estudos apontam que a baixa disponibilidade sistêmica de NO pode levar a indução e agravamento da doença. Provavelmente a diminuição da produção de NO e o aumento do nº de moléculas de adesão, que pode levar ao aumento do nº de pRBC e leucócitos sequestrados, é uma consequência do aumento da hipoarginemia (Gramaglia et al.;2006, Cabrales et al.;2010). Entretanto, a doação de NO exógeno não foi capaz de aumentar a sobrevivência e nem diminuiu a parasitemia em camundongos infectados por *P. chabaudi* (Van der Heyde *et al.*;2000),ou infectados *P.berghei* ANKA (Cabrales et al.;2010). Por outro lado, durante processos infecciosos/inflamatório pode haver aumento na produção de NO através da indução da enzima NOS2 (óxido nítrico sintase induzível) produzindo como consequência vasodilatação, hipotensão e no SNC pode acarretar neurotoxicidade, além de contribuir para o estado de coma (Reis et al.;2010). Ou seja, o NO pode ter papéis diferentes dependendo tanto da concentração quanto do local de produção (Sobolewski et al.;2005).

Nossos resultados mostraram que ambas as linhagens infectadas por *P. berghei* ANKA apresentaram aumento de permeabilidade vascular no pulmão e fígado no 5º dpi comparado com animais controle. Assim, podemos inferir que, no curso da doença ocorreu quebra das junções das células vasculares permitindo a saída do líquido e a uma vasodilatação que, por sua vez, aliada à resposta inflamatória sistêmica desencadeada pelo *Plasmodium*, altera a pressão arterial ao longo da doença, levando a uma hipotensão progressiva, que está associada à redução do tônus vascular. Nossos

resultados mostraram que ambas as linhagens. WT e AhRkO, têm uma redução da pressão arterial ao longo da doença, o que pode acarretar uma sobrecarga no sistema cardiovascular agravando a doença.

Uma das questões mais intrigantes que observamos no camundongo AhRKO, durante a infecção por PbA, são os altos níveis de parasitemia. Uma das formas para controlar a replicação dos patógenos é a rápida indução de reposta do tipo Th1, na qual observamos falhas na ausência de AhR, como por exemplo, redução da produção de TNF, mas acreditamos que não seria suficiente para explicar a alta carga parasitária encontrada nos KOs. A alta taxa de parasitemia só é observada em modelos murinos, que não desenvolvem MC, onde, os animais que sucumbem, apresentam também grave anemia hemolítica e a morte é tardia entre a 2<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> semana pós infecção (Belnoue *et al.*;2002; Batista *et al.*;2010). Apesar disto, observamos uma diminuição nos valores do hematócrito nos animais AhRKO PbA, podendo ser devido ao aumento de hemácias parasitadas ou não hemolisadas indicando uma anemia hemolítica. Mas, normalmente, a letalidade nos casos de MC induzida por PbA não está associada nem a hiperparasitemia, nem a anemias graves, mas sim a processos imuno patológicos e neurológicos que ocorrem durante a infecção (Vigario *et al.*;2007).

Então, o que acontece com o AhRKO? Nossa primeira hipótese foi que algo deveria favorecer a replicação do parasita nesse camundongo. Sabe-se que o ferro é essencial para o transporte de oxigênio, para a síntese de DNA e metabolismo energético, sendo então essencial para a replicação do parasita (Pamplona *et al.*;2007; Ferreira *et al.*;2008; Portugal *et al.*; 2011). O ferro é absorvido da dieta e no plasma se liga a transferrina, o que permite que células precursoras dos eritrócitos o incorporem no grupo heme na síntese da hemoglobina (Hb). O ferro fica estocado nas células do fígado, baço e medula óssea, nas formas de ferritina e hemossiderina, assim a ferritina

contém e mantém os átomos de ferro, que poderiam formar agregados de precipitados tóxicos (como por exemplo, a hemossiderina que é a forma degradada da ferritina). A responsável pela rápida queda da concentração do ferro sérico durante a inflamação é a hepcidina sintetizada principalmente no fígado e que teria um papel regulatório fundamental na homeostase do ferro, coordenando o uso e o estoque do ferro com a sua aquisição (De Domenico *et al.*;2008; Portugal *et al.*;2011). Estudo mostrou que, camundongos infectados por *P. berghei* -ANKA e NK-, que estavam no estágio eritrocítico da doença, ao serem desafiados com uma 2ª infecção malárica não desenvolvem o estágio hepático e bloqueiam a doença, provavelmente, pelo menos em parte, devido à ação da hepcidina que diminuiu o ferro disponível para o parasita (Portugal *et al.*;2011). Durante o ciclo eritrocítico do *Plasmodium*, uma das principais características é a intensa hemólise, onde ocorre a liberação do grupo heme-livre, que é uma molécula citotóxica, para o parasita quando gerada dentro dos eritrócitos e para o hospedeiro quando liberada na circulação (Pamplona *et al.*;2007). O *Plasmodium*, para se proteger da liberação do heme-livre dentro dos eritrócitos, o polimeriza junto com a hemozoína. Quando exposto ao heme-livre, as células hospedeiras, tanto humanas quanto murinas, aumentam a expressão da HMOX-1, uma enzima responsiva ao stress que cataboliza o heme em ferro, biliverdina e monóxido de carbono (CO) (Pamplona *et al.*;2007; Ferreira *et al.*;2008; Ferreira *et al.*;2011). No nosso modelo, ao dosarmos a quantidade de ferro sérico, observamos que não havia diferenças entre o animal deficiente em AhR e o WT no início da infecção, mas, no 6º dpi animais AhRKO mantêm um alto nível de ferro sérico, o que pode ter contribuído para a grande replicação de parasitas nesses camundongos. Este aumento pode ser devido à diminuição de ação da hepcidina, levando a uma hiper-ferremia e propiciando o

desenvolvimento da patogênese (Portugal *et al.*;2011), o que será testado no nosso laboratório.

Tendo em vista as alterações achadas na desregulação da homeostase do ferro e as alterações basais pré-existentes no fígado dos camundongos AhRKO, não foi surpresa ao acharmos alterações significativas/maiores tanto na análise histológica quanto na fisiologia hepática nesses animais, quando comparados com WT. O fígado é um órgão com várias funções importantes essenciais a homeostasia corporal. O *Plasmodium*, durante a fase hepática passa por um intenso processo de replicação e transformação. Nessa fase, ocorre a formação dos merozoítos que são liberados dos hepatócitos infectados em pacotes envolvidos pela membrana da célula hospedeira chamada merossomas, que contém centenas de merozoítos que, posteriormente, serão liberados na corrente sanguínea e irão invadir os eritrócitos (Ploemen *et al.*;2009). Assim, apesar do estágio hepático ser apontado como “cl clinicamente silencioso” é imunologicamente relevante, sendo que estudos apontam que durante a fase hepática ocorrem respostas específicas do hospedeiro, numa tentativa de controlar a infecção (Vaughan *et al.*;2008). Além disso, é comum a presença nos hepatócitos de pigmentos maláricos -hemozoína- decorrentes da fase eritrocítica do parasita, que pode acarretar necrose e ativação de uma intensa resposta inflamatória contribuindo para a disfunção hepática (Penet *et al.*;2007).

Em relação ao funcionamento do fígado, a dosagem das transaminases são indicadores sensíveis para detectar dano hepático, alanina amino transaminase (ALT ou TGP) e a aspartato amino transaminase (AST ou TGO). A TGO é menos específica para se afirmar que existe uma doença hepática já que também se encontra no músculo cardíaco, nos ossos, rins, cérebro, pâncreas, pulmões, leucócitos e eritrócitos. A TGP, em geral, é mais específica de lesão hepática, pois existe primariamente no fígado.

Portanto, quando temos uma lesão hepática há refluxo de ambas as enzimas para o plasma, com elevação dos níveis de ambas as enzimas, sendo que a TGP sobe ligeiramente mais do que a TGO, se a lesão for puramente hepática. Dessa forma, a falha hepática pode provocar alterações hematológicas, alterações do sistema imune, cardiovasculares, hipotensão arterial ou até acumulação de líquidos nos tecidos orgânicos (edemas). Podemos inferir, então, que essas lesões agravaram ainda mais o organismo dos animais AhRKO já debilitados, em decorrência da infecção por *P. berghei* ANKA levando os animais a morte mais precoce.

O receptor AhR foi descrito primeiramente devido a sua interação com a dioxina- TCDD, um metabolito exógeno. Mas, dado a sua ampla distribuição no organismo e também as alterações fisiológicas, decorrentes da retirada desse receptor do organismo, é mais do que claro que o papel do AhR é muito mais amplo do que se imaginava anteriormente.

O AhR possui expressão constitutiva em diversas regiões do SNC, como por exemplo córtex, cerebelo e hipocampo (Lin et al.;2008). No hipocampo, na região CA3 foi encontrada a maior expressão basal do AhR (Petersen *et al.*;2000; Powers *et al.*;2005). Estas regiões estão envolvidas em diversos processos cognitivos, e estudos utilizando TCDD apontam que o AhR pode participar da regulação e/ou funcionamento do hipocampo (Powers et al.;2005) e mediar a morte neuronal (Kajta et al.;2009). Além disso, foi constatada uma sobreposição entre a localização do AhR e neurônios Gabaérgicos no SNC (Hays et al.;2002).

Poucos estudos foram feitos a respeito do papel do AhR no SNC, mas, a ligação do agonista TCDD no AhR acentuou a morte neuronal através da ação de NMDA. Em camundongos AhRKO, foi observada a diminuição do influxo de cálcio mediado por

NMDA, assim como diminuição da expressão de receptores NMDA e aumento de BDNF em neurônios corticais *in vitro* (Lin *et al.*; 2009).

Durante a MC deficiências cognitivas são relatadas, entre elas podemos destacar: alterações de memória de trabalho e atenção, de linguagem e memória viso-espacial (Boivin *et al.*,2007;Idro *et al.*,2006; Kihara *et al.*,2009; Bangirana *et al.*,2009). Em modelo murino constatou-se prejuízo na memória de trabalho (Desruisseaux *et al.*, 2008) e déficits nos comportamentos motor, sensorial e estado neuropsiquiátrico (Lackner *et al.*; 2006). Nossos resultados demonstraram que a deleção do receptor Ah resultou em prejuízo na memória de longa duração no teste de reconhecimento de objetos e comportamento do tipo ansioso observado nos testes do campo aberto e labirinto em cruz elevado. Sendo o hipocampo uma área cerebral importante para a formação de memórias e para a modulação de comportamento relacionado a ansiedade (Oler *et al.*;2010) e, possuindo uma grande expressão de AhR, pode ser que ele participe de circuitos neuronais importantes para a modulação desses comportamentos. Pode ter, por exemplo, atuação através da modulação de receptores de NMDA aumentando a plasticidade neuronal.

Alterações neuroquímicas no funcionamento do SNC durante a MC podem comprometer o funcionamento do sistema. AhR esta envolvido em diversas vias de sinalização, modulando respostas ao ser ativado por diversos ligantes endógenos como, por exemplo, metabolitos derivados do heme e do triptofano. O *Plasmodium* sintetiza triptofano, mas precisa da enzima IDO (indoleamina -2,3- dioxigenase) para sua degradação em quinurenina, que é ligante de AhR e pode induzir a geração de células Treg (Mezrich *et al.*;2010), podendo por ação de ezimas específicas, ser convertida em ácido quinurênico, que também é ligante de AhR (Dinatale *et al.*;2010) Assim, a inibição *da* IDO protegeu parcialmente o camundongo da malária (Tetsutani *et*

*al.*;2007). Tanto o ácido quinurênico quanto o ácido quinolínico são produtos da via de degradação do triptofano e desempenham papel importante em diversas desordens neurodegenerativas e na MC (Zwilling *et al.*;2011; Rae *et al.*, 2004; Parekh *et al.*, 2006). O ácido quinolínico pode ter um papel de neuro excitotoxicidade ao interagir com receptores de glutamato do tipo NMDA, que podem ser modulados via AhR.

Assim, durante a MC o receptor Ah pode ter participação importante na modulação tanto da resposta imune, metabólica e neurológica, podendo interferir no balanço que irá decidir se quem vence é o parasita ou o hospedeiro. Essa modulação do AhR pode ser fundamental para diminuir sequelas decorrentes da infecção. Atualmente, estamos estudando o papel de AhR na modulação da via de degradação do triptofano durante a infecção por *P. berhei* ANKA e a inter-relação com o desenvolvimento da MC.

## *Conclusões*

## 7. Conclusões

O AhR, possui várias funções biológicas e pode ter um papel importante no SNC, modulando vias de sinalização relacionadas ao comportamento tipo ansioso.

O AhR participa da modulação da resposta imune durante a infecção por *Plasmodium berghei* ANKA. A deficiência de AhR acentua a susceptibilidade dos camundongos a infecção, provavelmente devido a graves alterações hepáticas, alterações no metabolismo do ferro, aumento da permeabilidade encefálica e um desequilíbrio da resposta imune.

## *Referências*

## 8. Referências

1. ALIBERTI, JULIO; BAFICA, ANDRE. Anti-inflammatory pathways as a host evasion mechanism for pathogens. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.73, p.283–288, 2005.
2. AMANTE, F.H. et al. A role for natural regulatory T cells in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. **The American Journal of Pathology**, v.171, n.2, p. 548-559, aug.2007.
3. AMANTE, F.H et al. Immune-Médiated Mechanisms of Parasite Tissue Sequestration during Experimental Cerebral Malaria. **The Journal of Immunology** v185p.3632-3642. 2010.
4. ARMAH, H. et al. Cytokines and adhesion molecules expression in the brain in human cerebral malaria. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.2, n.1, p.123 -131, 2005.
5. ARTVANIS-TRAKONAS, K; TONGREN, J. E.; RILEY, E.M. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. **Clinical & Experimental Immunology**, v.133, p.145-152, 2003.
6. BAFICA, ALINE MICHELLE BARBOSA. **Imunoregulação na malária assintomática: Avaliação dos níveis de lipoxina A4**. 2007. 85 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia)- Instituto de Ciências da Saúde- UFBA, Salvador, 2007.
7. BAKIR HY, TOMIYAMA, C., ABO, T.Cytokine profile of murine malaria: stage-related production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines. **Biomedical Research**, v. 32(3) p.203-8, 2011.
8. BALLA, J. et al. Heme, heme oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.49, p.1030 – 1043, 2005.
9. BANGIRANA, PAUL et al. Immediate neuropsychological and behavioral benefits of computerized cognitive rehabilitation in Ugandan pediatric cerebral malaria survivors. **Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics**, v.30, p.310-318, 2009.

10. BAPTISTA FG, et al. Accumulation of Plasmodium berghei-infected red blood cells in the brain is crucial for the development of cerebral malaria in mice. **Infection and Immunity**.v.78 p.4033-4039, 2010.
11. BELAYEV, L. BUSTO, R., ZHAO, W.G. Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. **Brain Research**, v.739(1-2) p. 88-96, Nov 11,1996.
12. BELKAID, YASMINE; TARBELL, KRISTIN. Regulatory T Cells in the Control of Host-Microorganism Interactions. **The Annual Review of Immunology**,v. 27 p.551–89, 2009.
13. BELNOUE E. et al. On the pathogenic role of brain-sequestered  $\alpha \beta$  CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. **The Journal of Immunology**,v.169 p.6369–6375, 2002.
14. BOIVIN, MICHAEL J. et al. Cognitive impairment after cerebral malaria in children: A prospective study. **Pediatrics**, v. 119, n.2, feb.2007.
15. BROMER, ULF et al. Swedish traveler with *Plasmodium knowlesi* malaria after visiting Malaysian Borneo. **Malaria Journal**, v.8, n.15, p.1-5, 2009.
16. CABRALES, PEDRO et al. Nitric Oxide Protection Against Murine Cerebral Malaria Is Associated With Improved Cerebral.Microcirculatory Physiology **The Journal of Infectious Diseases**, 2011;203:1454–63.
17. CAROLA V. et al. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. **Behavioral Brain Reserch**, v.134 p. 49–57, 2002.
18. CLARK, IAN A. How TNF was recognized to be a key mechanism of disease. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v.18(3-4), p.335-43. 2007.
19. CLARK, IAN A,COWDEN, W.B The pathophysiology of falciparum malaria. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, p. 221– 260, 2003.

20. CLARK, IAN A.; ALLEVA, L.M., VISSEL, B. The roles of TNF in brain dysfunction and disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 128, p.519–548,2010.
21. COLTEL, NICOLAS et al. Cerebral malaria – a neurovascular pathology with many riddles still to be solved. **Current Neurovascular Research**, v. 1, p.91-110, 2004.
22. COLTEL, NICOLAS et al. Cell vesiculation and immunopathology: implications in cerebral malaria. **Microbes and Infection**, v.8, p. 2305- 2316, 2006.
23. COMBES, VALÉRY et al. Cerebral malaria: role of microparticles and platelets in alterations of the blood-brain barrier. **International Journal of Parasitology**, v. 36, p. 541-546, 2006.
24. DE DOMENICO, I., ARD, DM.,KAPLAN, J. Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. **Nature Review, Molecular Cell Biology**, v. 9(1) p.72-81, jan. 2008
25. DENISON, M.S.; NAGY,S.R. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.43 p.309–34, 2003.
26. DE SOUZA, J.B.; RILEY, E. M. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. **Microbes and Infection**, v.4, p.291–300, 2002.
27. DE SOUZA, J. BRIAN et al. Cerebral malaria: Why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. **Parasitology**, p.1-18, 2009.
28. DESRUISSEAU, MAHALIA S. et al. Cognitive dysfunction in mice infected with *Plasmodium berghei* strain ANKA. **Journal of Infectious Disease**, v.197, p. 1621-1627, 2008.
29. DINATALE, B.C.et al. Kynurenic Acid Is a Potent Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand that Synergistically Induces Interleukin-6 in the

- Presence of Inflammatory Signaling. **Toxicological Sciences**, v. 115(1), 89–97, 2010.
30. DOBBIE M et al. Cerebrospinal fluid studies in children with cerebral malaria: an excitotoxic mechanism? **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**.v. 62 p.284-290,2000.
  31. ENGWERDA, C.R.; GOOD, M.F. Interactions between malaria parasites and host immune system. **Current Opinion in Immunology**, v.17, p. 381–387, 2005.
  32. FERNANDEZ-SALGUEIRO, P.M. et al. Lesions of Aryl-hydrocarbon receptor- deficient mice.**Veterinary Pathology**, v. 34, p. 605-614, 1997.
  33. ESSER, C., RANNUG, A., STOCKINGER, B.The aryl hydrocarbon receptor in immunity. **Trends in Immunolog.**, v.30 (9), p. 447-54, 2009.
  34. FERREIRA, A. et al. A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? **Journal of Molecular Medicine**, v.86 p. 1097–1111, 2008.
  35. FERREIRA,A. et al. Sickle Hemoglobin Confers Tolerance to Plasmodium Infection. **Cell**, v. 145p.398–409, April 29, 2011.
  36. FILE, SE. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. **Behavioral Brain Research**, v.125: 151–157,2001.
  37. GIMENEZ, F. et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$  in the pathogenesis of cerebral Malaria. **Cellular and Molecular Life Sciences**,v.60, p.1623–1635, 2003.
  38. GIRARD, MARC P. et al. A review of human vaccine research and development: Malaria. **Vaccine**, v. 25, p. 1567-1580, 2007.
  39. GOOD, M. F. et al. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: Implications for vaccine research. **Annual Review of Immunology**, v.23, p.69-99, 2005.
  40. GRAMAGLIA, I. Low nitric oxide bioavailability contributes to the genesis of experimental cerebral malaria.**Nature Medicine**, v.12:(12), dec. 2006.

41. GRAU GE et al. L3T4+ T lymphocytes play a major role in the pathogenesis of murine cerebral malaria. **The Journal of Immunology**.v. 137p.2348-2354, 1986.
42. GREENWOOD B.; MUTABINGWA, T. Malaria in 2002. **Nature**, v.415, p.670–672, feb.2002.
43. HALDAR, KASTURI et al. Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 2, p. 217-249, 2007.
44. HAQUE, A. et al. CD4+ Natural Regulatory T Cells Prevent Experimental Cerebral Malaria via CTLA-4 When Expanded In Vivo. **Plos Pathogens**, v.6, issue12 Dec. 2010.
45. HAYS, L., CARPENTER, C.D., PETERSEN, S.L.Evidence that GABAergic neurons in the preoptic area of the rat brain are targets of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin during development.**Environmental Health Perspectives**, v.110 (Suppl 3) p. 369–376, 2002.
46. HUNT, N.H.; GRAU, G.E. Cytokines: Accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. **Trends in Immunology**, v.24, n.9, p. 491–499, sept. 2003.
47. HUNT, N.H. et al. Immunopathogenesis of cerebral malaria. **International Journal for Parasitology**, v.36, p.569-582, 2006.
48. IDRO, RICHARD; JENKINS, NEIL E.; NEWTON, CHARLES R. J.C. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. **The Lancet Neurology**, v.4, p.827-840, 2005.
49. KAJTA, M., et al. Aryl hydrocarbon receptor-mediated apoptosis of neuronal cells: a possible interaction with estrogen receptor signaling. **Neuroscience**, v. 23;158 (2) p. 811-22, jan. 2009.
50. KIHARA M; CARTER, JULIE A.; NEWTON, CHARLES R.J.C. The effect of *Plasmodium falciparum* on cognition: a systematic review. **Tropical Medicine & International Health**, v. 11, n.4, p. 386-397, 2006.

51. KIHARA M et al. Impaired everyday memory associated with encephalopathy of severe malaria: the role of seizures and hippocampal damage. **Malaria Journal**, v.8, n.273, p.1-8, dec. 2009.
52. KILE, BT., ALEXANDER, WS. The suppressors of cytokine signalling (SOCS). **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, p.1627–1635, 2001.
53. KNOSP, CA et al. SOCS2 regulates T helper type 2 differentiation and the generation of type 2 allergic responses. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 208 (7), p.1523-1531, 2011.
54. KORN, T. et al. IL-17 and Th17 Cells. **Annual Review Immunology**, v.27 p.485–517,2009.
55. KOSSODO, S. et al. Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria. **Immunology**, v.91, p.536-540, 1997.
56. KREGE, JH, A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. **Hypertension**, v.25(5) p.1111-1115, May, 1995.
57. LACKNER, P. et al. Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v.32, p. 177-188, 2006.
58. LANGHORNE, JEAN et al. Dendritic cells, pro-inflammatory responses, and antigen presentation in a rodent malaria infection. **Immunological Reviews**, v.201, p. 35-47, 2004.
59. LAU, A.A. et al. Open field locomotor activity and anxiety-related behaviors in mucopolysaccharidosis type IIIA mice. **Behavioral Brain Research**.v. 191p130–136, 2008.
60. LOU, JINNING; LUCAS, RALF; GRAU, GEORGES E. Pathogenesis of cerebral malaria: Recent experimental data and possible application for humans. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n.4, p.810-820, oct.2001.

61. LYKE, K.E. et al. Serum levels of proinflammatory cytokines interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8, IL-10, Tumor Necrosis Factor Alpha, and IL-12 (p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* and matched uncomplicated malaria healthy controls. **Infection and Immunity**, v.72, n.10, p. 5630-5637, oct.2004.
62. MACHADO, FABIANA S.; ALIBERTI, JULIO. Role of lipoxin in the modulation of immune response during infection. **International Immunopharmacology**, v.8, p.1316–1319, 2008.
63. MACHADO, FABIANA S. et al., Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxina are SOCS-2 dependent. **Nature Medicine**, v.12, n.3, p.330-334, march 2006.
64. MUNG'ALA-ODERA,V, SNOW,RW, NEWTON, CRJC. The burden of the neurocognitive impairment associated with *Plasmodium Falciparum* malaria in sub-saharan Africa. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v.71: 64–70, 2004.
65. MALAGUARNERA, LUCIA; MUSUMECI, SALVATORE. The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. **The Lancet Infectious Diseases**, v.2, p.472-478, aug.2002.
66. MEDANA, ISABELLE M. et al. Central nervous system in cerebral malaria: 'Innocent bystander' or active participant in the induction of immunopathology? **Immunology and Cell Biology**, v. 79, p. 101-120, 2001.
67. MEDANA, ISABELLE, M.; TURNER, GARETH D.H. Human cerebral malaria and the blood-brain barrier. **International Journal for Parasitology**, v.36, p.555-568, 2006.
68. MEZRICH, J.D. et al An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. **Journal of Immunology**, v.185 p.3190-3198, 2010.
69. MILLER LOUIS H.et al. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v.415, feb.2002.

70. MIRANDA, AL. et al. Increased levels of glutamate in the central nervous system are associated with behavioral symptoms in experimental malaria. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.43, p.1173-1177,2010.
71. MISHRA, SAROJ K. & WIESE, LOTHAR. Advances in the management of cerebral malaria in adults. **Current Opinion in Neurology**, v. 22, p. 302-307, 2009.
72. MITCHEL, ANDREW J.et al. Early cytokines production is associated from murine cerebral malaria. **Infection and Immunity**, v.73, n.9, p.5645-5653, sept. 2005.
73. NEVES, DAVID PEREIRA. **Parasitologia Humana**. 11.ed. São Paulo, Atheneu, 2005.
74. NEWTON, CHARLES R.J.C.; HIEN, TRAN TINH; WHITE, NICHOLAS. Neurological aspects of tropical disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v.69, p.433-441, 2000.
75. NIE, C.Q. et al. IP-10-Médiated T Cell Homing Promotes Cerebral Inflammation over Splenic Immunity to Malaria Infection. **PLoS Pathogen**,v.5, issue 4, April 2009.
76. PAMPLONA, A. et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. **Nature Medicine**, v.13, n° 6, June 2007.
77. PAMPLONA, A. et al. Cerebral malaria and the hemolysis/methemoglobin/heme hypothesis: Shedding new light on an old disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, p. 711–716, 2009.
78. PAREKH S, et al. Brain metabolic markers reflect susceptibility status in cytokine gene knockout mice with murine cerebral malaria. **International Journal for Parasitology**, v.36 p.1409–1418, 2006.

79. PENET, MARIE-FRANCE et al. Imaging experimental cerebral malaria *In Vivo*: significant role of ischemic brain edema. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 32, p. 7352–7358, August 10, 2005.
80. PENET, MARIE-FRANCE et al. Magnetic resonance spectroscopy reveals an impaired brain metabolic profile in mice resistant to cerebral malaria infected with *Plasmodium berghei* ANKA. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282(19) p.14505-14, 2007 May 11.
81. PETERSEN, S.L. et al. Distribution of mRNAs Encoding the Aryl hydrocarbon Receptor, Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator, and Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-2 in the Rat Brain and Brainstem. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 427 p.428–439, 2000.
82. PIESSEVAUX, J. et al. The many faces of the SOCS box. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.19, p. 371–381, 2008.
83. PLOEMEN, I.H. et al. Visualisation and quantitative analysis of the rodent malaria liver stage by real time imaging. **PLOS ONE**. V. 4, e7881, 2009.
84. PORTUGAL, S. et al. Host-mediated regulation of superinfection in malaria. **Nature Medicine - Advance online publication-** published online 15 May 2011.
85. PUGA, A., TOMLINSIN, C.R., XIA, Y. Ah receptor signals cross-talk with multiple developmental pathways. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, p. 199–207, 2005.
86. POWERS, B.E. et al. Tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure alters radial arm maze performance and hippocampal morphology in female AhR<sup>+/-</sup> mice. **Genes, Brain and Behavior**, v.4 p.51–59, 2005.
87. QUINTANA, F.J. et al. Control of Treg and TH17 hydrocarbon receptor. **Nature**, v.23 p. 65–71, 2008..

88. RAE C, et al. Brain gene expression, metabolism, and bioenergetics: interrelationships in murine models of cerebral and noncerebral malaria. **FASEB Journal**, v.18 p. 499-510, 2004.
89. RANDALL, LOUISE M. et al. Common strategies to prevent and modulate experimental cerebral malaria in mouse strains with different susceptibilities. **Infection and Immunity**, v. 76, n.7, p. 3312-3320, July 2008.
90. REIS, PA. et al. Cognitive dysfunction is sustained after rescue therapy in experimental cerebral malaria, and is reduced by additive antioxidant therapy. **Plos Pathogens**, v.6 p.1-16,2010.
91. RÉNIA, LAURENT et al. Pathogenic T cells in cerebral malaria. **International Journal for Parasitology**, v.36, p.547-554, 2006.
92. RICHARDS, JACK S. & BEESON, JAMES G. The future for blood-stage vaccines against malaria. **Immunology and Cell Biology**, v. 87, p. 377-390, 2009.
93. RICO-BAUTISTA, E., FLORES-MORALES, A., PEREZ, LF. Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 2, a protein with multiple functions. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.17 p. 431–439, 2006.
94. ROGERS DC et al. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. **Mammalia Genome Journal**.v. 8 p.711-713,1997.
95. ROGERS DC et al. SHIRPA, a protocol for behavioral assessment: validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice. **Neuroscience Letters**.v. 22; 306 p. 89-92, 2001.
96. SANNI, LA et al. Dramatic changes in oxidative tryptophan metabolism along the kynurenine pathway in experimental cerebral and non-cerebral malaria. **American Journal of Pathology**. v.152 p. 611–619,1998.
97. SANNI, LA et al. Is ischaemia involved in the pathogenesis of murine cerebral malaria? **American Journal of Pathology**.v.159 p.1105–1112, 2001.
98. SARKAR, PRALAY K. et al. Critical care aspects of malaria. **Journal of Intensive Care Medicine Online First**, Dec.13, 2009.

99. SCHOFIELD, LOUIS; GRAU, GEORGES, E. Immunological processes in malaria pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v.5, p.722-735, sept 2005.
100. SCHOLZEN, A. et al. Plasmodium falciparum-mediated induction of human CD25Foxp3 CD4 T cells is independent of direct TCR stimulation and requires IL-2, IL-10 and TGFbeta. **PLoS Pathogens**, v.5(8):e1000543, aug. 14,2009.
101. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/MINISTÉRIO DA SAUDE  
[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder\\_malaria\\_2008\\_final](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder_malaria_2008_final).
102. SMANIOTTO, S. et al. Growth hormone is a modulator of lymphocyte migration. **Neuroimmunomodulation**, v.18(5) p.309-13, sep. 22, 2011.
103. SOBOLEWSKI, P. et al. Plasmodium berghei resists killing by reactive oxygen species. **Infection and Immunity**,v.73 ,2005.
104. SOUZA, DG., et al. Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v.131 p.1800-1808, 2000.
105. STEEG, C. et al. Limited Role of CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells in the Control of Experimental Cerebral Malaria. **The Journal of Immunology**, v.183 p.7014-7022,2009.
106. STOCKINGER, B. et al. External influences on the immune system via activation of the aryl hydrocarbon receptor. **Seminars in Immunology**, v.23, p. 99–105, 2011.
107. STONE TW et al. The role of kynurenines in the production of neuronal death, and the neuroprotective effect of purines. **Journal of Alzheimer's Disease**,v.3 p. 355–366, 2001

108. STONE TW et al. Tryptophan metabolites and brain disorders. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.41p. 852–859,2003.
109. TAYLOR, TERRIE E. et al. Differentiating the pathologies of cerebral malaria by *postmortem* parasite counts. **Nature Medicine**, v. 10, n.2, p.143-145, feb 2004.
110. TETSUTANI, K. et al. Malaria parasite induces tryptophan-related immune suppression in mice. **Parasitology**, v. 134 p. 923–930, 2007.
111. TOGBE, DIEUDONNÉE et al. Murine cerebral malaria development is independent of Toll-like receptor signaling. **American Journal of Pathology**, v.170, n.5, p. 1640-1648, may 2007.
112. TORRE, DONATO; SPERANZA, FILIPPO; MARTEGANI, ROBERTO. Role of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in the immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. **The Lancet Infectious Diseases**, v.2, p.719-720, dec 2002.
113. TURNLEY, AM. Role of SOCS2 in growth hormone actions. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.16 (2), march 2005.
114. UNIFESP. **Malaria**. Disponível em:  
<http://www.virtual.unifesp.br/unifesp/malaria>. Acesso em: 18/10/2009.
115. VAN DER HEYDE, HENRI et al. A unified hypothesis for genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. **Trends in Parasitology**, v.22, n.11, p.503-508, 2006.
116. VAUGHAN, A.M., ALY, A.S.I., KAPPEL, S.H.I. Malaria Parasite Pre-Erythrocytic Stage Infection: Gliding and Hiding. **Cell Host & Microbe**, v.4, September 11, 2008.
117. VELDHOEN, M. et al. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. **Nature**, v.453, May 2008.

118. VELDHOEN, M. A toxin-sensitive receptor able to reduce immunopathology. **Nature Immunology**, v.11 (9), Sept. 2010.
119. VELDHOEN, M.; DUARTE, JH. The aryl hydrocarbon receptor: fine-tuning the immune response, **Current Opinion in Immunology**, v. 22 p.747–752, 2010.
120. VIGARIO, AM et al. Regulatory CD4+CD25+ Foxp3+ T cells expand during experimental Plasmodium infection but do not prevent cerebral malaria. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 963–973, 2007.
121. ZANINI, GM. et al. Exogenous nitric oxide decreases brain vascular inflammation, leakage and venular resistance during Plasmodium berghei ANKA infection in mice. **Journal of Neuroinflammation** v. 8(66), 2011.
122. ZWILLING, D. et al. Kynurenine 3-Monooxygenase Inhibition in Blood Ameliorates Neurodegeneration. **Cell**, v. 145 p. 863–874, June 10, 2011.
123. WANG, RUOBING; SMITH, JOSEPH D.; KAPPE, STEFAN H.I. Advances and challenges in malaria vaccine development. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v.11, e 39, dec 2009.
124. WASSMER, SAMUEL C. et al. TGF- $\beta_1$  released from activated platelets can induce TNF-stimulated human brain endothelium apoptosis: a new mechanism for microvascular lesion during cerebral malaria. **The Journal of Immunology**, v.176, p.1180–1184, 2006.
125. WASSMER, SAMUEL C. et al. Platelets potentiate brain endothelial alterations induced by *Plasmodium falciparum*. **Infection and Immunity**, v.74, n.1, p.645–653, Jan. 2006.
126. WASSMER, SAMUEL C. et al. Vascular endothelial cells cultured from patients with cerebral or uncomplicated malaria exhibit differential reactivity to TNF. **Cellular Microbiology**, v.13(2) p.198–209, 2011.
127. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Infectious Disease Malaria**. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/malaria/en/>> Acesso em: 15/10/2010.

128. **WORLD MALARIA REPORT 2011.** WORLD HEALTH ORGANIZATION.

129. YOSHIMURA, AKIHITO. Regulation of Cytokine Signaling by the SOCS and Spred Family Proteins. **The Keio Journal of Medicine**, v. 58(2) p.73—83, 2009.