

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Bioquímica e Imunologia**

**Identificação da dependência do CCR4 para o  
recrutamento de células dendríticas produtoras de TNF- $\alpha$   
e NOS2 mediando a patogênese da síndrome respiratória  
aguda associada à malária**

BRUNO GALVÃO FILHO

**Belo Horizonte**  
**2018**

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Bioquímica e Imunologia**

**Identificação da dependência do CCR4 para o  
recrutamento de células dendríticas produtoras de TNF- $\alpha$   
e NOS2 mediando a patogênese da síndrome respiratória  
aguda associada à malária**

BRUNO GALVÃO FILHO

Tese apresentada ao departamento de  
Bioquímica e Imunologia como requisito  
à obtenção do título de Doutorado

Orientação: Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli  
Co-orientação: Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli

**Belo Horizonte**  
**2018**

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Ricardo Gazzinelli pela oportunidade em seu laboratório e pela orientação;

À Dra. Lis Antonelli pela orientação e profissionalismo;

À Dra. Caroline, minha primeira professora de imunologia do laboratório;

À Dra. Luara pelos ensinamentos e as primeiras aulas de citometria de fluxo;

Ao Dr. Rafael Polidoro pelas discussões científicas e políticas;

Ao Dr. Marco Ataíde pelas discussões científicas;

Ao Dr. Alexandre pelos ensinamentos na área da virologia e pela confiança em mim;

À Júlia pela colaboração;

À Ms. Suelen por acreditar em mim, pela amizade e ajuda;

Ao Guilherme pela difícil tarefa de me ouvir;

À Maria Helena, quem me ensinou a manusear animais;

À Eneida e Clécia, exemplos de organização e conduta administrativa;

À Marina, cujo o trabalho é constante na resolução de questões burocráticas;

À todos do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia;

A todos os colegas de laboratório que contribuíram com minha formação científica e organizacional durante os 11 anos de estadia no laboratório;

À Plataforma de Citometria de Fluxo e aos funcionários do biotério do Instituto Rene Rachou;

Aos órgãos de fomento: UFMG, CNPq, FAPEMIG, FIOCRUZ, INCTV;

Aos meus pais, especialmente a minha mãe por sua inabalável crença no meu sucesso;

À minha esposa e filho pelo apoio e compreensão.

## **EPÍGRAFE**

**“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos”. (Albert Einstein)**

## RESUMO

A lesão pulmonar aguda (ALI) e a síndrome respiratória aguda associada à malária (MA-ARDS) são complicações que causam sérios danos ao pulmão e frequentemente levam à morte. A MA-ALI/ARDS, objeto deste estudo, está relacionada a uma resposta imunológica do tipo Th1 mediada por linfócitos T produtores de IFN- $\gamma$ . A fim de estudarmos estas doenças, utilizamos o modelo de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa *Plasmodium berghei* NK65 (*PbN*) capaz de induzir patologia semelhante a encontrada em humanos. Confirmamos a presença predominante de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> que expressam Tbet e produzem IFN- $\gamma$ . Inesperadamente, verificamos que o dano tecidual no pulmão associado à malária depende de CCR4, receptor de quimiocina principalmente relacionado com o recrutamento de linfócitos Th2 e células T reguladoras. No entanto, em nosso modelo caracterizado pelo perfil inflamatório Th1, CCR4 não está envolvida com a migração de células Th2, mas é requerido para o recrutamento de células dendríticas produtoras de TNF- $\alpha$  e iNOS, denominadas TipDCs, para os pulmões. Todavia, o recrutamento de Tip-DCs e o desenvolvimento da MA-ALI/ARDS não foram afetados em camundongos deficientes em CCR2, normalmente associada com a migração dessas células em outros modelos. Além disso, camundongos deficientes para a produção de óxido nítrico sintase (NOS2) se mostraram resistentes ao desenvolvimento da síndrome pulmonar causada pelo *Plasmodium spp.*. Sendo assim, NOS2 produzido por Tip-DCs parece ser um fator essencial para o desenvolvimento da MA-ALI/ARDS. Além disso, nossos experimentos demonstram que a produção de IFN- $\gamma$ , por células T CD8<sup>+</sup> nos pulmões é responsável pela indução de células dendríticas provenientes de monócitos produtoras de NOS2 e TNF- $\alpha$ , e o resultado dessa resposta inflamatória que culmina no desenvolvimento da MA-ALI/ARDS é dependente de CCR4.

## ABSTRACT

Malaria-associated acute respiratory distress syndrome (MA-ARDS) and acute lung injury (ALI) are complications that cause lung damage and often leads to death. The MA-ALI/ARDS is associated with a Type 1 inflammatory response mediated by T lymphocytes and IFN- $\gamma$ . Here, we used the *Plasmodium berghei* NK65 (*PbN*)-induced MA-ARDS model that resemble human disease and confirmed that lung CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells predominantly expressed T-bet and IFN- $\gamma$ . Surprisingly, we found that development of MA-ARDS was dependent on functional CCR4, which normally mediates recruitment of Th2 lymphocytes and regulatory T cells. In this Type 1 inflammation-ARDS model, we found that CCR4 was not involved in recruitment of T lymphocytes, but required for the emergence of TNF- $\alpha$ /iNOS producing dendritic cells (TipDCs) in the lungs. In contrast, recruitment of Tip-DCs and development of MA-ARDS was unaffected significantly in CCR2<sup>-/-</sup> mice infected with *PbNK65*. Importantly, we showed that NOS2<sup>-/-</sup> mice are resistant to *PbNK65*-induced lung damage, indicating that nitric oxide produced by TipDCs is an essential component of MA-ARDS pathology. Lastly, our experiments demonstrate that local production of IFN- $\gamma$  by CD8<sup>+</sup> cells in the lungs is responsible for inducing iNOS and TNF- $\alpha$  producing DCs activity in this MA-ARDS model.

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	8
LISTA DE TABELAS .....	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	10
<b>1- Introdução .....</b>	<b>11</b>
1.1. Malária.....	11
1.2. Combate à malária .....	13
1.3. A malária no Brasil .....	16
1.4. Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> .....	17
1.5. MA-ALI/ARDS e outras complicações.....	19
1.6. Modelos experimentais de malária.....	20
1.7. Resposta imunológica na malária .....	21
1.8. Quimiocinas envolvidas na malária.....	24
1.9. O receptor de quimiocina CCR4.....	25
1.10. Células dendríticas produtoras de TNF- $\alpha$ e iNOS.....	27
<b>2- Justificativa.....</b>	<b>28</b>
<b>3- Objetivos .....</b>	<b>29</b>
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
<b>4- Materiais e Métodos .....</b>	<b>30</b>
4.1. Camundongos e infecção .....	30
4.2. Extração de leucócitos do pulmão.....	30
4.3. Obtenção do Lavado Brônquio Alveolar .....	30
4.4. Caracterização de leucócitos por citometria de fluxo.....	31
4.5. Sobrevivência e parasitemia .....	31
4.6. Histopatologia .....	32
4.7. Extração de RNA do pulmão .....	33
4.8. Síntese de cDNA .....	33
4.9. qPCR .....	34
4.10. Avaliação dos níveis de citocinas e quimiocinas por CBA .....	36
4.11. Análise estatística .....	36
<b>5- Resultados .....</b>	<b>37</b>
5.1. Caracterização do modelo de MA-ALI/ARDS.....	37
5.2. Caracterização da infecção por <i>PbN</i> em camundongos CCR4-/-.....	38
5.3. Caracterização das populações celulares no pulmão.....	40
5.4. Avaliação da flutuação de leucócitos no pulmão de camundongos infectados .....	42
5.5. Cinética de migração de células T durante a MA-ALI/ARDS.....	44
5.6. Avaliação do papel do receptor de quimiocina CCR4 em células T durante a MA-ALI/ARDS .....	45
5.7. Estudo da interferência de CCR4 na ativação de células T .....	47
5.8. Avaliação dos fatores de transcrição relacionados ao papel de linfócitos Th.....	48
5.9. Avaliação da migração de células derivadas de monócitos para o pulmão .....	50
5.10. Identificação detalhada do fenótipo de células oriundas de monócitos .....	51
5.11. Determinação dos possíveis ligantes de CCR4 .....	54

5.12. Avaliação da função de CCR2 e CCR4 na migração de Tip-DCs .....	54
5.13. Avaliação da interferência de linfócitos na migração de células F4/80 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> para o pulmão de camundongos infectados por <i>PbN</i> .....	57
5.14. Investigação do papel de IFN- $\gamma$ na maturação de Tip-DCs.....	58
5.15. Desafio de camundongos NOS2 nocaute com <i>PbN</i> .....	61
<b>6- Discussão .....</b>	<b>63</b>
<b>7- Conclusão.....</b>	<b>67</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>68</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>76</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: DISTRIBUIÇÃO DA DOENÇA E REPRESENTAÇÃO DAS REGIÕES COM CASOS DE RESISTÊNCIA DO PARASITO A INSETICIDA.. .....	12
FIGURA 2: INVESTIMENTOS TOTAIS DESTINADOS AO COMBATE CONTRA A MALÁRIA .....	14
FIGURA 3: MAPA REPRESENTATIVO DA DISTRIBUIÇÃO DE CASOS DE MALÁRIA NO BRASIL .....	16
FIGURA 4: CICLO DO PARASITO .....	18
FIGURA 5: PATOGENESES ASSOCIADAS A MALÁRIA.....	20
FIGURA 6: RESPOSTA IMUNE INATA NA MALÁRIA.....	22
FIGURA 7: FORMAÇÃO DE EDEMA NA MA-ARDS .....	24



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA. ....	32
TABELA 2: LISTA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS.....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**ARDS:** *Acute respiratory distress syndrome*  
**ALI:** *Acute lung injury*  
**CBA:** *Cytokine bead array*  
**CCR:** Receptor de quimiocinas do tipo CCL  
**CCL:** Quimiocina com duas cisteínas unidas  
**CD:** *Cluster of differentiation*  
**CXCL:** Quimiocina com duas cisteínas separadas  
**CXCR:** Receptor de quimiocinas do tipo CXCL  
**DCsign:** O mesmo que CD209 (receptor de lectina do tipo C)  
**DNA:** Ácido desoxirribonucléico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)  
**FACS:** *Fluorescence-activated cell sorting*  
**FSC:** *Forward scatter*  
**GPI:** Glicosilfosfatidilinositol  
**ICAM 1:** Molécula de adesão intercelular 1  
**Ig:** Imunoglobulina  
**IFN-g:** Interferon-gama  
**IL:** Interleucina  
**iNOS:** Óxido nítrico sintase induzido (NOS2)  
**iMO:** Monócitos inflamatórios  
**MHC:** Complexo de histocompatibilidade principal  
**MO:** Monócitos  
**MO-DCs:** Células dendríticas derivadas de monócitos  
**MYD88:** *Myeloid differentiation primary response gene 88*  
**NF-κ-β:** Factor nuclear kappa B  
**NK:** Matadoras naturais (do inglês *natural killer*)  
**NKT:** T matadoras naturais (do inglês *T natural killer*)  
**NLR:** NOD like receptor  
**PCR:** Reação em cadeia da polimerase  
**PbN:** *Plasmodium berghei* NK65  
**PBS:** Tampão salina fosfato  
**RLR:** Receptores semelhantes a RIG-1  
**RNA:** Ácido ribonucléico  
**SSC:** Side scatter  
**TCR:** Receptor de célula T  
**Th:** T auxiliar (do inglês *T helper*)  
**Tip-DCs:** Células dendríticas produtoras de TNF-α e iNOS  
**TLR:** Receptores do tipo *Toll*  
**TNF-α:** Fator de necrose tumoral alpha

# 1. Introdução

---

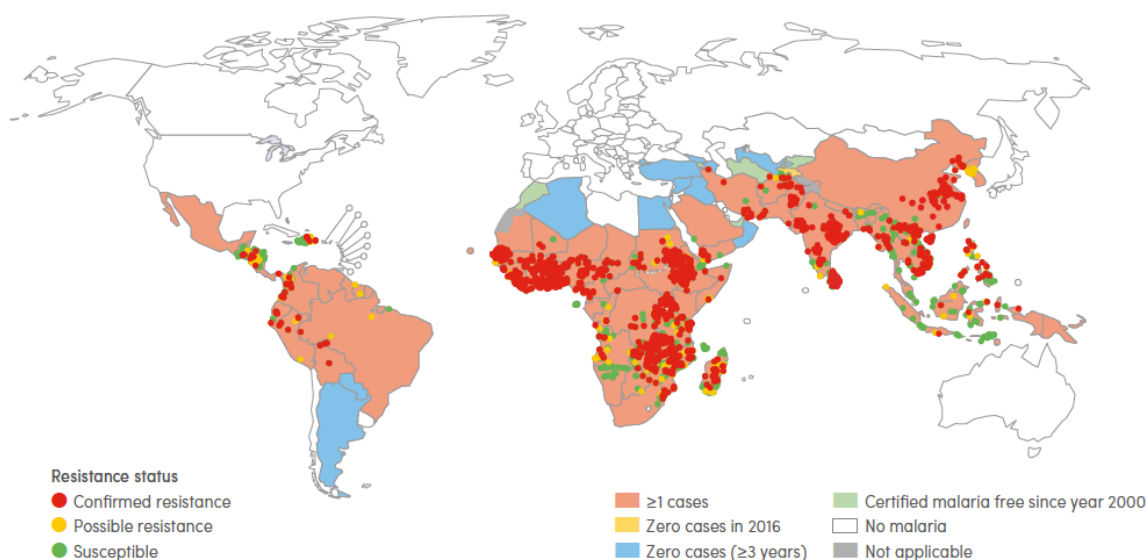
## 1.1. Malária

A malária, doença causada por parasitos do gênero *Plasmodium*, transmitidos durante o repasto sanguíneo de fêmeas do mosquito *Anopheles spp*, atinge principalmente os países de regiões tropicais e subtropicais do mundo (Figura 1). Esta doença continua sendo um grande problema de saúde pública, consistindo em uma das maiores endemias do mundo e um grande obstáculo ao desenvolvimento econômico de comunidades e nações. Em 2016, o conjunto de 91 países, atingidos pela doença, reportaram um total de 216 milhões de casos de malária, um aumento de 5 milhões de casos em relação ao ano anterior. Cerca de 90% destes casos foram reportados na África. Em relação ao número de mortes, foi relatado um total de 445.000 mortes neste ano devido à malária. Num levantamento geral de dados epidemiológicos feito entre os anos 2010 e 2016, foi observado que a incidência global dos casos de malária diminuiu aproximadamente 18%, de 76 para 63 casos/1000 habitantes em áreas de risco em relação aos anos anteriores. O sudoeste asiático se destacou pela redução de 48%, seguida pela região das Américas (22%) e a África (20%). Apesar disso, o levantamento dos dois últimos anos deste período, entre 2014 e 2016, demonstrou um aumento substancial da incidência de casos de malária na região das Américas e um aumento menos expressivo nas regiões do sudoeste asiático, no Pacífico ocidental e nas regiões da África (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017)

Existem cinco espécies de parasitos desse gênero capazes de infectar células humanas: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi* [2] O parasito *Plasmodium falciparum* é o mais prevalente na África subsaariana, responsável por cerca de 99% dos casos estimados em 2016. Em contrapartida, o *Plasmodium vivax* representa 64% dos casos de malária nas Américas, 30% no sudoeste da Ásia

e 40% na região do oeste mediterrâneo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Outro fator importante a destacar é o aumento de mosquitos resistentes a inseticidas, que tem corroborado com o recente aumento de casos de malária (Figura 1).



**Figura 1: Distribuição da doença e representação das regiões com casos de resistência do parasita a inseticidas.** A cor marrom indica regiões com mais de um caso registrado anualmente, em amarelo, regiões sem nenhum caso registrado em 2016, em azul, as regiões sem casos registrados por mais de três anos consecutivos, em verde, as regiões onde não há casos de malária desde 2000, em branco, regiões onde não há malária e em cinza são regiões onde não se aplicam estes dados. Os pontos vermelhos indicam os locais onde existe resistência dos mosquitos a biorremediação, os pontos amarelos indicam locais de possível resistência dos mosquitos e os pontos verdes indicam os locais onde os mosquitos são susceptíveis à biorremediação (World Malaria Report 2017).

Diferentes espécies de *Plasmodium* foram descritas como capazes de infectar camundongos, embora difiram entre si considerando-se algumas características. Devido às limitações nos estudos em humanos e nos ensaios *in vitro*, o uso de modelos experimentais de infecção se torna de extrema importância, devido as inúmeras possibilidades de abordagens experimentais *in vitro* e da utilização de animais nocautes para determinados genes que permitem a avaliação de diferentes aspectos imunológicos da resposta durante a infecção. Além disso, os modelos murinos permitem a investigação da progressão da doença e o estudo minucioso de órgãos como o baço, cérebro, pulmão, fígado, entre outros. Existem quatro espécies de *Plasmodium spp.* que são capazes de infectar camundongos (*P. berghei*, *P. chabaudi*, *P. yoelli* e *P.*

*vinckei*) e cada uma delas possui diferentes cepas com biologia do parasito e patogenicidade distintas. A utilização de diferentes linhagens de camundongos e de parasitos vem auxiliando na identificação de mecanismos de susceptibilidade e resistência durante a infecção e de como o parasito induz a malária (WYKES; GOOD, 2009; ZUZARTE-LUÍS; MOTA; VIGARIO, 2014).

Embora, os ciclos evolutivos das espécies causadoras da malária sejam similares, do ponto de vista patológico, a infecção apresenta diferenças que podem determinar as variações na evolução clínica da doença. A infecção de indivíduos não imunes pelo *P. falciparum* pode resultar em forma complicada e, grave caracterizada pelo acometimento e disfunção de vários órgãos ou sistemas: sistema nervoso central, sistema hematopoiético, aparelho respiratório, fígado, rins e sistema circulatório. Assim, todo paciente portador dessa espécie de plasmódio merece atenção especial, recebendo tratamento imediato, essencial para prevenir tais complicações (MINISTÉRIO DA SAÚDE).

Os sintomas da malária envolvem a clássica tríade: febre, calafrio e dor de cabeça. Sintomas gerais como mal-estar, dor muscular, sudorese, náusea e tontura podem preceder ou acompanhar a sintomática clássica. A ausência de parâmetros clínicos específicos que permitam confirmar a infecção justifica a necessidade de métodos laboratoriais para o diagnóstico da malária.

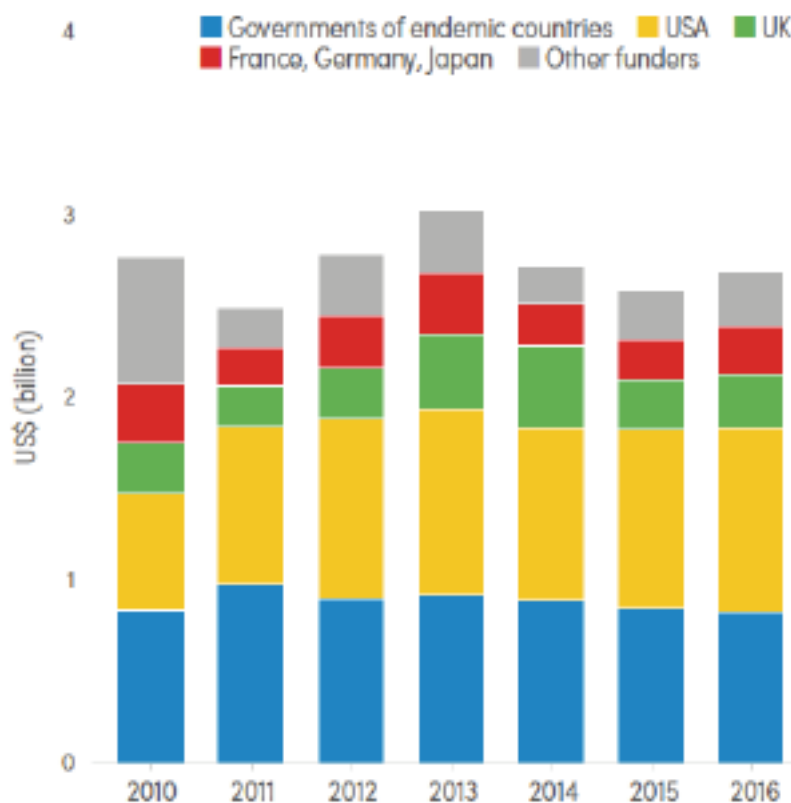
O diagnóstico da doença depende principalmente de exames de gota espessa realizado em lâmina para microscopia ótica. Além disso, técnicas com o PCR também têm sido utilizadas para detectar a presença do Plasmodium em humanos (MINISTÉRIO DA SAÚDE). Todavia, alguns testes rápidos têm sido testados, o que poderia facilitar bastante o diagnóstico inicial. Os testes rápidos focam no reconhecimento de proteínas presentes no parasito, como a HRP2 (Proteína 2 contendo várias repetições de histidina). Todavia, um estudo no Peru demonstrou que grande parte dos parasitos estão perdendo a expressão de HRP2, o que mostra a plasticidade do parasito e a dificuldade de estabelecer um teste rápido confiável (GAMBOA et al., 2010 ).

## **1.2. Combate à malária**

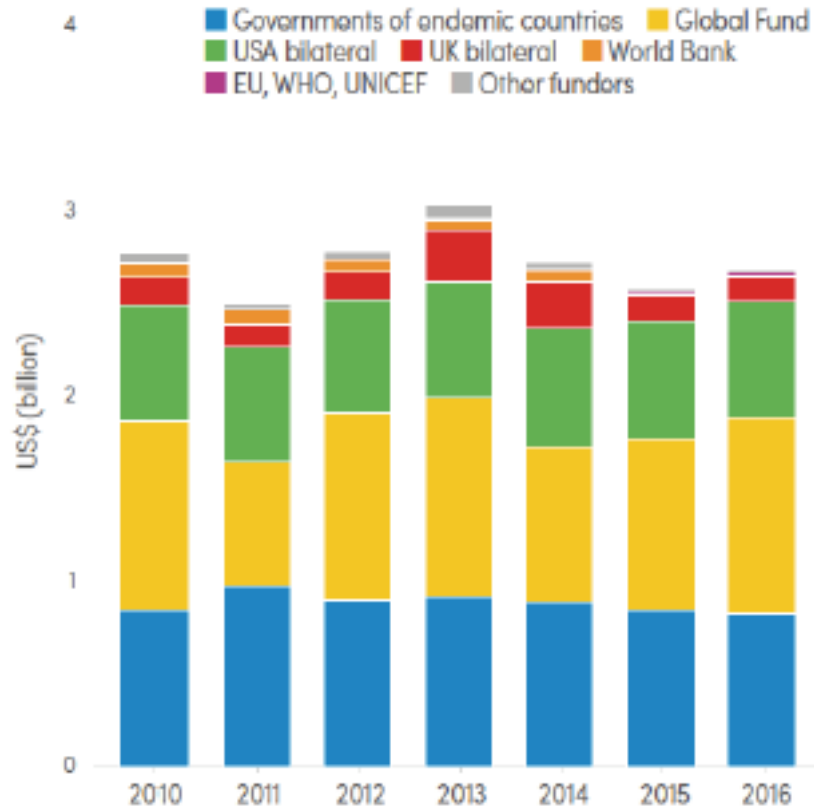
Perspectivas apontam que para reduzir a incidência e o risco de

mortalidade dos casos de malária em até 90 % até o ano 2030, serão necessários cerca de \$6,4 bilhões anualmente, dos quais, 88% destes investimentos devem ser destinados aos 20 países que apontaram os maiores índices de casos de malária em 2015 (PATOULLARD et al., 2016). Nos últimos anos, grandes esforços foram dedicados ao combate à malária. Em 2016, foram investidos 2.7 bilhões de dólares no controle e nos esforços para eliminação desta doença por governos de países endêmicos e seus parceiros internacionais. A maioria dos investimentos em 2016 foi destinada à região da África (74%), sudoeste asiático (7%), oeste mediterrâneo e Américas (6%), Pacífico oeste (4%). Os governos dos países endêmicos contribuíram com 31% do total investido e países como os Estados Unidos, Reino Unido e outros colaboraram fortemente com os recursos ao fundo internacional da malária em 2016 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017) (Figura 2).

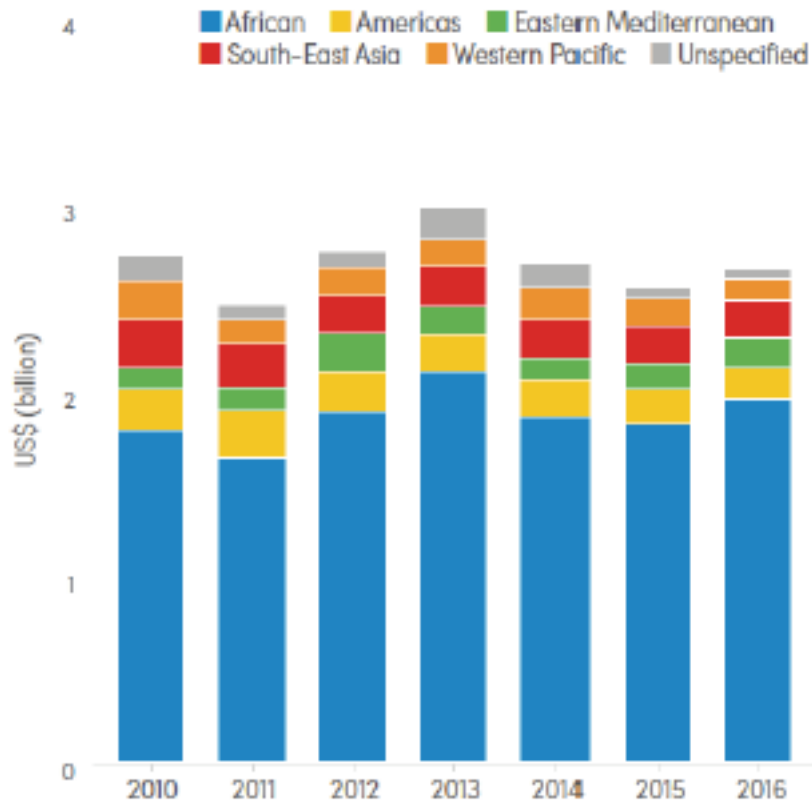
A



B



C



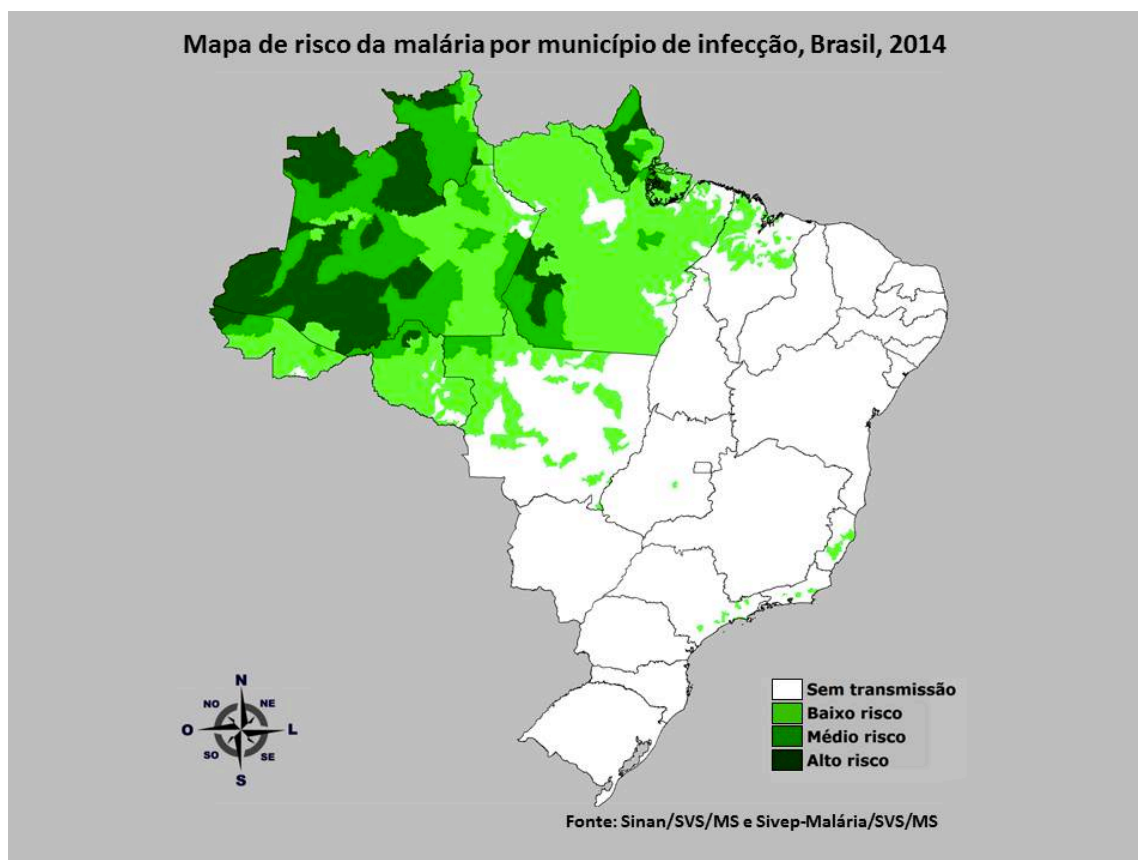
**Figura 2: Investimentos totais destinados ao combate contra a malária:** (A) Investimento no controle e eliminação da malária por fonte de renda. (B) Investimento

no controle e eliminação da malária por entidades responsáveis pela canalização dos fundos. (C) Investimento no controle e eliminação da malária por região da Organização Mundial da Saúde (World Malaria Report 2017).

### 1.3. A malária no Brasil

No Brasil, o *P. vivax* é a espécie responsável pelo maior número de casos (88%) e a região da Amazônia é considerada a área endêmica para malária no país (SIVEP-MALÁRIA, 2017) (Figura 3). Todavia, nas demais regiões, apesar das poucas notificações, a doença não pode ser negligenciada, pois se observa alta letalidade, que chega a ser 100 vezes maior que na região endêmica (<http://portal.saude.gov.br/saude>).

O número total de casos de malária na região amazônica aumentou 47% no ano de 2017 em comparação aos dois últimos anos, passando de 105 mil casos em 2016 para mais de 150 mil registrados somente até outubro de 2017 (MS/SVS, 2017).



**Figura 3: Mapa representativo da distribuição de casos de malária no Brasil.** Os tons mais escuros de verde representam as regiões com maior risco de transmissão de malária em 2014, os tons mais claros de verde representam as regiões com menor

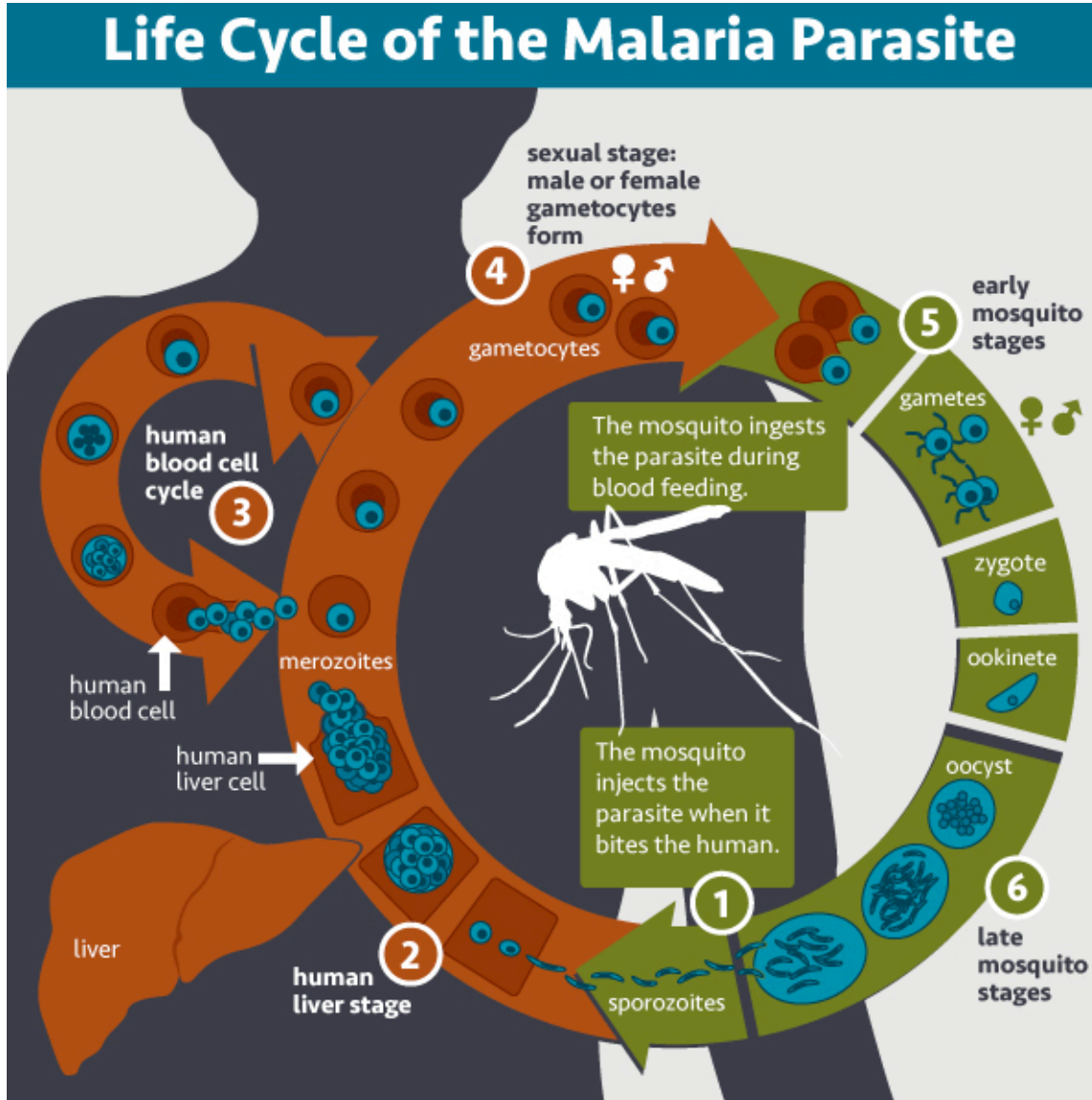


risco, enquanto o branco representa as regiões onde não ocorre transmissão da doença.

#### **1.4. Ciclo biológico do *Plasmodium* spp.**

O ciclo biológico da malária envolve dois hospedeiros. A fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*, infectada previamente pelo *Plasmodium* sp., se alimenta de sangue humano através da picada e injeta parasitos na forma de esporozoítos na corrente sanguínea. Estas formas migram para o fígado do hospedeiro humano e invadem os hepatócitos. Entre 5-16 dias, o esporozoíto cresce e se divide, produzindo dezenas de milhares de formas haplóides, denominadas merozoítos, por hepatócito. Algumas espécies de parasitos também originam hipnozoítos no fígado que podem permanecer dormentes por longos períodos, o que pode causar relapsos semanas ou meses após a infecção. Os merozoítos causam a lise dos hepatócitos e entram na circulação sanguínea, iniciando o ciclo de invasão de hemácias, ou eritrocítico, onde ocorre a replicação assexuada. Nas células vermelhas, eles se desenvolvem em esquizontes maduros, os quais rompem as hemácias e geram merozoítos que invadem novas hemácias. Este ciclo de invasão e ruptura da célula se repete a cada 1-3 dias e pode resultar em milhares de células vermelhas infectadas na circulação sanguínea do hospedeiro, ocasionando os sintomas da malária e complicações que podem se estender por meses, caso não tratada. Alguns dos merozoítos deixam o ciclo da replicação assexuada e, ao invés de se replicar, desenvolvem-se em formas sexuadas do parasito, denominados gametócitos masculinos e femininos. Na fase tardia, estes gametócitos jovens sequestrados na medula óssea ou em alguns órgãos, podem entrar na circulação sanguínea e serem ingeridos pelo mosquito durante a picada. No intestino do mosquito, as hemácias infectadas arrebentam liberando os gametócitos, os quais se desenvolvem em formas sexuadas maduras chamadas gametas. Gametas masculinos e femininos se fundem para formar zigotos que se desenvolvem em oocinetos ativos (móveis) capazes de atravessar a parede do intestino do mosquito e formam oocistos. O crescimento e a divisão de cada oocisto produzem milhares de formas haplóides ativas chamadas de esporozoítos. Entre 8-15 dias, os oocistos se rompem liberando

esporozoítos na cavidade do corpo do mosquito, de onde eles migram para as glândulas salivares do inseto. O ciclo no humano se reinicia quando a fêmea do mosquito *Anopheles spp.* se alimenta do sangue humano, injetando os esporozoítos das glândulas salivares na circulação sanguínea (Figura 4).



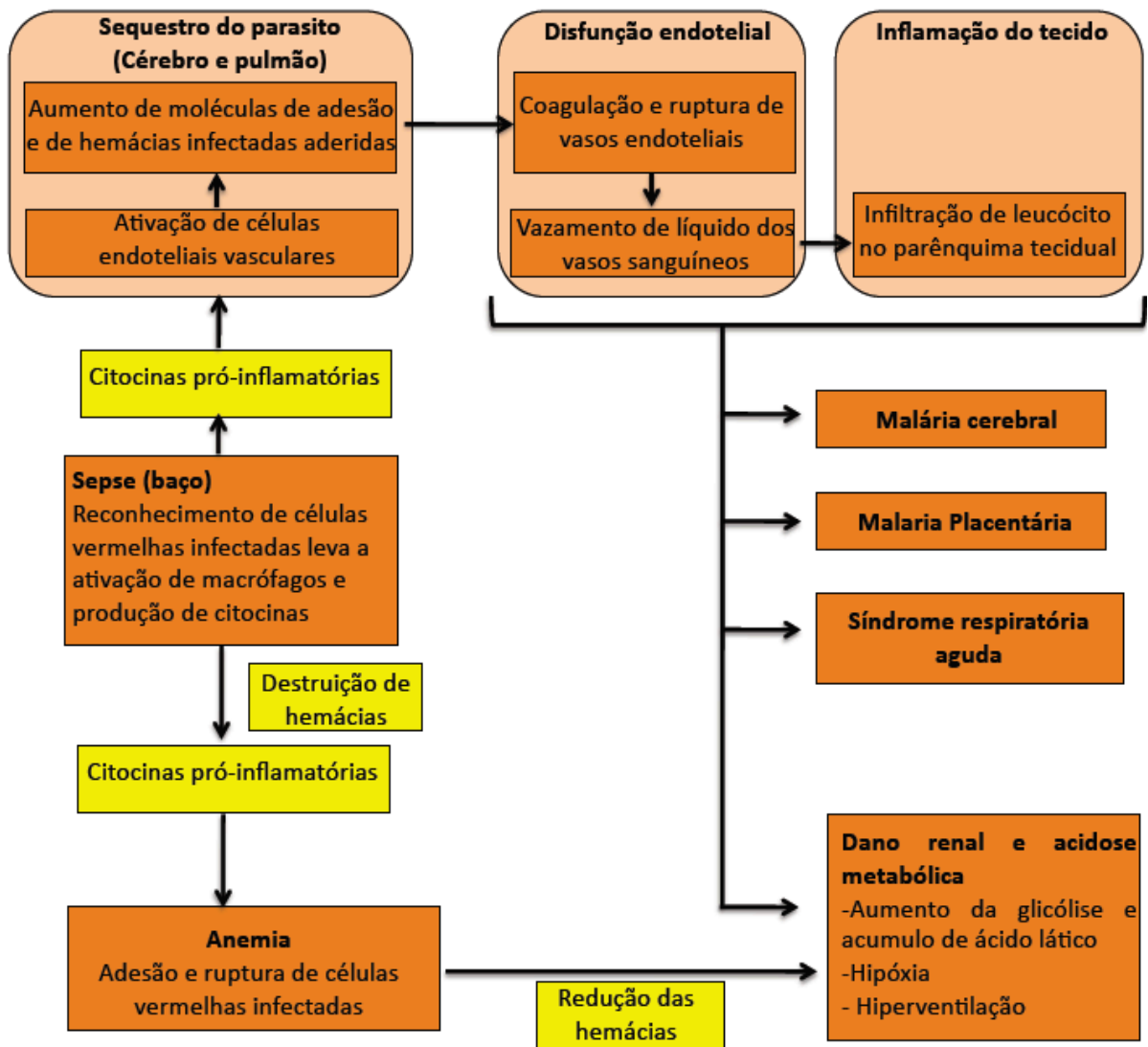
**Figura 4: Ciclo do parasito.** Em verde estão representadas as fases de desenvolvimento do *Plasmodium sp.* no mosquito. A cor laranja representa as fases do ciclo do parasito em seres humanos. Após infecção de um humano pelo anofelino (1), esporozoítos infectam o fígado do hospedeiro (2) até se diferenciarem em merozoítos nos hepatócitos que migrarão para a fase sanguínea (3), onde irão infectar eritrócitos e diferenciar na forma sexual (4) ou continuar o ciclo de invasão a novos eritrócitos por novos merozoítos (INOUE et al., 2013).

## 1.5. MA-ALI/ARDS e outras complicações da malária

Algumas complicações podem ocorrer durante a progressão da malária e estes quadros são denominados casos de malária grave, dentre as quais se incluem as síndromes respiratórias (TAYLOR et al., 2006; MOHAN et al., 2008; TAYLOR et al., 2012). Além das síndromes respiratórias, as complicações mais comuns são as renais, a cerebral, a anemia grave e a acidose metabólica. A remoção de hemácias infectadas (iRBCs) por macrófagos ou o reconhecimento de hemozoína livre dispara mecanismos da imunidade inata e estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias. As citocinas circulantes induzem a expressão de moléculas de adesão pelas células do endotélio, as quais mediam o sequestro de iRBCs, o que pode ocasionar rupturas na parede dos vasos sanguíneos e consequente extravazamento do conteúdo vascular para o local da inflamação. Todos estes eventos contribuem com o desenvolvimento da síndrome respiratória aguda e malária cerebral. Além disso, a síndrome respiratória é associada à acidose metabólica. Atualmente, a acidose metabólica tem sido associada à duas causas principais: (1) o acúmulo de ácido láctico devido à glicólise em eritrócitos durante a hipóxia e (2) à vasoconstrição das vias aéreas (GAZZINELLI et al., 2014).

O efeito da malária nos pulmões do paciente pode não ser claro, por falta de sintomas. cerca de 20-50% dos pacientes com malária desenvolvem uma tosse seca. Ocasionalmente o paciente pode apresentar taquipneia, o que pode ocorrer devido a febre, anemia ou dano pulmonar. Todavia, os casos de insuficiência respiratória severa devido ao aumento da permeabilidade alveolar pode ter sintomas claros: tosse, dispnéia repentina e severa hipóxia que pode ser fatal (MAZHAR et al., 2016).

O tratamento para a MA-ARDS é limitado, pois consiste basicamente na combinação de drogas antimaláricas associadas a ventilação mecânica [10]. Além disso, o desenvolvimento de MA-ALI/ARDS está fortemente associado ao tratamento com as drogas anti-maláricas, uma vez que a maioria dos casos ocorre após o início do uso dessas drogas (SARKAR; SAHA; DAS, 2010).



**Figura 5: Patogêneses da malária.** O esquema representa a influência de fatores causadores de inflamação capazes de levar a diferentes complicações induzidas pelo *Plasmodium ssp* (Adaptado de GAZZINELLI et al., 2014).

### 1.6. Modelos experimentais de MA-ALI/ARDS

Alguns modelos animais são utilizados para estudar a MA-ALI e/ou a MA-ARDS. Camundongos BALB/c infectados por *Plasmodium berghei* ANKA (*PbA*) desenvolvem não sofrem de malária cerebral, mas podem desenvolver danos no pulmão (BAPTISTA et al., 2010). Camundongos DBA-2 infectados por *PbA* também são utilizados atualmente no estudo da MA-ALI, pois estes camundongos também são resistentes à malária cerebral (EIPHANIO et al., 2010). No entanto, os camundongos BALB/c e DBA-2 nos modelos citados não são usados como base na construção de camundongos modificados

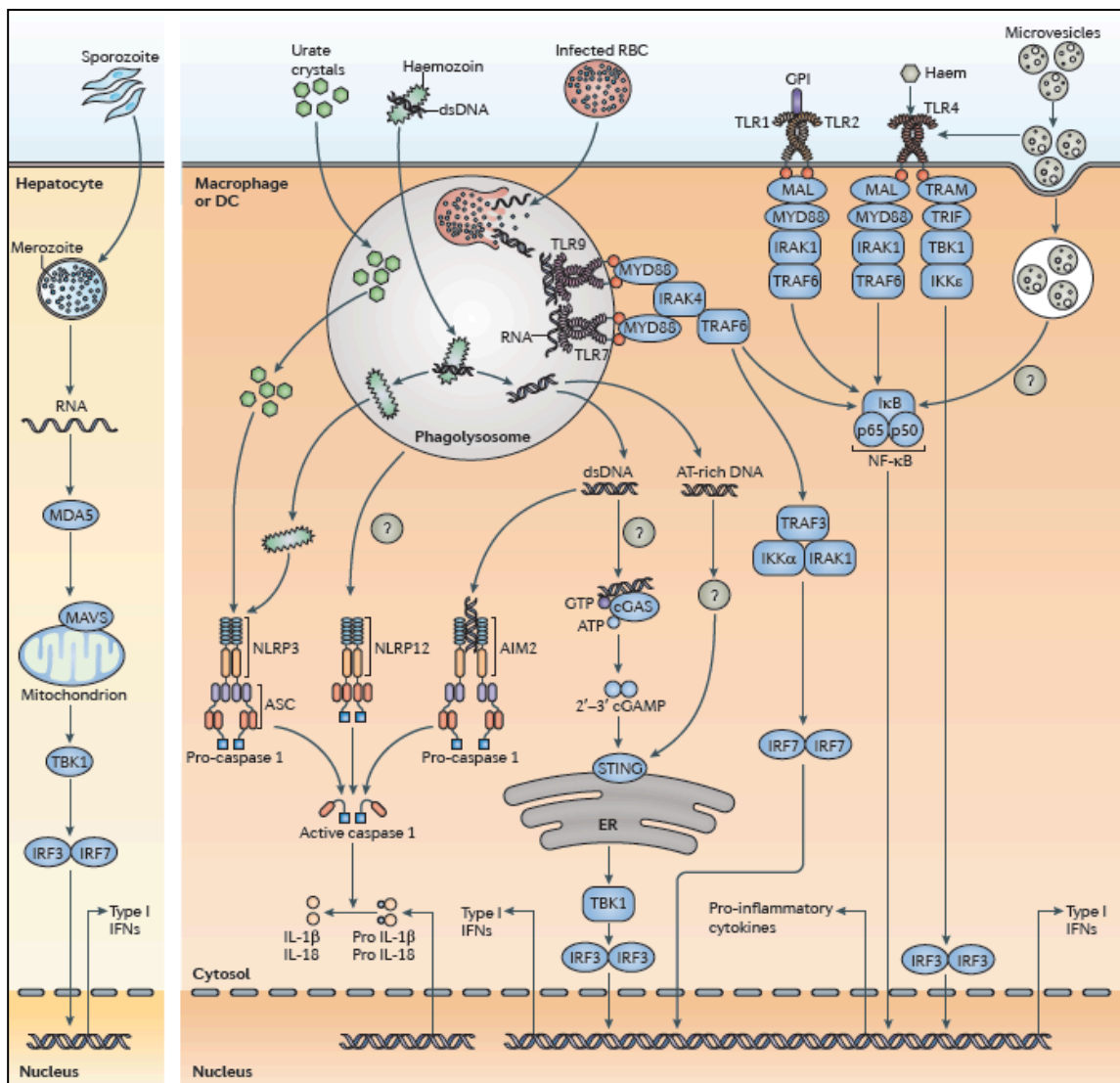
geneticamente, o que torna o estudo dos mecanismos imunológicos mais difícil. O modelo experimental mais estudado é o que utiliza camundongos C57BL/6 infectados por *PbA*. Neste modelo, os camundongos desenvolvem edema pulmonar, mas também acidose metabólica e danos renais (CHANG et al., 2001) Além disso, camundongos C57BL/6 infectados pelo *PbA* também desenvolvem malária cerebral em torno de 6-7 dias após a infecção e morrem rapidamente, o que torna a "janela temporal" para estudo da MA-ARDS muito pequena (HAQUE ET AL., 2011). Além disso, a resposta imune estimulada pela malária cerebral deve interferir com o estudo específico da síndrome respiratória, o que pode tornar as conclusões dos estudos imprecisas. Outro modelo descrito mais recentemente mostra o uso de camundongos C57BL/6 infectados pelo *Plasmodium berghei* NK65. Neste último, os camundongos desenvolvem a síndrome respiratória aguda e a maioria morre dentro de 12 dias devido à doença (VAN DEN STEEN et al., 2010).

### **1.7. Resposta imunológica na malária**

O controle do parasito tem sido relacionado aos mecanismos da imunidade inata assim como aos da imunidade adquirida, tanto no modelo murino da malária quanto na infecção humana. Acredita-se que mediadores solúveis e de membrana celular, induzidos pela imunidade inata, influenciam o desenvolvimento da imunidade adaptativa e, sobretudo, os mecanismos da resposta imune inata parecem limitar a fase inicial de replicação do plasmódio até que o hospedeiro desenvolva resposta imune adaptativa capaz de eliminar a infecção (LANGHORNE et al., 2008).

A resposta imune inata está intimamente relacionada à capacidade das células de reconhecer inicialmente padrões moleculares do parasito (PAMPs). Estas moléculas são reconhecidas por receptores denominados TLRs (Toll Like Receptors) encontrados na membrana do endossomo celular ou na superfície das células. Outros receptores citosólicos podem também estar envolvidos, tais como RLRs (RIG-I-like receptors) e NLRs (Nod-like Receptors) (GAZZINELLI et al., 2014).

O DNA do *Plasmodium sp.* é um importante ativador da resposta imune inata em camundongos e humanos (PARROCHE et al., 2007; PICHYANGKUL et al., 2004; WU et al., 2010; SHARMA ET AL., 2011). O receptor responsável pelo reconhecimento do DNA do parasito é o TLR9, cuja interação é capaz de induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias por células dendríticas e macrófagos. O RNA derivado do *Plasmodium sp.* pode ser reconhecido pelo TLR7 e participar na ativação de células imunes inatas na malária murina (BACCARELLA et al., 2013) (Figura 6).

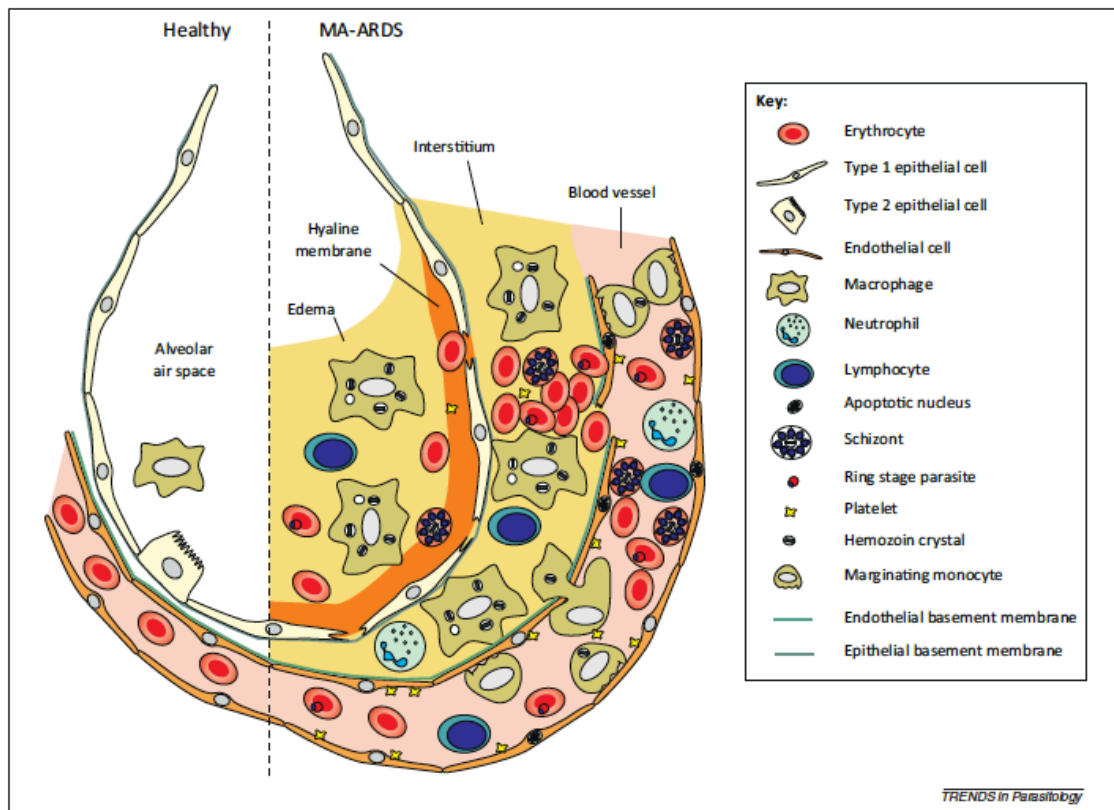


**Figura 6: Resposta imune inata na malária.** O RNA derivado de merozoítos do vacúolo parasitóforo para o citoplasma de hepatócitos estimula sinais que induzem interferons do tipo I (painel a esquerda). Receptor 7 do tipo *toll* (TLR7) e TLR9 são receptores de RNA e DNA, respectivamente, e glicofosfatidilinositol é reconhecido por TLR1-TLR2. Os sinais dos TLRs dependem do adaptador MYD88 para levar a ativação do fator nuclear  $\kappa$ - $\beta$  (NF-  $\kappa$ - $\beta$ ) o que culmina na produção de citocinas pró-inflamatórias. Outros receptores citosólicos também estão envolvidos na resposta inflamatória e

montagem de inflamossomos, estes responsáveis pela clivagem de caspases e conseqüente produção de IL-1 $\beta$ , potente citocina inflamatória.

Na imunidade adquirida, o papel dos linfócitos e a produção de anticorpos contra antígenos específicos do plasmódio é amplamente estudada e alguns antígenos como o Pfsea1 e o MSP têm sido alvo para diferentes estratégias de vacinação (RAJ et al., 2012; ELLIS et al., 2010). O papel das células T CD4<sup>+</sup> tem sido relacionado especialmente com a indução da produção de anticorpos por células B (XU et al., 2000). Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> são também relevantes e estão intimamente associadas com a indução de malária grave, dentre os quais o desenvolvimento de malária cerebral experimental (ECM) (SWANSON et al., 2016). De fato, em camundongos depletados de células T CD8<sup>+</sup> e infectados por *Plasmodium berghei* ANKA (*PbA*), modelo experimental de malária cerebral, é observado a redução no extravasamento de sangue no coração, cérebro, pulmões e rins, quadro comumente observado durante a infecção em camundongos selvagens (CHANG et al., 2001). Além disso, as células T CD8<sup>+</sup> também foram relacionadas com o desenvolvimento da síndrome respiratória aguda associada à malária (MA-ARDS) em modelo murino (VAN DEN STEEN et al., 2010).

A resposta imune na MA-ARDS é principalmente relacionada com o edema pulmonar que é constituído por uma grande quantidade de fluído contendo um infiltrado de células inflamatórias e hemácias. Este processo inflamatório pode ser induzido pela formação de cristais de hemozoína, que podem ser fagocitados por macrófagos, os quais produzem citocinas pró-inflamatórias capazes de interferir com a expressão de moléculas de adesão celular e com fatores responsáveis pela dilatação dos vasos sanguíneos. O rompimento de vasos e a entrada de células fagocíticas no tecido corroboram com o extravasamento de elementos do sangue para o pulmão (VAN DEN STEEN et al., 2013) (Figura 7).



**Figura 7: Formação de edema na MA-ARDS.** Cristais de hemozoína são produzidos por parasitos e podem ser fagocitados e induzir a inflamação no pulmão. O aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos e a infiltração de células fagocíticas e linfócitos T nos interstícios e nos alvéolos pulmonares causam edema e hemorragia. Os danos causados ao pulmão caracterizam a MA-ARDS (VAN DEN STEEN et al., 2013).

### 1.8. Quimiocinas envolvidas na malária

As quimiocinas podem ser divididas em duas categorias de acordo com suas funções: (1) inflamatórias, quimiocinas expressas constitutivamente que trabalham na manutenção da homeostase do organismo e (2) homeostáticas, quimiocinas induzidas que normalmente têm sua expressão aumentada em resposta às infecções (ZLOTNIK et al., 2006). Algumas quimiocinas podem ser expressas de acordo com o perfil de polarização das células T CD4<sup>+</sup> auxiliares. Células Th1 expressam predominantemente CXCR3, CCR5 e CXCR6, enquanto células Th2 tendem a expressar CCR3, CCR4 e CCR8. Entretanto, a expressão de quimiocinas relacionadas com a polarização de células T CD4<sup>+</sup> pode apresentar características complexas nos modelos experimentais *in vivo* de malária (KIM et al., 2001).



O papel de CCR2 na migração de monócitos é bastante estudado e sabe-se que este é o principal receptor para o CCL2, responsável pelo recrutamento de monócitos inflamatórios (KURIHARA et al., 1997). O papel de CCR2 na migração de monócitos inflamatórios também já foi estudado em modelo de malária murina, já que a deficiência dessa molécula atrasa a migração dos monócitos para o baço e reduz a eliminação do parasito (SPONAAS et al., 2009). Foi demonstrado no modelo de malária cerebral experimental (ECM) que camundongos deficientes para a molécula CCR2 são completamente susceptíveis à infecção por *Plasmodium berghei* ANKA (*PbA*), enquanto 80% dos camundongos CCR5 nocaute são resistentes (BELNOUE et al., 2003a; BELNOUE ET AL., 2003b). Nosso grupo demonstrou que células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> que migram para o cérebro de camundongos infectados por *PbA* expressam CCR5 e estas células também expressam CXCL9 e CXCL10, ambas quimiocinas envolvidas no recrutamento de linfócitos T (HIRAKO et al., 2016). De fato, células T no cérebro de camundongos infectados por *PbA* expressam o receptor para as quimiocinas CXCL9 e CXCL10, denominado CXCR3, o qual está fortemente associado ao recrutamento de linfócitos na malária cerebral murina. Foi demonstrado também que camundongos CXCR3<sup>-/-</sup> são resistentes ao desafio com o *Plasmodium Berghei* ANKA (CAMPANELLA et al., 2008; MIU et al., 2008).

Em modelo experimental utilizando camundongos C57BL/6 infectados por *PbA*, a quimiocina CXCL10 associada a sinalização de STAT3 também foi descrita como fator no desenvolvimento da síndrome respiratória. Camundongos CXCL10<sup>-/-</sup> tiveram um reduzido infiltrado inflamatório e reduzido edema pulmonar quando comparados aos camundongos selvagens (LIU et al., 2012).

### **1.9. O receptor de quimiocina CCR4**

O receptor CCR4 foi primeiramente clonado de uma linhagem celular basófilica humana (POWER et al., 1995). Em seguida, foi clonado o ortólogo murino, altamente expresso no timo e linhagens de células T (HOOGWERF et al., 1996; (YOSHIE; MATSUSHIMA, 2015). Foi estabelecido que CCR4 é

altamente expresso em células T ativadas, células Th2 e células T reguladoras (D'AMBROSIO et al., 1998; ACOSTA-RODRIGUEZ et al., 2007). Também foi descrito que células Th17 de humanos expressam CCR4, mais especificamente, células Th17 de memória em humanos (ACOSTA-RODRIGUEZ et al., 2007; LIM ET AL., 2008). Além disso, a expressão de CCR4 tem sido observada em plaquetas, células NK, macrófagos e células dendríticas (POWER et al., 1995; BERAHOVICH et al., 2006; CHVATCHKO et al., 2000; COLUMBA-CABEZAS et al., 2002; POPPENSIEKER et al., 2012)

As quimiocinas CCL17 e CCL22 são fortes ligantes de CCR4 (YOSHIE; MATSUSHIMA, 2015). Neste contexto em que há dois ligantes principais competindo pelo mesmo receptor, o processamento da região N-terminal pode determinar o fino controle da atividade da quimiocina, o que pode tornar a quimiocina inativa ou tornar sua atividade antagônica. A região N-terminal do CCL22 truncada, confere a perda de atividade quimioatraente para células T, mas retém a capacidade de atrair monócitos (STRUYF ET AL., 1998). Apesar de esplenócitos derivados de camundongos CCR4 nocautes não responderem as quimiocinas CCL17 e CCL22, o que reforça a afinidade destes ligantes com o receptor, sabe-se que doses altas de CCL2, CCL3, e CCL5 foram capazes de induzir sinalização através do receptor CCR4 (POWER et al., 1995). Outro trabalho ainda demonstrou que células deficientes para CCR4 não respondem ao CCL3 *in vitro* (CHVATCHKO ET AL., 2000). Esses achados sugerem que o CCL3 deve exercer efeitos via CCR4, o que ainda precisa ser resolvido.

A alta expressão de CCR4 em células T residentes da pele sugerem o envolvimento de CCR4 em respostas imunes associadas a este tecido (SATHER et al., 2007). Outros estudos também corroboram com o importante papel de CCR4 na ativação de células da imunidade inata e imunopatologias associadas às respostas Th2 (CAMPBELL; O'CONNELL; WURBEL, 2007; NESS et al., 2006). Alguns estudos indicam que o CCR4 pode estar envolvido também no recrutamento e ativação de células mielóides em humanos e camundongos (BELPERIO et al., 2004).

## 1.10. Células dendríticas produtoras de TNF- $\alpha$ e iNOS

Sabe-se que os monócitos são capazes de diferenciar em células dendríticas (ALONSO ET AL., 2011) Dentre estes tipos celulares, as células dendríticas oriundas de monócitos e capazes de produzir TNF- $\alpha$  e iNOS foram primeiramente descritas em 2003. Neste trabalho foi demonstrado que ocorreu o recrutamento de células CD11b<sup>int</sup>CD11c<sup>int</sup>CCR2<sup>+</sup> para o baço de camundongos infectados por *Listeria monocytogenes*. Camundongos nocautes para a molécula CCR2 mostraram ser ineficientes no recrutamento de células dendríticas produtoras de TNF- $\alpha$  e iNOS (Tip-DCs) (SERBINA et al., 2003). Ainda no modelo murino de infecção por *L. monocytogenes* foi mostrado que essas células são grandes produtoras de IFN- $\beta$  (DRESING et al., 2010).

Apesar da descrição das Tip-DCs ter sido realizada primeiramente em modelo bacteriano, sua participação em modelo de infecção por protozoário também foi estudada. A infecção de camundongos por *T. brucei brucei* causou recrutamento de Tip-DCs para o baço, fígado e linfonodos dos animais. Neste modelo de infecção, as Tip-DCs foram caracterizadas pelo fenótipo CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup> e pela capacidade de produzir TNF- $\alpha$  e iNOS. Além disso, essas células ainda expressaram altos níveis de CD80, CD86, MHC-I e MHC-II, o que indica células com fenótipo maduro (BOSSCHAERTS ET AL., 2010).

Em humanos também foi demonstrado que células de origem monocítica são capazes de desenvolver o fenótipo de Tip-DC (WILSMANN-THEIS et al., 2013). Além disso, células CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  são capazes de induzir o rápido desenvolvimento de monócitos humanos em células dendríticas que expressam altos níveis de TNF- $\alpha$  e iNOS, CD40, CD80, CD86 e MHCII (CHONG et al., 2011).

## 2. Justificativa

---

A lesão pulmonar e a síndrome respiratória aguda associada à malária (MA-ALI/ARDS) tem ganhado importância recentemente e foi classificada como um dos quadros de malária grave, juntamente com a malária cerebral, acidose metabólica e outras [11]. Apesar de haver relatos de malária cerebral induzida por *Plasmodium vivax*, normalmente esta patologia está associada principalmente a infecções por *Plasmodium falciparum*. Todavia a MA-ALI/ARDS pode ser causada tanto por *Plasmodium falciparum* quanto por *Plasmodium vivax* (ATAM et al., 2013; SARKAR et al., 2008; MACCORMICK et al., 2014)

A maioria dos estudos a cerca do papel do receptor de quimiocina CCR4 foram realizados em modelos cuja resposta imune predominante é do tipo Th2 (BELPERIO et al., 2004; FAUSTINO et al., 2013). Os estudos abordaram principalmente o envolvimento deste receptor no recrutamento de células T efetoras, mas também o recrutamento de células T reguladoras (LIM et al., 2008; CAMPBELL et al., 2007). Todavia, alguns estudos demonstraram a importância de CCR4 em células de origem mielóide, mesmo em resposta imune Th2. Além disso, o CCR4 mostrou participação no modelo de inflamação de encefalomielite experimental aguda, cuja resposta imunológica é sabidamente Th1/Th17. A deficiência de CCR4 alterou drasticamente com a capacidade de produção de GM-CSF e IL-23 por células CD11c<sup>+</sup>, denominadas células dendríticas neste trabalho (POPPENSIEKER et al., 2012). Sabe-se que as células dendríticas tem o importante papel de induzir a resposta imune Th1 ou Th2 de acordo com sinais e citocinas que elas produzem durante a apresentação de antígenos para linfócitos CD4<sup>+</sup> (MALDONADO-LOPEZ et al., 2001).

Portanto, consideramos relevante o estudo do papel de CCR4 no desenvolvimento da MA-ALI/ARDS, o que poderá contribuir com o entendimento do papel de CCR4 em modelos de infecção por protozoários cujo perfil imunológico seja Th1. Este estudo pode ainda indicar o papel deste receptor de quimiocina numa lesão pulmonar e revelar mecanismos imunológicos envolvidos na patogênese da malária.

## 3. Objetivos

---

### 3.1 Objetivo geral

Investigar o papel do receptor de quimiocina CCR4 e os mecanismos imunológicos envolvidos no desenvolvimento da síndrome respiratória aguda associada à malária.

### 3.2 Objetivos específicos

**Objetivo específico 1:** Investigar a resistência de camundongos C57BL/6 e CCR4<sup>-/-</sup> à síndrome respiratória aguda causada por *Plasmodium berghei* NK65.

**Objetivo específico 2:** Identificar a flutuação de células no pulmão durante o desenvolvimento da MA-ALI/ARDS sobre influência de CCR4.

**Objetivo específico 3:** Avaliar o perfil das células T do pulmão e baço durante o desenvolvimento da MA-ALI/ARDS em animais selvagens e deficiente em CCR4.

**Objetivo específico 4:** Verificar quais os possíveis ligantes de CCR4 envolvidos no modelo proposto.

**Objetivo específico 5:** Determinar a função das principais células envolvidas na patogênese da MA-ALI/ARDS.

## **4. Materiais e métodos**

---

### **4.1. Camundongos e infecção**

A execução dos experimentos *in vivo* foi submetida ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz pelo número do protocolo (LW1514). Todos os experimentos *in vivo* estão sendo realizados no biotério de experimentação do Instituto René Rachou (IRR)/FIOCRUZ-MG. Os animais utilizados são fêmeas com idade de 8 a 12 semanas provenientes do IRR (CD8<sup>-/-</sup>, CCR2<sup>-/-</sup> e CCR4<sup>-/-</sup>) ou do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (C57BL/6). *Plasmodium berghei* NK65 foram mantidos por passagens sucessivas a cada 7 dias, quando a parasitemia é inferior a 4%, em camundongos selvagens C57BL/6. O inóculo intraperitoneal de 10<sup>4</sup> hemácias infectadas foi preconizado em todas as infecções.

### **4.2. Extração de leucócitos do pulmão**

O sacrifício dos camundongos foi realizado com uma dose letal de anestésico (quetamina/xilasina). A fim de realizar a perfusão sanguínea foi realizado a abertura da caixa torácica dos animais e 20 ml de PBS gelado foi introduzido por um furo no ventrículo direito com uma agulha (27G), o rim direito foi retirado para vasão do PBS. Os pulmões foram coletados e mantidos em meio RPMI, no gelo, durante todo o processamento.

### **4.3. Obtenção do lavado brônquio alveolar**

Animais anestesiados com solução quetamina/xilasina foram submetidos à coleta do lavado brônquio alveolar. Para tal procedimento foi realizado um pequeno corte na traqueia e inserido um cateter de 1,6 mm acoplado a uma seringa contendo 700 µl de PBS gelado. O PBS foi injetado nos pulmões e, após 30 segundos, foi coletado. Repetimos a inoculação do mesmo volume de PBS novo perfazendo o total de 1,4 ml do lavado coletado.

#### 4.4. Caracterização de leucócitos por citometria de fluxo

Aproximadamente  $5 \times 10^5$  células/poço foram plaqueadas em placa de 96 poços e submetidas à marcação de antígenos de superfície ou intracelular. Anticorpos conjugados a fluorocromos foram diluídos em PBS contendo 2% de SFB e previamente testados e titulados para melhor desempenho dos experimentos. Os leucócitos purificados por gradiente de Percoll foram plaqueados e fenotipados com F4/80 PercPCy5.5, CD11b PECy7, CD11c Alexa-fluor700, CD209 APC, CD4 FITC, CD8 efluor780, Ly6c efluor450, CD206 Brillant Violet 650. De acordo com a necessidade de cada experimento, os seguintes anticorpos conjugados a fluorocromos também foram utilizados: CD24 efluor780, CCR2 FITC, CCR4 PECy7, CD80 PE, CD86 APC, CXCR3 PE, CD62L PECy7, CD44 Pacific Blue. As células foram incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos e em seguida foram lavadas com tampão de FACS (2% SFB em PBS) e levadas para leitura no equipamento LSR Fortessa (BD Pharmingen). Os arquivos gerados foram então analisados no software *FlowJo 9.5.1 (TreeStar)*.

#### 4.5. Sobrevivência e parasitemia

Os camundongos foram infectados com  $10^4$  parasitos *Plasmodium berghei* NK65 e a sobrevivência foi acompanhada diariamente. A parasitemia foi monitorada a cada dois dias utilizando esfregaço sanguíneo corado com panótico (Laborclin). A porcentagem de infecção foi definida a partir da contagem total de 700 hemácias por lâmina estabelecendo a presença ou não de parasitos. Os camundongos foram eutanasiados devido aos sintomas da MA-ARDS ou morreram devido a alta frequência de hemácias infectadas no sangue. Para os animais que foram coletados os pulmões, a parasitemia foi feita apenas no dia do sacrifício dos mesmos, o que ocorreu principalmente 9 dias após a infecção dos mesmos por *PbN*.

#### 4.6. Histopatologia

O pulmão do camundongo foi perfundido com PBS e o lóbulo esquerdo identificado como LE2 foi conservado em solução de paraformaldeído 4%. Após inclusão em parafina, cortes do tecido foram feitos em micrótomo e corados por Hematoxilina-Eosina (HE). As análises das lâminas foram realizadas por microscopista experiente através de ensaio cego, pois o microscopista desconhece a identificação das amostras. Baseado na análise das lâminas, o microscopista selecionou lâminas de referência que serviram para padronizar as características representativas do grau dos danos nos pulmões a serem avaliados (Tabela 1).

<b>Brônquios</b>	<b>Espessamento</b>	<b>e/ou infiltrado</b>	<b>e/ou oclusão</b>
0	Não apresenta	Não apresenta	Não apresenta
1	Discreto (1-3x)	Discreto (<25%)	Discreto (<25%)
2	Moderado (4-6x)	Moderado (25-50%)	Moderado (25-50%)
3	Intenso (>7%)	Intenso (>50%)	Intenso (>50%)
<b>Pleura</b>	<b>Espessamento</b>	<b>e/ou infiltrado</b>	<b>e/ou oclusão</b>
0	Não apresenta	Não apresenta	Não apresenta
1	Discreto (1-3x)	Discreto (<25%)	Discreto (<25%)
2	Moderado (4-6x)	Moderado (25-50%)	Moderado (25-50%)
3	Intenso (>7%)	Intenso (>50%)	Intenso (>50%)
<b>Vasos</b>	<b>Espessamento</b>	<b>e/ou infiltrado</b>	<b>e/ou oclusão</b>
0	Não apresenta	Não apresenta	Não apresenta
1	Discreto (1-3x)	Discreto (<25%)	Discreto (<25%)
2	Moderado (4-6x)	Moderado (25-50%)	Moderado (25-50%)
3	Intenso (>7%)	Intenso (>50%)	Intenso (>50%)
<b>Alvéolo</b>	<b>Edema</b>	<b>Infiltrado inflamatório</b>	<b>Espessamento</b>
0	Não apresenta	Poucos leucócitos	Não apresenta
1	Discreto (1-3x)	Discreto	Discreto (1-3x)
2	Moderado (4-6x)	Moderado	Moderado (4-6x)
3	Intenso (>7%)	Intenso	Intenso (>7%)
<b>Gravidade</b>	<b>Hemorragia</b>	<b>Atelectasia</b>	<b>Necrose</b>
0	Não apresenta	Não apresenta	Não apresenta
1	Discreto	Discreto	Discreto
2	Moderado	Moderado	Moderado
3	Intenso	Intenso	Intenso

**Tabela 1: Critérios utilizados para avaliação das lâminas (score histopatológico).** Lâminas de tecido corado com HE foram confeccionadas e avaliadas de acordo com os critérios contidos nesta tabela. Os números e as percentagens indicam o grau de acometimento do pulmão de acordo com cada característica.



#### **4.7. Extração de RNA do pulmão**

As amostras de pulmão foram pesadas e a cada 50 mg foi adicionado 1mL de Trizol (Life Technologies). Em seguida a mistura foi incubada a temperatura ambiente por cinco minutos para permitir a completa dissociação do complexo nucleoproteico. Após esse período, adicionou-se 200 µl de clorofórmio seguido de agitação manual por 15 segundos e incubação por três minutos a temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados 12000 g durante 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi removida e colocada em um tubo novo para isolamento do RNA. A precipitação do RNA foi realizada pela adição de 500 µl de isopropanol na fase aquosa e incubação a temperatura ambiente por 10 minutos. Logo após a mistura foi centrifugada a 12000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante removido, restando o RNA no fundo do recipiente. O RNA foi lavado incluindo 1ml de etanol a 75% e após agitação vigorosa a amostra foi centrifugada a 7500 g por cinco minutos a 4°C. Finalmente, descartamos o sobrenadante, deixamos o etanol residual evaporar a temperatura ambiente e ressuspendemos o RNA em água livre de RNase.

#### **4.8. Síntese de cDNA**

Utilizamos 1 µg de RNA previamente purificado e quantificado para síntese de cDNA. Para tanto o RNA foi incubado durante 30 minutos a 37°C acrescido de 2U da enzima RQ1 DNase (Promega), 2 uL do tampão da enzima (400mM Tris-HCl pH 8,0, 100mM MgSO<sub>4</sub>, 10mM CaCl<sub>2</sub>) e água livre de RNase e DNase (Life Technologies) em um volume final de 20 µL. Uma segunda incubação foi realizada a 65°C por 10 minutos após adição de 2 µL da solução de parada. Posteriormente foi adicionado 2 µL do iniciador Oligo dT (10 mM) e 2 µL da solução de dNTPs (10 mM). As amostras foram mantidas durante 2 minutos a 65°C por 2 minutos e então colocadas no gelo. Foi acrescentado 8 µL de tampão da transcriptase reversa concentrado 5x (TRIS-HCl 250 mM, KCl 375 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM, DTT 50mM, pH 8,0) e a amostra foi exposta por 2 minutos a 42°C. Por fim, a enzima M-MLV transcriptase reversa (Promega) foi adicionada e a incubação final da mistura foi a 42°C por 50 minutos e a inativação da enzima a 70°C, 15 minutos.

#### **4.9. qPCR**

O cDNA foi diluído previamente sintetizado 5 vezes com água livre de pirógenos e nucleases. Em uma placa branca de 96 poços foi adicionado: 25 $\mu$ L do reagente Power SYBR Green PCR Máster Mix (Life Technologies), 200nM de iniciadores específicos para cada gene e água em quantidade suficiente para volume final de 15  $\mu$ L por poço. Por último, adicionamos 5  $\mu$ L do cDNA. A eficiência dos primers foi avaliada através de uma curva padrão de algumas amostras sabidamente positivas. Para tanto, cada primer de interesse utilizado foi comparado com primers referentes ao gene constitutivo GAPDH. A reação foi realizada no aparelho 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems). As curvas de dissociação foram analisadas para verificarmos a especificidade das amplificações. Através do software Q-Gene, foi calculado a eficiência dos iniciadores e a expressão relativa dos genes alvo. Os valores gerados foram ainda analisados no software GraphPad Prism v.5 a fim de definir as diferenças de expressão.

<b>Iniciadores</b>	<b>Sequência 5'→3</b>
GAPDH Fwd	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
GAPDH Rev	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
CCL2 Fwd	TGGCTCAGCCAGATGCAGT
CCL2 Rev	TTGGGATCATCTTGCTGGTG
CCL3 Fwd	TTCTCTGTACCATGACACTCTGC
CCL3 Rev	CGTGGAATCTTCCGGCTGTAG
CCL4 Fwd	TCTTGCTCGTGGCTGCCT
CCL4 Rev	GGGAGGGTCAGAGCCCA
CCL5 Fwd	CAAGTGCTCCAATCTTGCAATC
CCL5 Rev	TTCTCTGGGTTGGCACACAC
CCL17 Fwd	CAGGGATGCCATCGTGTTTC
CCL17 Rev	CACCAATCTGATGGCCTTCTT
CCL22 Fwd	TACATCCGTCACCCTCTGCC
CCL22 Rev	CGGTTATCAAACAACGCCAG
CXCL9 Fwd	AATGCACGATGCTCCTGCA
CXCL9 Rev	GGTCTTTGAGGGATTTGTAGTG
CXCL10 Fwd	GCCGTCATTTTCTGCCTCA
CXCL10 Rev	CGTCCTTGCGAGAGGGATC

**Tabela 2: Lista de oligonucleotídeos.** A esquerda da tabela estão os nomes dos genes relativos aos seus iniciadores. A direita encontram-se as sequências de oligonucleotídeos sintetizadas. (Rev= reverse, Fwd= forward).

#### **4.10. Avaliação dos níveis de citocinas e quimiocinas por CBA**

A quantificação das citocinas IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12 e CCL2 no soro ou no sobrenadante do homogenato pulmonar foi realizada por citometria de fluxo utilizando o kit *Cytometric Bead Array* (CBA – BD Pharmingen) de acordo com recomendação do fabricante. Este kit emprega uma mistura de esferas de poliestireno, de intensidades de fluorescência distintas, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas de interesse. Foi adicionado 50  $\mu$ L da mistura de esferas de captura para cada amostra a ser testada. As amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos para retirar restos de células mortas e outras sujeiras da amostra. Logo após, 50  $\mu$ L das amostras foram misturadas com as esferas de captura nos seus devidos poços previamente desenhados e foi adicionado também 50  $\mu$ L do reagente de detecção. As misturas foram incubadas por 120 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após a incubação, a mistura foi lavada por duas vezes com 150 $\mu$ L da solução tampão (PBS) e centrifugadas a 1.800 rpm, por 5 minutos e o sobrenadante descartado em seguida. Foi adicionado 200  $\mu$ L de solução tampão para suspensão das esferas e a leitura foi realizada no citômetro. Para cada amostra processada foram adquiridos 1.800 eventos dentro de região pré-estabelecida (300 eventos por parâmetro testado). Os níveis de citocinas foram calculados pelo software FCAP Array (BDPharmingen).

#### **4.11. Análise estatística**

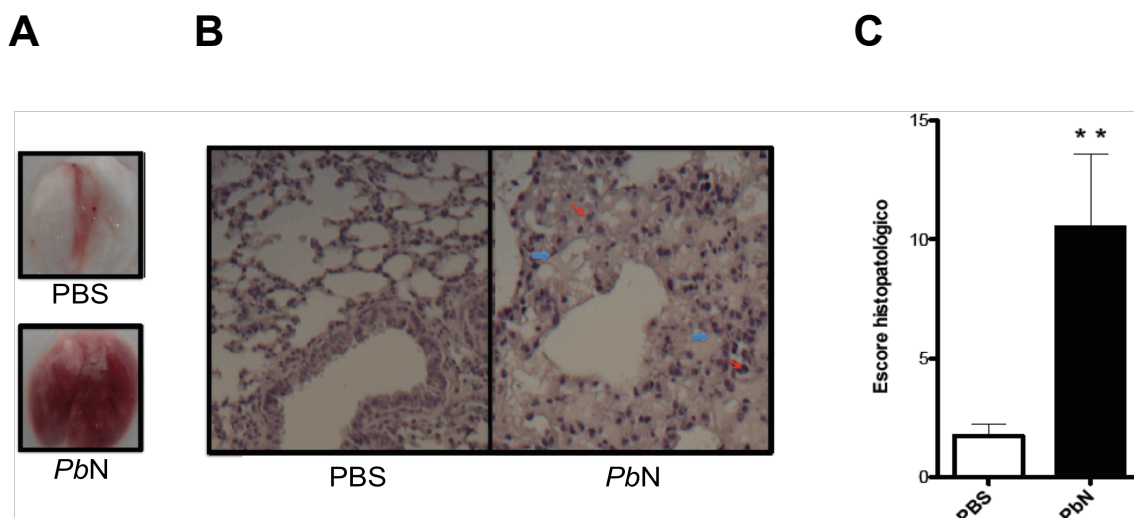
O software *GraphPad Prism v.5* foi utilizado para a confecção dos gráficos e análise estatística de todos os dados. O teste t não pareado foi utilizado para analisar dados contendo apenas dois grupos a serem comparados. O ANOVA foi utilizado para os cálculos estatísticos que envolveram mais de dois grupos. Para validar a análise utilizamos o pós teste de Tukey para os dados paramétricos, para os não paramétricos utilizamos o teste de Kruskal-walli.

## 5. Resultados

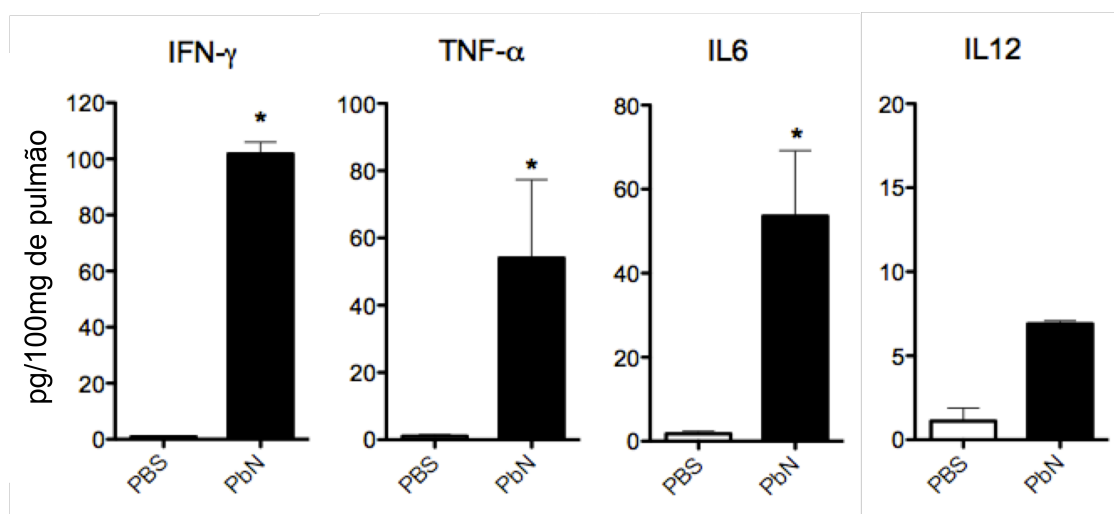
---

### 5.1. Caracterização do modelo de MA-ALI/ARDS

Primeiramente, testamos o modelo em nosso laboratório. Para tanto, infectamos camundongos C57BL/6 com *PbN* e retiramos os pulmões destes camundongos 9 dias após a infecção. A análise da alteração pulmonar foi iniciada pela comparação macroscópica de pulmões previamente perfundidos com PBS (Figura 8A). Foi observada a presença de edema nos animais com malária o que nos levou a análise morfológica mais aprofundada em cortes histológicos corados por HE (Figura 8B). Em um ensaio cego, as lâminas foram categorizadas seguindo um escore histopatológico definido previamente. O gráfico de escore histopatológico mostra que os camundongos infectados por *PbN* sofrem lesões no pulmão, consequência do infiltrado de elementos do sangue (Figura 8C) corroborando com o indicado na análise macroscópica inicial do tecido. Algumas citocinas também foram quantificadas por CBA a fim de correlacionar a lesão pulmonar com o perfil pró-inflamatório no soro de camundongos infectados por *PbN* (Figura 8D).



D



**Figura 8: Caracterização do modelo de MA-ALI/ARDS.** (A) Exame macroscópico (fotos a esquerda) e lâminas contendo cortes histológicos de pulmão (fotos a direita) oriundos de camundongos C57BL/6 e CCR4<sup>-/-</sup> infectados por *PbN*. (B) Fotografia de lâminas de pulmão coradas por HE (C) Escore histopatológico baseado no infiltrado inflamatório, formação de edema e estado estrutural de microestruturas do pulmão dos camundongos (D) Gráficos representando as citocinas pró-inflamatórias presentes em camundongos selvagens infectados por *PbN* e não-infectados. Figura representativa de dois experimentos realizados de maneira independente e apresentando resultados similares (n=3-4/grupo).

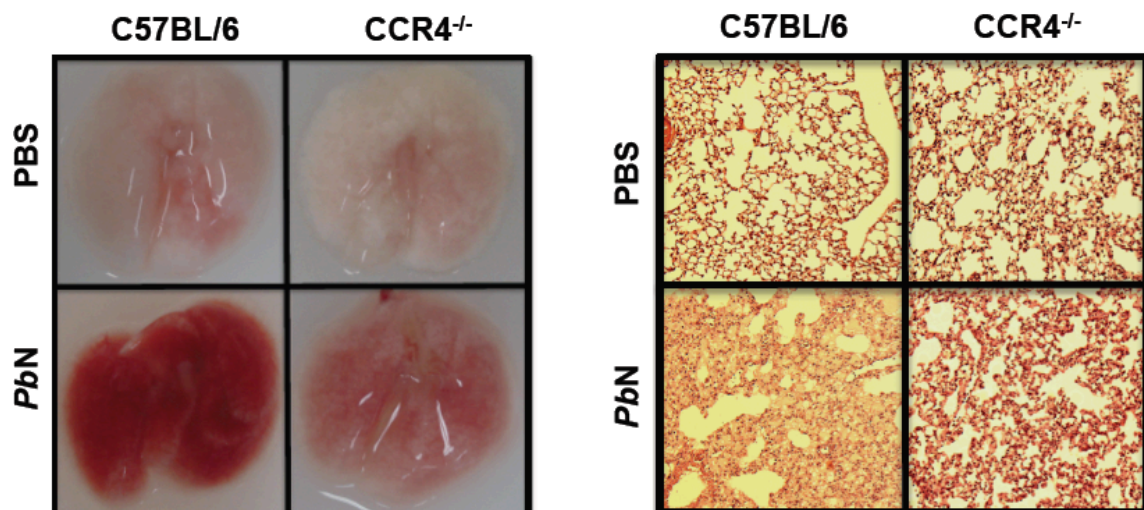
## 5.2. Caracterização da infecção por *PbN* em camundongos CCR4<sup>-/-</sup>

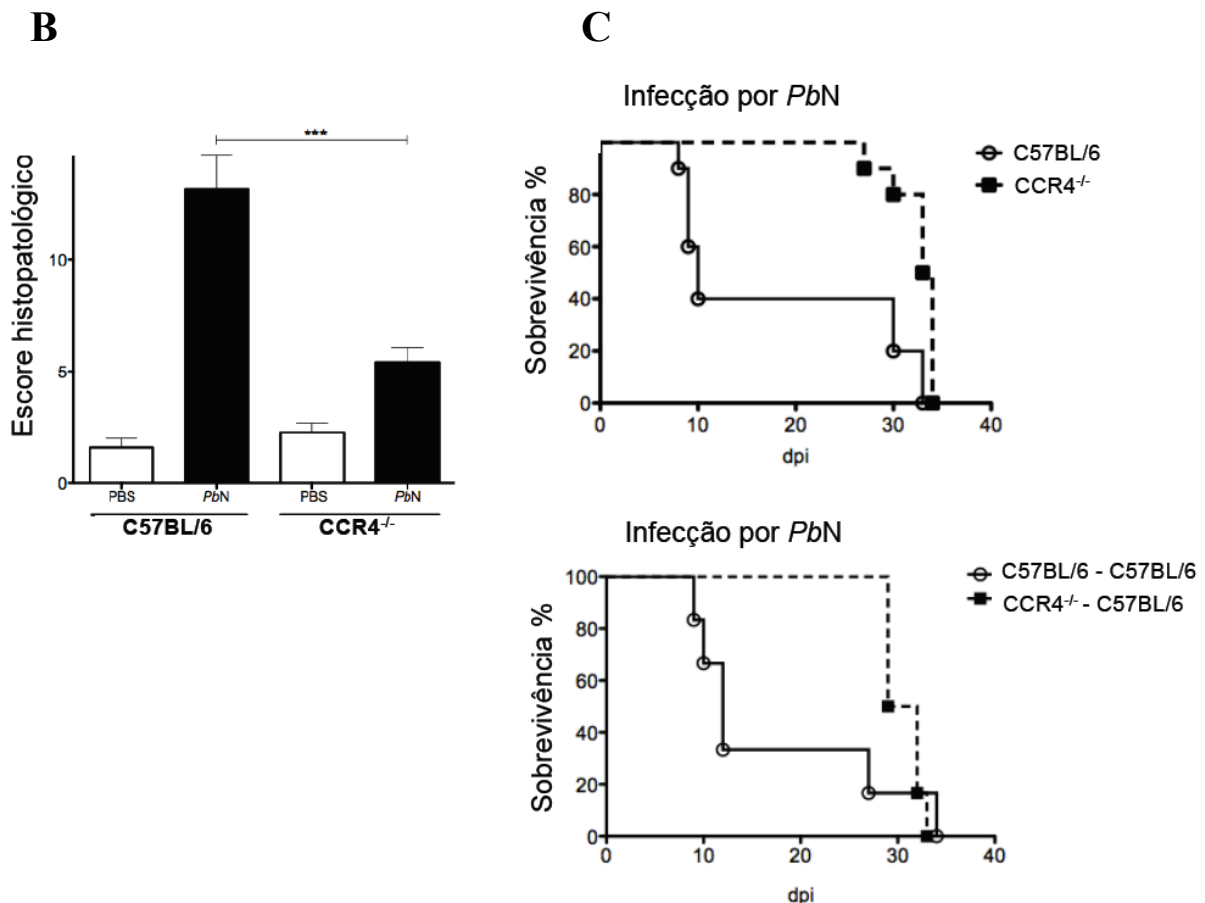
Infectamos camundongos CCR4 nocaute a fim de observar a interferência deste receptor de quimiocina na indução da MA-ALI/ARDS. Assim, como caracterizado anteriormente, camundongos C57BL/6 infectados com *PbN* apresentou edema nos pulmões, enquanto os camundongos deficientes para CCR4 não desenvolveram lesões significativas (Figura 9A). Realizamos ainda a análise de cortes histológicos e categorizamos as lâminas de acordo com o escore histopatológico definido neste trabalho. Os principais critérios avaliados foram a presença de edema e infiltrado de leucócitos a nível dos bronquios, pleura, vasos sanguíneos e alvéolos (Tabela 1). De acordo com a gravidade de cada aspecto avaliado montamos um score histopatológico (Figura 9B). Além disso, avaliamos a sobrevivência dos animais infectados e observamos que cerca de 60% dos camundongos selvagens morreram até 12 dias após a

infecção, enquanto os camundongos CCR4<sup>-/-</sup> sobreviveram durante este período.

Com o objetivo de verificar se o papel de CCR4 dependia de células hematopoéticas ou não-hematopoéticas, depletamos células hematopoéticas de camundongos C57BL/6 e repopulamos estes camundongos com células de medula óssea provenientes de camundongos selvagens ou nocautes para CCR4. Os camundongos que receberam transferência adotiva de camundongos C57BL/6 mostraram-se susceptíveis, sendo que cerca de 60% destes morreram. Já os camundongos que receberam células de medula provenientes de camundongos CCR4 nocaute, sobreviveram durante o período avaliado quanto ao desenvolvimento da síndrome respiratória (Figura 9C). Já os camundongos que receberam células de medula provenientes de camundongos CCR4 nocaute sobreviveram durante o período de 12 dias, o qual utilizamos como parâmetro para o desenvolvimento da síndrome respiratória. Após este período os camundongos morrem por volta de 25-30 dias devido a carga parasitária no sangue.

A





**Figura 9: Avaliação da MA-ALI/ARDS em camundongos CCR4 nocaute. (A)** Exame macroscópico (fotos a esquerda) e lâminas contendo cortes histológicos de pulmão (fotos a direita) oriundos de camundongos C57BL/6 e CCR4<sup>-/-</sup> infectados por *Pbn*. **(B)** Escore histopatológico baseado no infiltrado inflamatório, formação de edema e estado estrutural de microestruturas do pulmão dos camundongos. **(C)** Gráficos de sobrevivência dos camundongos C57BL/6 e CCR4<sup>-/-</sup> infectados (superior) e sobrevivência de camundongos C57BL/6 irradiados e reconstituídos com células de medula óssea provenientes de camundongos selvagens ou CCR4<sup>-/-</sup> (inferior). Figura representativa de dois experimentos realizados de maneira independente e apresentando resultados similares (n=4-6/grupo).

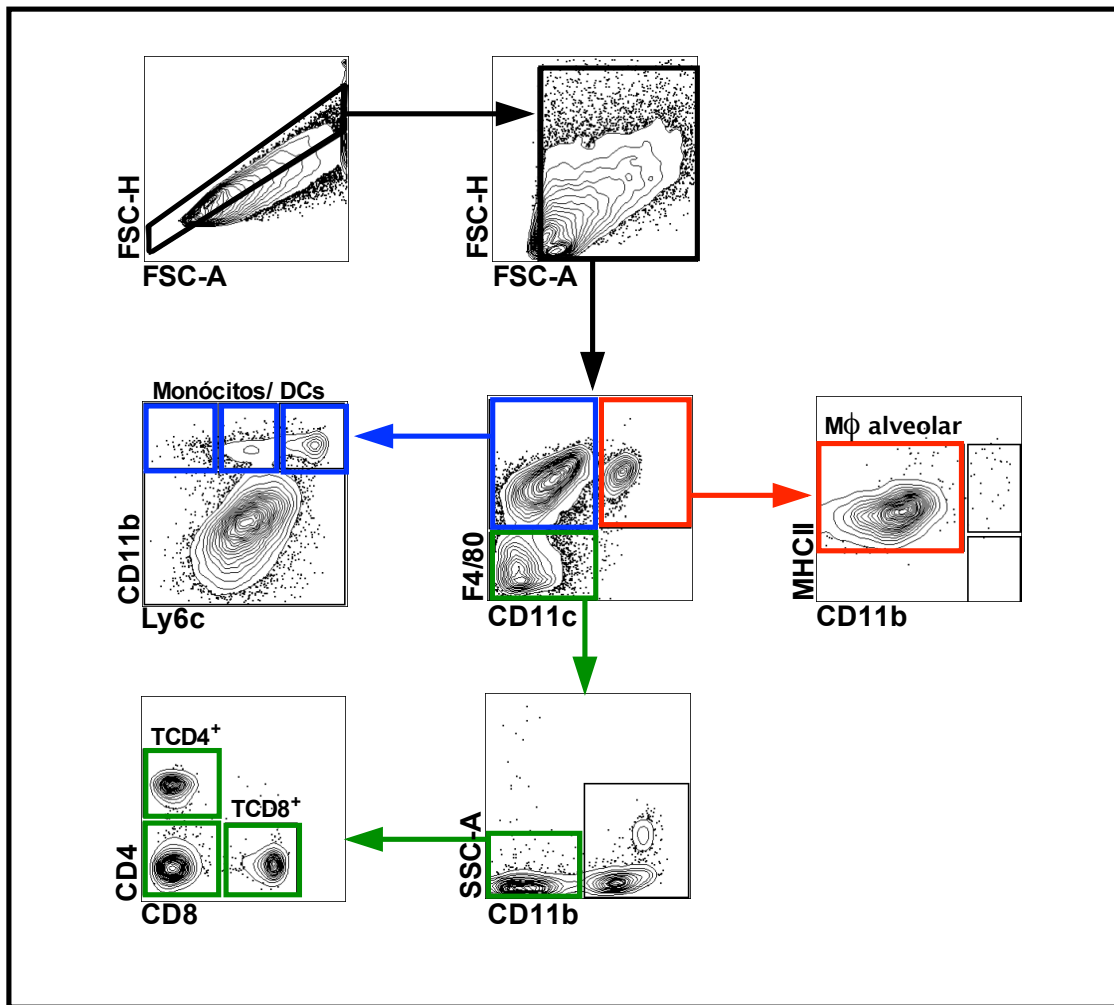
### 5.3. Caracterização das populações celulares no pulmão

A caracterização de populações de leucócitos no pulmão de camundongos tem sido descrita, mas trata-se de um trabalho ainda complexo, principalmente devido as diferentes populações de células mielóides presentes neste órgão. Macrófagos alveolares são positivos para ambos os marcadores de macrófago F4/80 e de dendríticas CD11c, macrófagos intersticiais (iMS) expressam F4/80, mas não CD11c e outras populações ainda necessitam ser bem definidas (BEDORET et al., 2009). Este é o caso também para diferenciar monócitos de macrófagos, já que os primeiros não devem expressar, ou



expressam baixos níveis de MHCII e os monócitos inflamatórios expressam Ly6C (MISHARIN et al., 2013).

Nossa estratégia de seleção foi iniciada pela exclusão dos “doublets”, através da análise dos parâmetros FSC-H x FSC-A. Os “doublets” fazem referência às células que não estão isoladas, mas passam junto de outras nos sensores do citômetro de fluxo. Em seguida a seleção das populações foi baseada no tamanho e granulosidade das células que pode ser identificado pela relação entre os parâmetros FSC-A e SSC-A. Então selecionamos células  $F4/80^+CD11c^{hi}CD11b^-MHCII^+$  que indica tratar-se de macrófagos alveolares. O restante da população  $F4/80^+$  foi usada para selecionar as células  $CD11b^{hi}$ , sendo que dentro desta população encontramos células com diferentes expressões de Ly6C na superfície. Além disso, estas últimas foram marcadas também com CD11c e CD209 (DCsign) a fim de identificar as células que poderiam ser dendríticas diferenciadas de monócitos. Dentro da seleção de células  $F4/80^-$ , foram ainda distinguidas as células  $CD11b^-$  e estas foram separadas em células  $CD4^+$  e células  $CD8^+$  (Figura 10). Em alguns experimentos também utilizamos marcadores de linfócitos B, células NK ou neutrófilos.



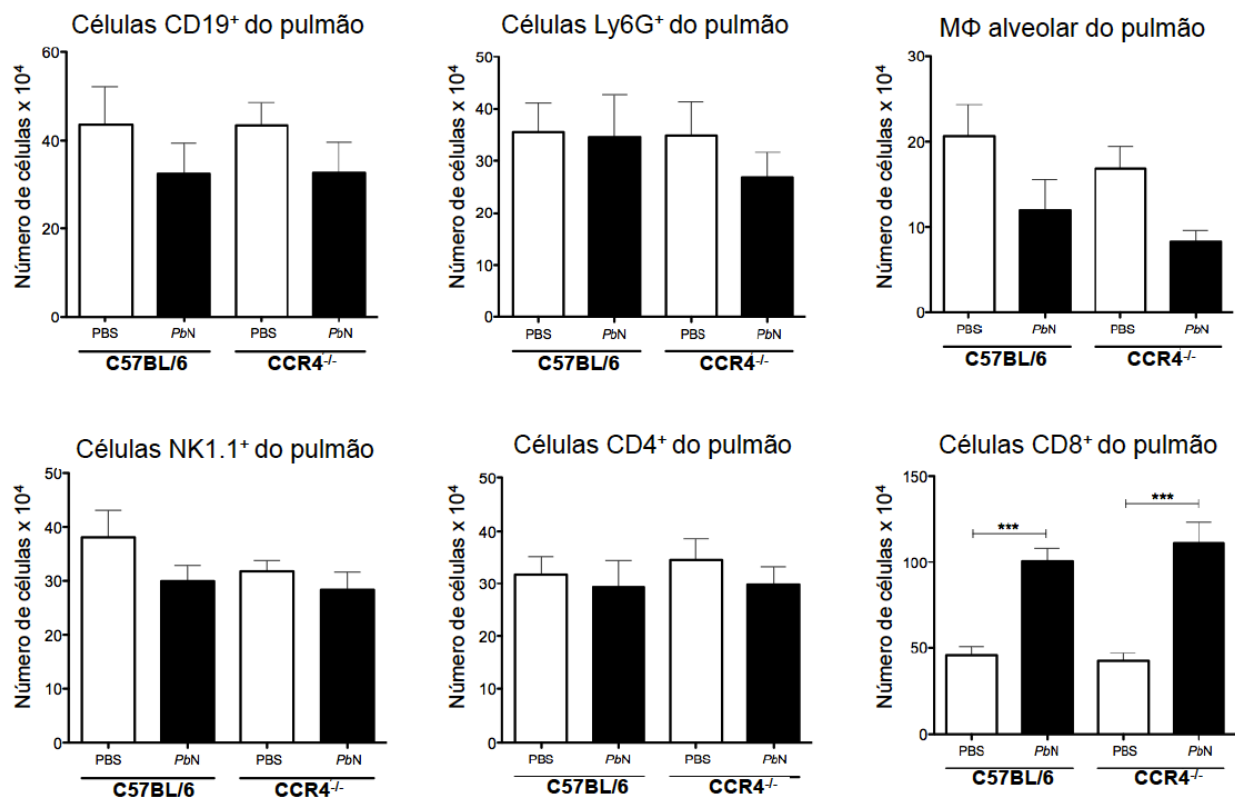
**Figura 10: Estratégia de gate para análise de leucócitos no pulmão.** As populações celulares foram primeiro selecionadas pela eliminação dos “doublets” e quanto ao tamanho e granulosidade de leucócitos. Em seguida, as seguintes populações foram caracterizadas:  $F4/80^+CD11b^+$  para monócitos/macrófagos/MO/DCs.  $F4/80^+CD11b^-CD8^+$  para células  $CD8^+$  ou  $F4/80^-CD11b^-CD4^+$  para células  $CD4^+$ . Os macrófagos alveolares foram caracterizados pelo fenótipo  $F4/80^+CD11c^{hi}MHCII^+CD11b^-$ . Figura representativa de dois experimentos realizados de maneira independente e apresentando resultados similares (n=4/grupo).

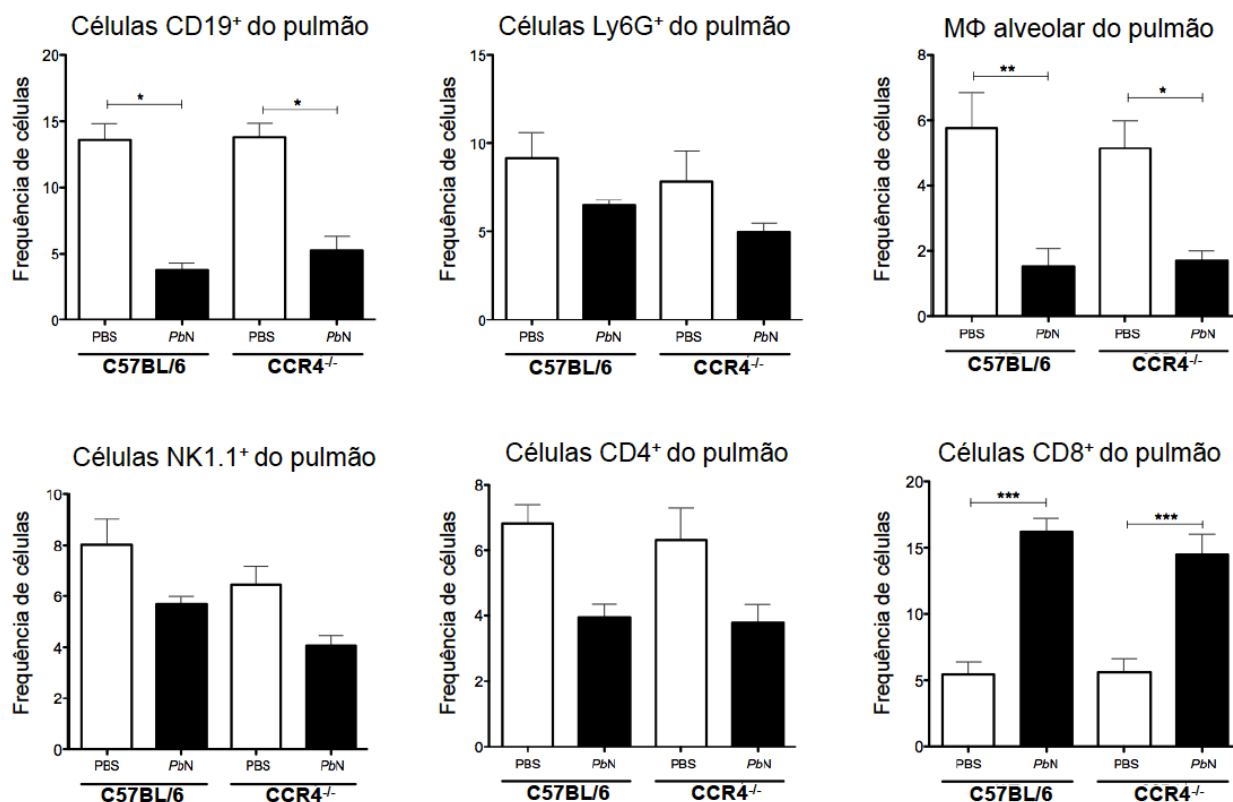
#### 5.4. Avaliação da flutuação de leucócitos no pulmão de camundongos infectados

Avaliamos diversas populações celulares presentes no pulmão de camundongos infectados e não infectados a fim de determinar quais células exógenas participariam da patogênese na MA-ALI/ARDS. Para tanto, consideramos células B ( $F4/80^-CD11b^-CD19^+$ ), neutrófilos ( $F4/80^-CD11b^+Ly6G^+$ ), macrófagos alveolares ( $F4/80^+CD11b^-CD11c^+$ ), células

natural killer (F4/80<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>NK1.1<sup>+</sup>), células T helper (F4/80<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>), células T citotóxicas (F4/80<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) e células de origem monocítica (F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup>). Observamos o aumento de células CD8<sup>+</sup> e F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> nos animais infectados por *PbN*, enquanto nenhuma diferença foi observada no número de células CD4<sup>+</sup>, neutrófilos, células NK ou células B (Figura 11A e 11B).

**A**

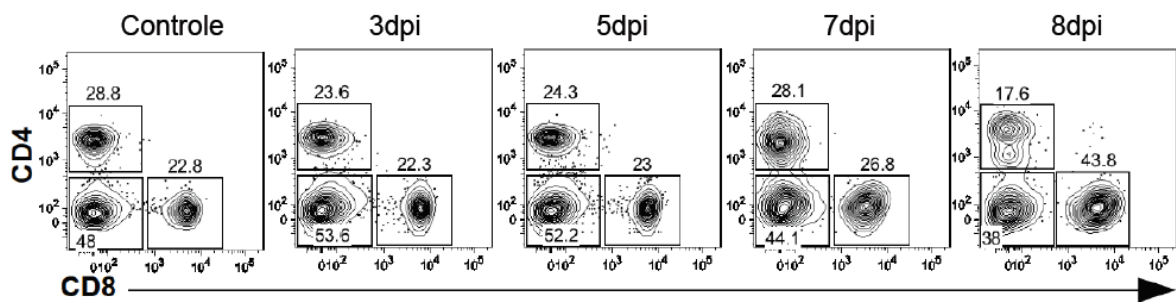
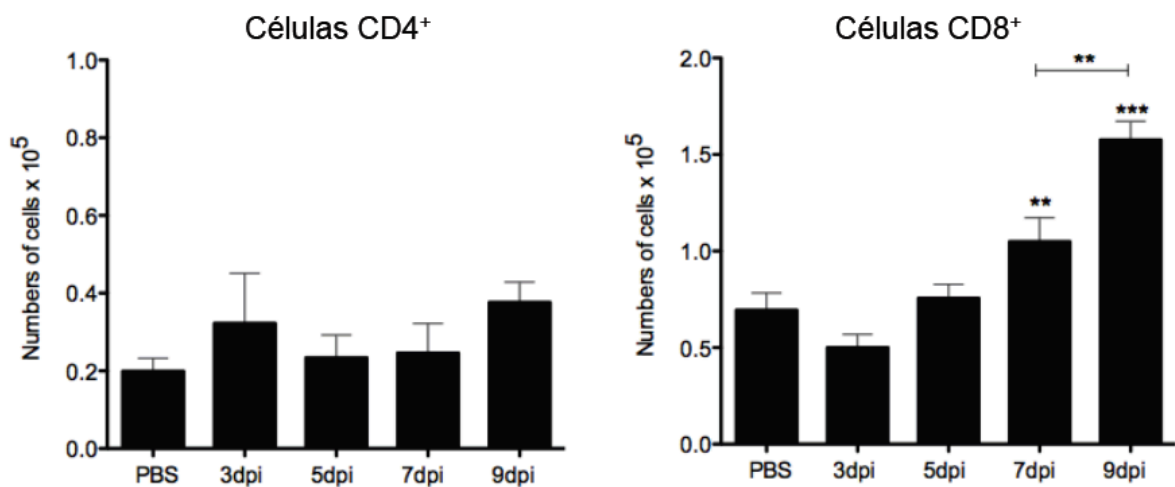


**B**

**Figura 11: Migração de células para o pulmão.** O número total e a frequência de alguns leucócitos foram investigados por citometria de fluxo. A) Número total de células CD19<sup>+</sup>, Ly6G<sup>+</sup>, Macrófagos alveolares, Nk1.1<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. B) Frequência de células CD19<sup>+</sup>, Ly6G<sup>+</sup>, Macrófagos alveolares, Nk1.1<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Figura representativa de dois experimentos realizados de maneira independente e apresentando resultados similares (n=3-4/grupo).

### 5.5. Cinética de migração de células T durante a MA-ALI/ARDS

O perfil e a quantidade de leucócitos no pulmão dos camundongos C57BL/6 infectados por *PbN* foi avaliado nos dias três, cinco, sete e nove após a infecção para determinar o momento em que ocorreriam possíveis migrações de células para o órgão respiratório. Demonstramos que houve aumento na frequência e no número total de células CD8<sup>+</sup> nos pulmões de camundongos pelo *Plasmodium berghei* NK65 quando comparados aos não infectados a partir do sétimo dia pós infecção (Figura 12).

**A****B**

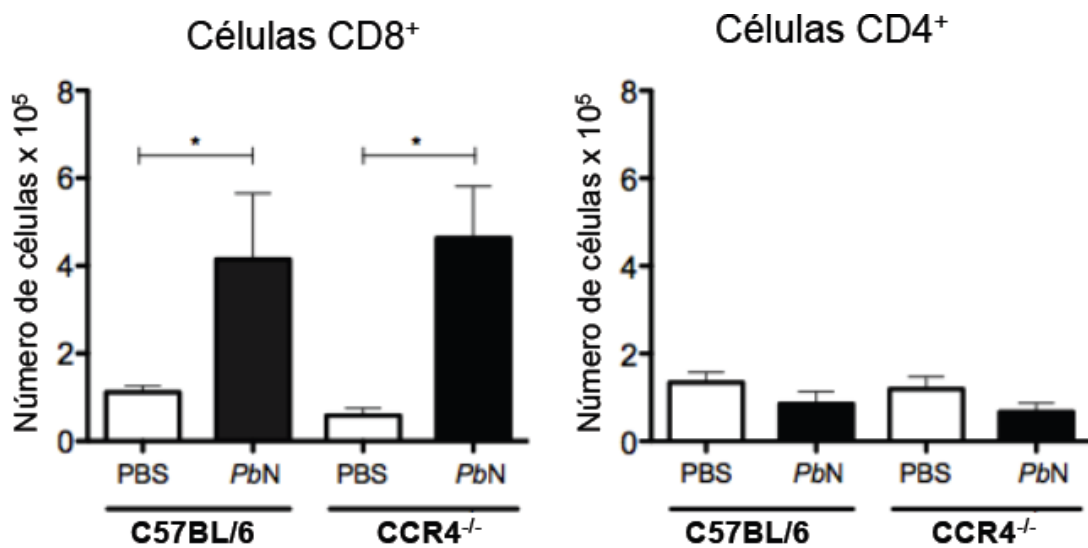
**Figura 12: Cinética de migração de células T.** A frequência e o número total de linfócitos no pulmão de camundongos selvagens foram investigados por marcação de células com anticorpos conjugados a fluorocromos e citometria de fluxo. **A)** Frequência de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. **B)** O número total de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Figura representativa de dois experimentos realizados de maneira independente e apresentando resultados similares (n=4-5/grupo).

### 5.6. Avaliação do papel do receptor de quimiocina CCR4 em células T durante a MA-ALI/ARDS

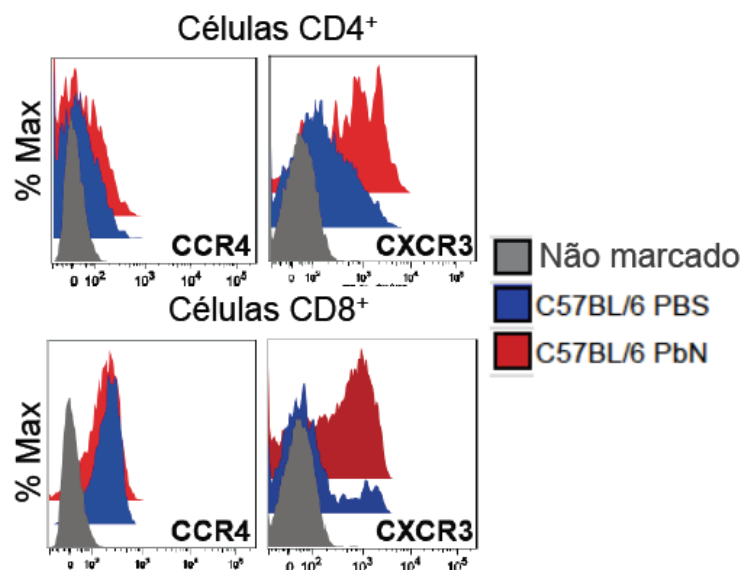
O próximo passo foi verificar o papel do receptor de quimiocina CCR4 no recrutamento de células T. Avaliamos a migração de células CD8<sup>+</sup> para o pulmão em camundongos C57BL/6 e camundongos CCR4<sup>-/-</sup> infectados por *PbN*. Não identificamos nenhuma diferença no número total destas células quando comparados os camundongos selvagens e nocautes (Figura 13A). Foi verificado, por citometria de fluxo, que as células CD8<sup>+</sup> expressam a molécula CCR4 em sua superfície de forma constitutiva e essa expressão

não varia após a infecção por *PbN*. Também verificamos a expressão de CXCR3 por citometria de fluxo nas células T CD8<sup>+</sup> que migraram para o pulmão durante a infecção (Figura 13B). O CXCR3 possui como ligantes as CXCL9 e CXCL10, principais quimiocinas envolvidas no recrutamento de linfócitos em respostas imunes cujo o perfil Th1 é predominante (GROOM et al., 2012). Portanto, acreditamos que o CXCR3 é um dos receptores responsáveis pela migração de células CD8<sup>+</sup> neste modelo.

**A**



**B**

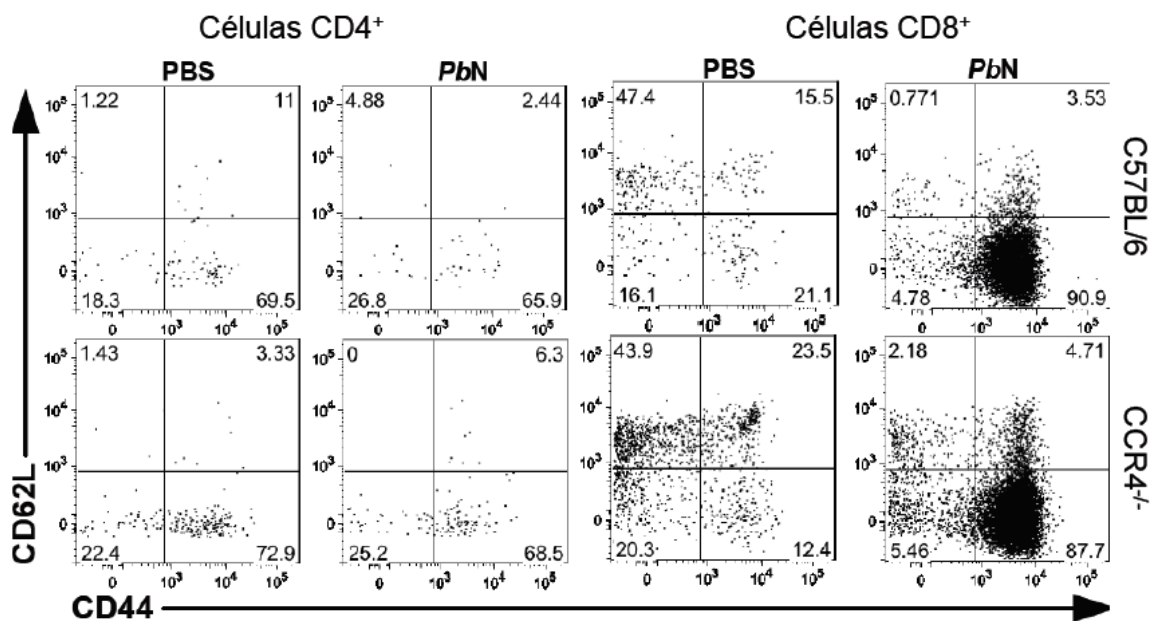


**Figura 13: Avaliação da influência de CCR4 na migração de células T para o pulmão.** Os camundongos C57BL/6 e CCR4<sup>-/-</sup> foram previamente infectados com *PbN* e os leucócitos foram extraídos para verificar alterações destes. **A)** Número

total de células CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> nos pulmões de camundongos selvagens e CCR4<sup>-/-</sup>. **B)** Histograma demonstrando a expressão de CXCR3 e CCR4 em células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de camundongos C57BL/6 infectados e não infectados. Figura representativa de dois experimentos realizados de maneira independente e apresentando resultados similares (n=3-4/grupo).

### 5.7. Estudo da interferência de CCR4 na ativação de células T

Devido às células CD8<sup>+</sup> expressarem o receptor CCR4, mas este não interferir com sua migração, procuramos avaliar se os sinais através do CCR4 poderiam interferir com a ativação de células CD8<sup>+</sup>. Para tanto, investigamos a expressão dos marcadores de ativação CD62L e CD44 na superfície de células T, especialmente interessados nas células CD8<sup>+</sup> cujo o aumento é evidente nos camundongos infectados pelo *PbN*. De fato, a falta de CCR4 não interferiu com a ativação das células CD8<sup>+</sup>, o que nos reforça a idéia que o papel de CCR4 na malária não está relacionado diretamente com as células T (Figura 14).

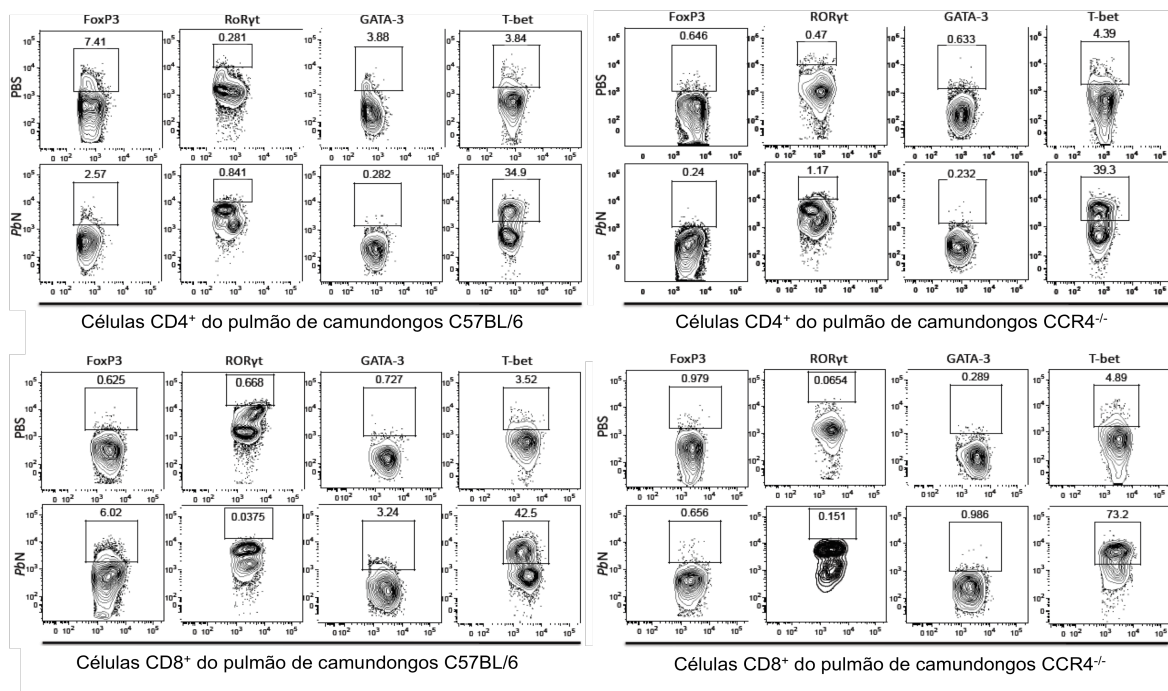


**Figura 14: Avaliação da ativação de células T durante a infecção pelo *PbN*.** A expressão de CD62L (eixo y) e CD44 (eixo x) em células CD4<sup>+</sup> (plots à esquerda) e CD8<sup>+</sup> (plots à direita) foram investigadas por citometria de fluxo em camundongos selvagens (acima) e CCR4<sup>-/-</sup> (abaixo) infectados ou não pelo *PbN*. Figura representativa de dois experimentos realizados de maneira independente e apresentando resultados similares (n=3-4/grupo).

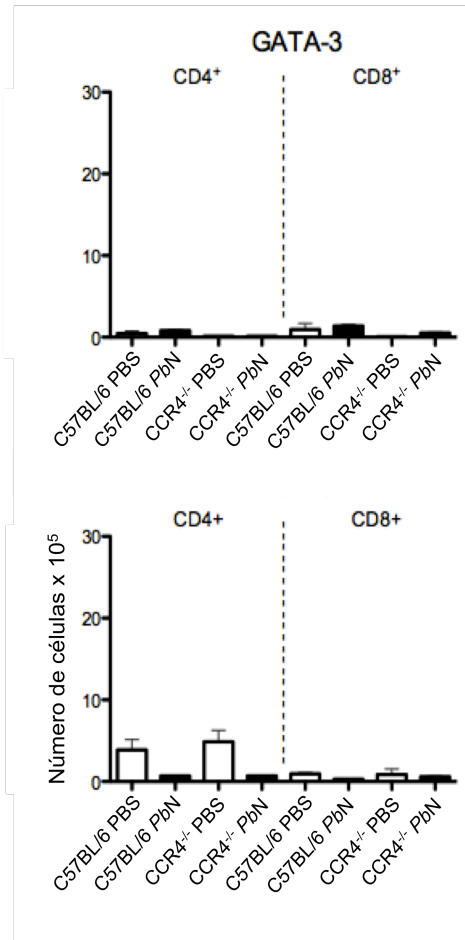
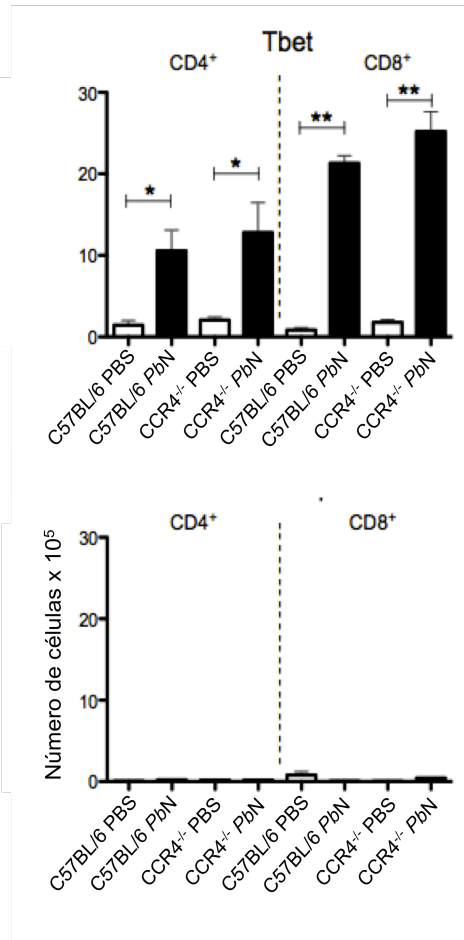
## 5.8. Avaliação dos fatores de transcrição relacionados a diferenciação e função efetora dos linfócitos Th

Devido o receptor de quimiocina CCR4 ser amplamente estudado em modelos cuja resposta imunológica tem perfil predominante Th2, decidimos avaliar por marcação intracelular e citometria de fluxo qual seria o perfil predominante das células T durante a MA-ALI/ARDS. Células T do pulmão e do baço de camundongos C57BL/6 e CCR4<sup>-/-</sup> infectados com *PbN* e não infectados foram utilizados nestes experimentos a fim de capturar possíveis diferenças no perfil de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Mostramos uma expressão predominante de Tbet nos linfócitos T no pulmão e no baço de camundongos previamente infectados com *PbN*. Todavia, não observamos mudanças consideráveis na expressão de GATA-3 e ROR- $\gamma$ T que caracterizam células Th2 e Th17, respectivamente. A frequência de células CD4<sup>+</sup> que expressam FoxP3 é reduzida em camundongos CCR4<sup>-/-</sup> quando comparado aos camundongos C57BL/6 (dot plots), todavia esta diferença independe da infecção por *PbN* e não reflete no número total de células FoxP3. (Figura 15A e 15B).

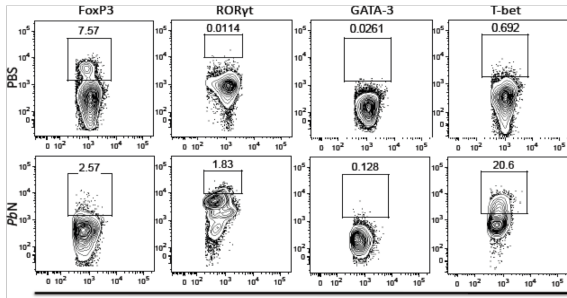
A



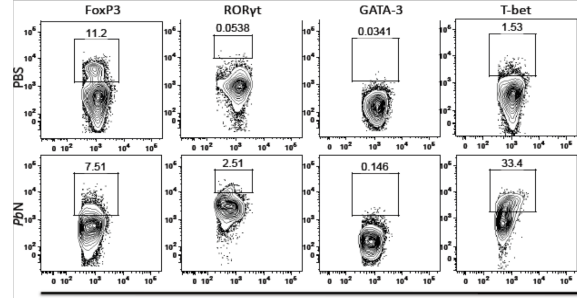




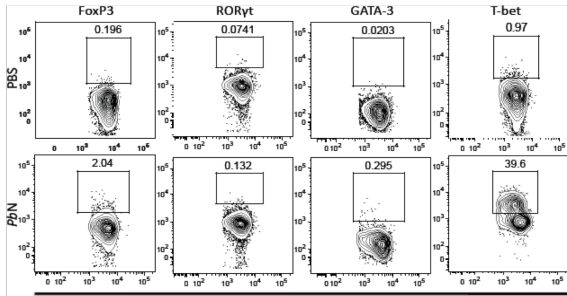
**B**



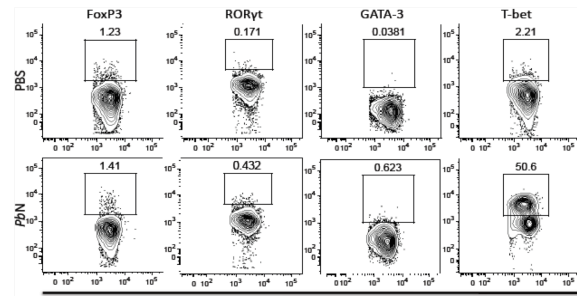
Células CD8<sup>+</sup> do pulmão de camundongos C57BL/6



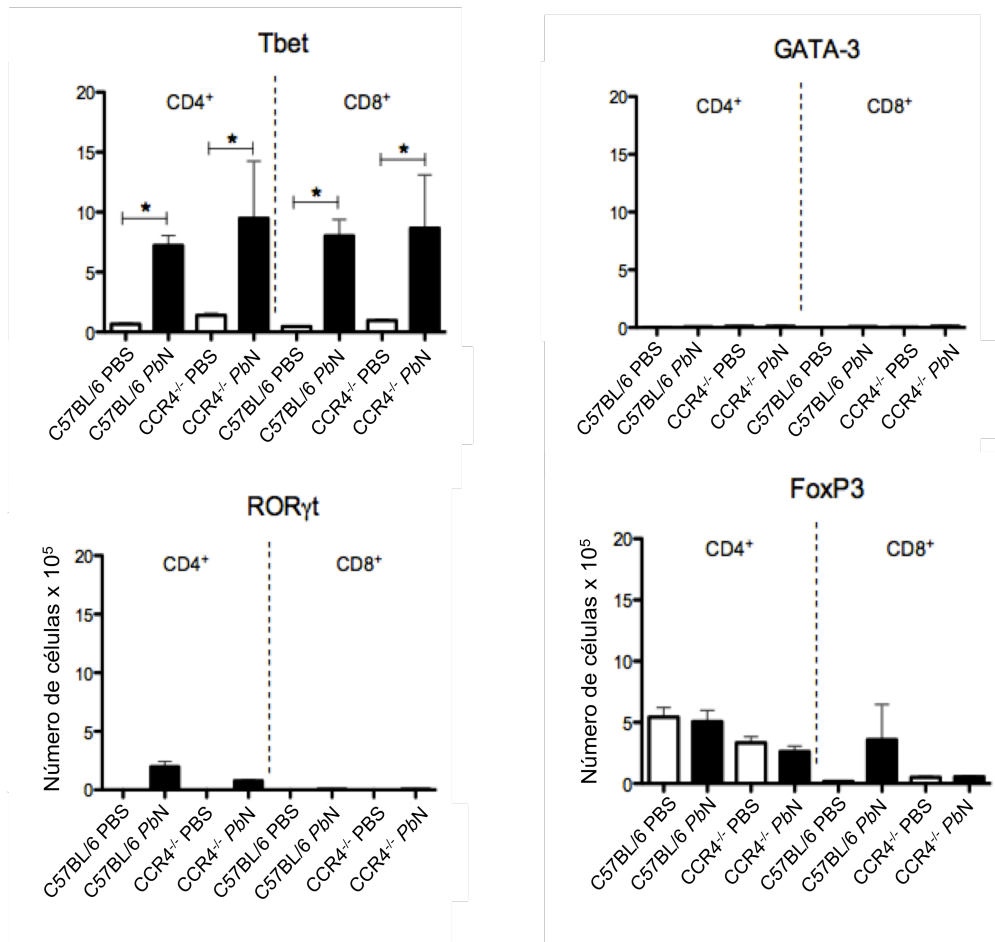
Células CD8<sup>+</sup> do pulmão de camundongos CCR4<sup>-/-</sup>



Células CD4<sup>+</sup> do baço de camundongos C57BL/6



Células CD4<sup>+</sup> do baço de camundongos CCR4<sup>-/-</sup>



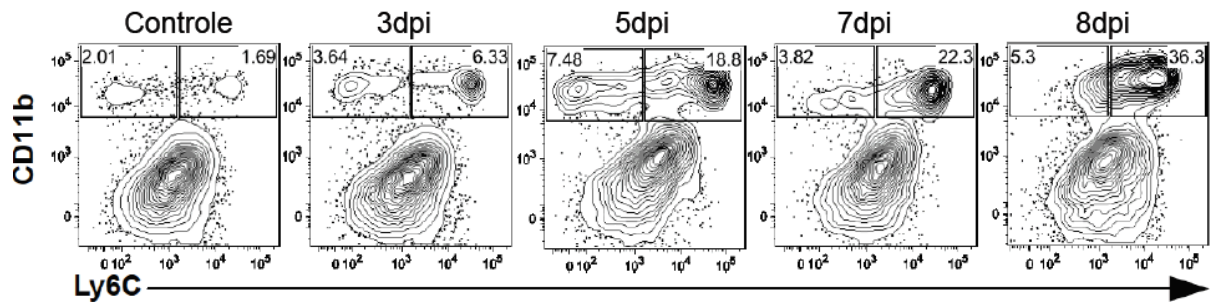
**Figura 15: O perfil Th1 é predominante no pulmão e baço durante a MA-ALI/ARDS.** A frequência e o número total de linfócitos expressando fatores de transcrição relacionados aos perfis imunológicos Th1, Th2, Th17 e regulador Treg foram investigados por citometria de fluxo. **(A)** Frequência (“Dot plots”) e número total (Gráficos de barras) de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> derivadas do pulmão expressando FoxP3, RORγt, GATA-3 ou Tbet. **(B)** Frequência (“Dot plots”) e número total (Gráficos de barras) de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> derivadas do baço expressando FoxP3, RORγt, GATA-3 ou Tbet. Todos os camundongos foram avaliados no dia 9 após receber PBS ou serem infectados pelo *PbN*. Figura representativa de dois experimentos realizados de maneira independente e apresentando resultados similares (n=4/grupo).

### 5.9. Avaliação da migração de células derivadas de monócitos para o pulmão

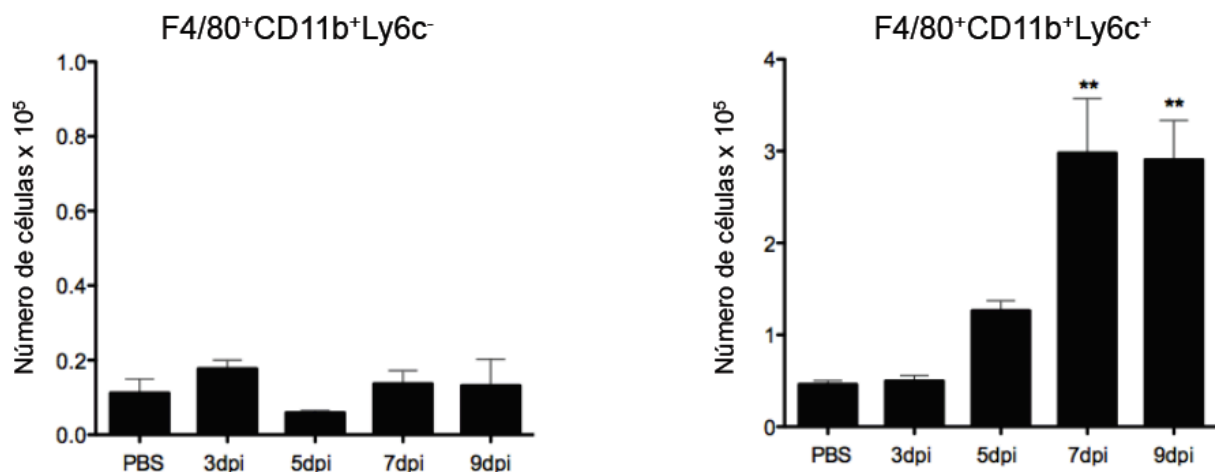
Uma vez identificado que o número de células CD8<sup>+</sup> aumentou no pulmão de camundongos infectados por *PbN* a partir do sétimo dia, decidimos verificar a cinética de migração dos monócitos. No caso das células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, somente as células que expressavam Ly6C foram capazes de migrar para o pulmão dos camundongos infectados. Essas

células  $F4/80^+CD11b^+Ly6C^+$  aumentaram em frequência a partir do quinto dia após a infecção, enquanto o número total aumentou a partir do sétimo dia (Figura 16A e 16B).

**A**



**B**



**Figura 16: Cinética de migração de células  $F4/80^+CD11b^+$  para o pulmão.** A frequência e o número total de monócitos foram investigados por citometria de fluxo. Os pulmões foram retirados nos dias 0, 3, 5, 7 e 9 após a infecção por *PbN*. **A)** Frequência de células  $F4/80^+CD11b^+$  demonstrando a expressão de Ly6C. **B)** Número total de células  $F4/80^+CD11b^+Ly6C^-$  e  $F4/80^+CD11b^+Ly6C^+$ . Figura representativa de dois experimentos realizados de maneira independente e apresentando resultados similares (n=4/grupo).

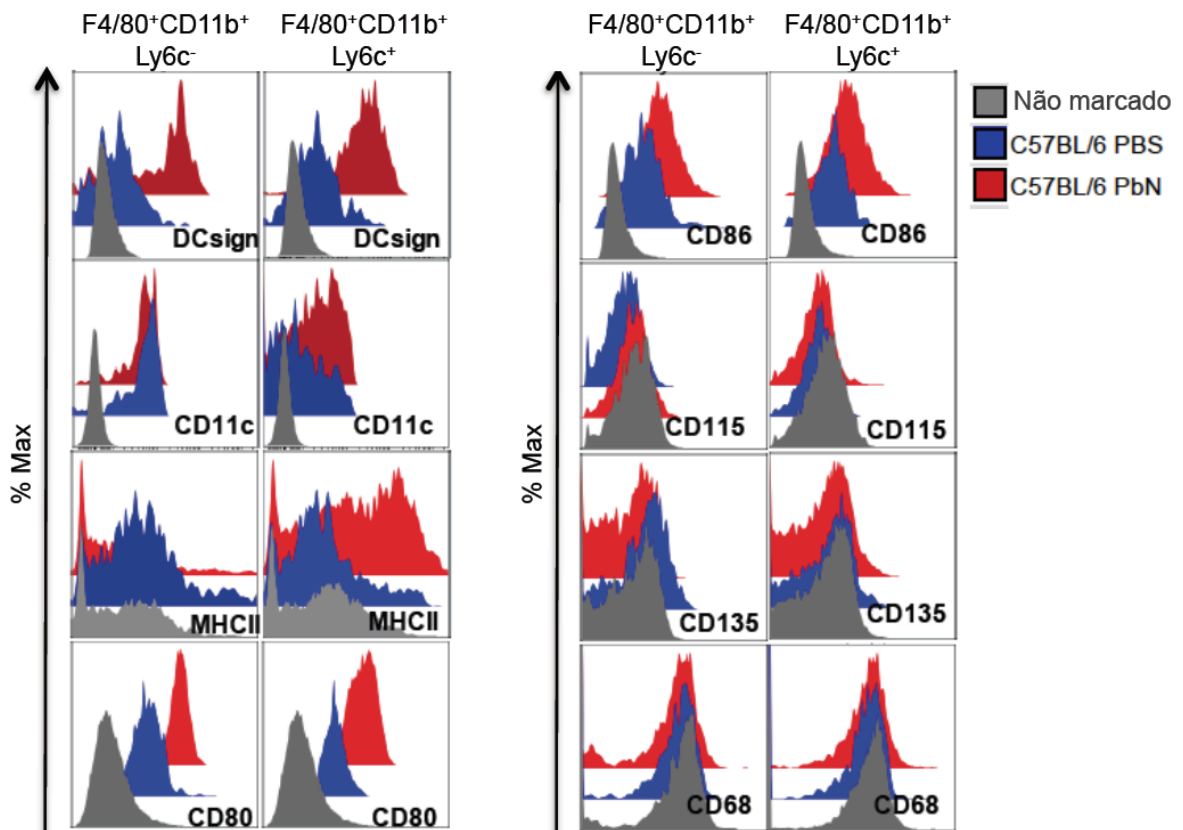
### 5.10. Identificação detalhada do fenótipo de células oriundas de monócitos

Avaliamos mais detalhadamente as células  $F4/80^+CD11b^+$  em duas populações distintas baseados na expressão da molécula Ly6C: (1)  $Ly6C^-$  e (2)  $Ly6C^+$ . Comparamos essas duas subpopulações em relação a expressão

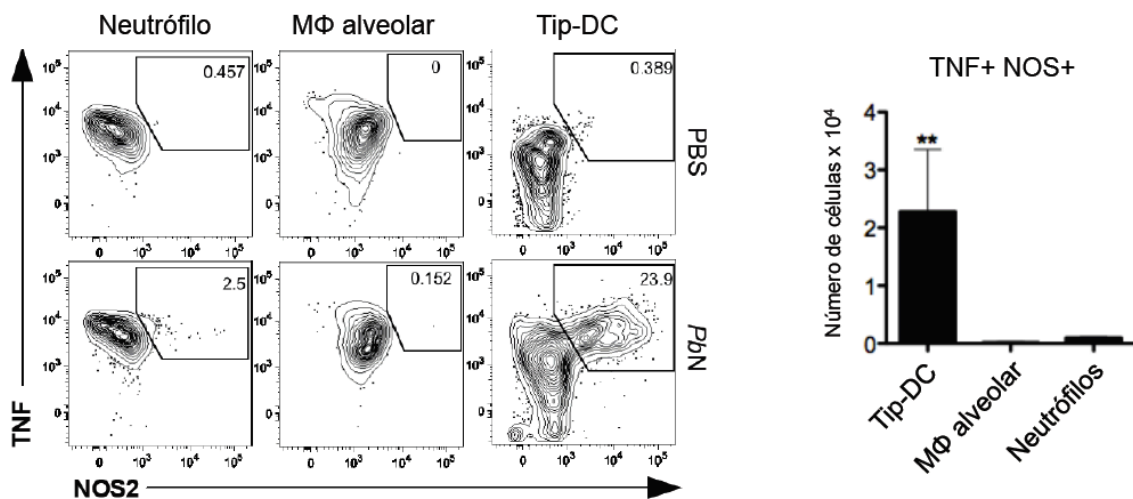
de CD209 (DCsign). Todas elas tiveram um aumento da expressão desta molécula no grupo desafiado com *PbN* em relação ao não infectado. Vimos que nos camundongos infectados ocorreu um aumento da expressão de CD11c, a molécula que melhor caracteriza células dendríticas, que neste caso, junto da expressão de DCsign indica células dendríticas derivadas de monócitos. O aumento da expressão da molécula MHCII nas células Ly6C<sup>+</sup> também foi evidente e corrobora com o perfil de MO-DCs. O mesmo foi verificado nestas subpopulações para a expressão das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 (Figura 17A). Algumas moléculas foram usadas para exclusão de células que não são de interesse para análise: o CD115 que é expresso em monócitos imaturos, o CD135 normalmente expresso em células dendríticas clássicas e o CD68 expresso em maiores níveis em macrófagos do que em monócitos (CHEONG et al., 2010; ASHLEY et al., 2011).

Em seguida pesquisamos a capacidade de algumas células mielóides presentes no pulmão produzirem TNF- $\alpha$  e NOS2 durante a infecção pelo *PbN*: neutrófilos, macrófagos alveolares e células derivadas de monócitos. Apesar de um pequeno aumento na frequência de neutrófilos e macrófagos alveolares produtores de TNF- $\alpha$  e NOS2 no pulmão de camundongos C57BL/6 infectados, a frequência e o número total de MO-DCs produtoras de TNF- $\alpha$  e NOS2 foi bastante evidente (Figura 17B).

A



B

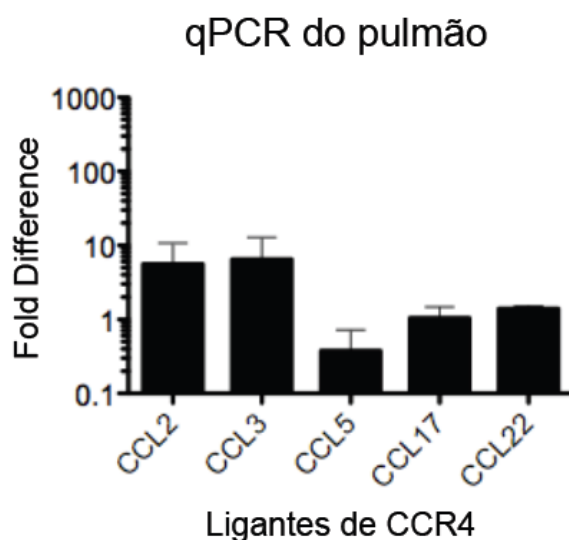


**Figura 17: Caracterização das células mielóides no pulmão de camundongos infectados com PbN.** Os pulmões de camundongos previamente infectados e controles foram extraídos e os leucócitos purificados, marcados com anticorpos ligados a fluorocromos para fenotipagem das subpopulações de células mielóides. **A)** Marcadores de ativação e indicadores de MO/DCs utilizados para caracterizar essas células. **B)** Verificação de células dendríticas derivadas de monócitos capazes de produzir TNF- $\alpha$  e NOS2 simultaneamente (Tip-DCs). Figura

representativa de dois experimentos realizados de maneira independente e apresentando resultados similares (n=5/grupo).

### 5.11. Determinação dos possíveis ligantes de CCR4 durante a malária causada pelo *PbN*

Retiramos os pulmões de camundongos C57BL/6 infectados e controles a fim de verificar quais possíveis ligantes de CCR4 estariam expressos após a infecção por *PbN*. Observamos que os genes de CCL17 e CCL22, considerados os principais ligantes de CCR4, não foram expressos nos pulmões dos camundongos infectados. Todavia foi observado o aumento na expressão dos genes que codificam as quimiocinas CCL2 e CCL3 (Figura 18).



**Figura 18: Expressão gênica dos possíveis ligantes de CCR4.** Os mRNAs do pulmão de camundongos previamente infectados e controles foram extraídos e convertidos em cDNA para fazer PCR. Figura representativa de dois experimentos realizados de maneira independente e apresentando resultados similares (n=3-4/grupo).

### 5.12. Avaliação da função de CCR2 e CCR4 na migração de Tip-DCs

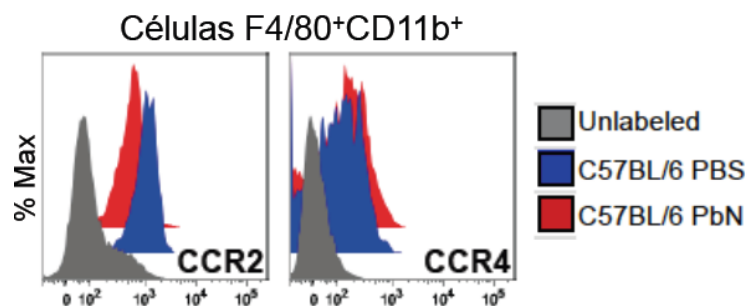
Nós infectamos camundongos CCR2 e CCR4 nocautes com *PbN* a fim de verificar a importância de monócitos inflamatórios na síndrome respiratória aguda causada pela malária. Primeiramente, avaliamos a expressão de CCR4 nas células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> por citometria de fluxo, a

qual foi confirmada, assim como a expressão de CCR2 (Figura 19A). Dado a importância de macrófagos alveolares em modelos de inflamação no pulmão também avaliamos a expressão de CCR4 nestas células (WANG et al., 2013; REECE; SIRACUSA; SCOTT, 2006) . Apesar do receptor CCR4 estar presente em macrófagos alveolares (F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>), não foi observada nenhuma alteração no número total destas células após a infecção (Figura 19B).

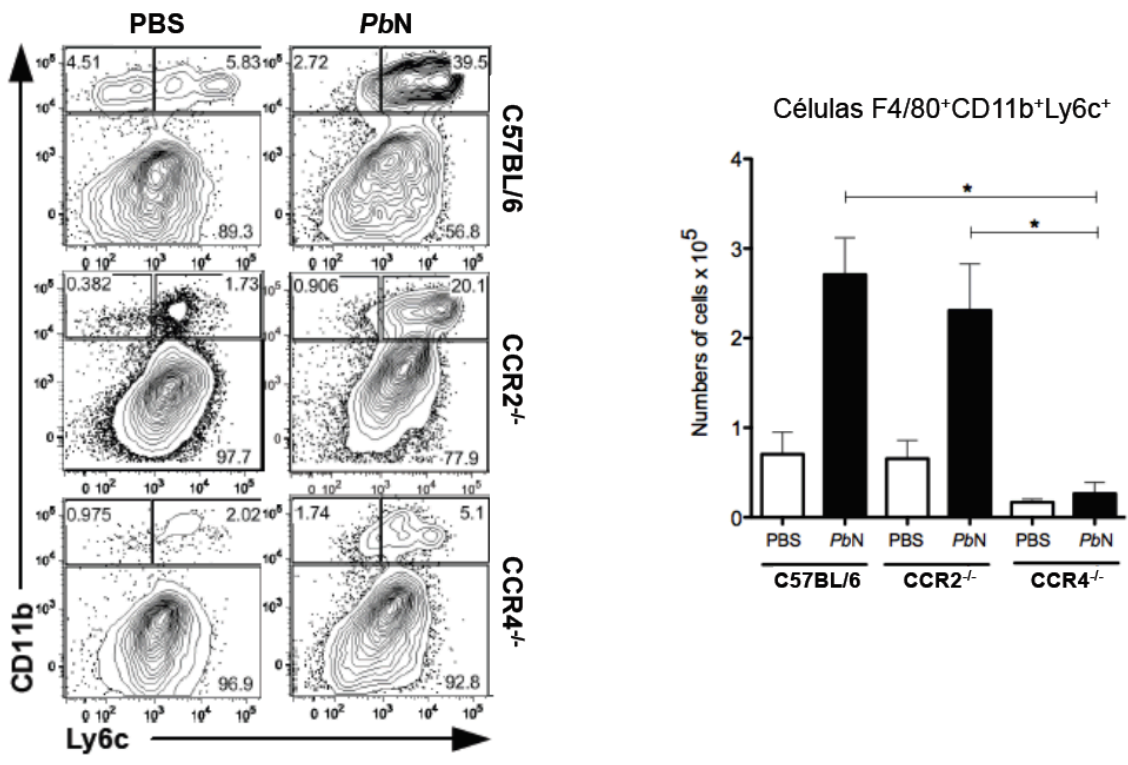
A migração de células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> não foi alterada nos camundongos nocautes infectados para as molécula CCR2 quando comparados aos camundongos selvagens também infectados (Figura 19B- Gráfico a direita). Dados similares a este também já foram relatados para o modelo experimental de malária cerebral, o qual utiliza a infecção de camundongos C57BL/6 infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA (BELNOUE et al., 2003) Apesar da molécula CCR2 parecer relevante no nosso modelo, mostramos que a migração de células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> para o pulmão em camundongos CCR4 nocaute foi claramente inibida (Figura 19C).

Observamos que somente migraram para o pulmão de camundongos selvagens as células mielóides que expressam Ly6c. Quando comparamos o perfil das subpopulações de células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> no pulmão de camundongos selvagens C57BL/6 com os de camundongos CCR4<sup>-/-</sup>, concluímos que a expressão de CCR4 interferiu de fato com a migração das células Ly6c<sup>+</sup>, enquanto o número de células Ly6c<sup>-</sup> não foi inalterado (Figura 19C). Portanto, o receptor de quimiocina CCR4 é necessário para que ocorra a migração dessas células para o pulmão durante a síndrome respiratória aguda associada à malária.

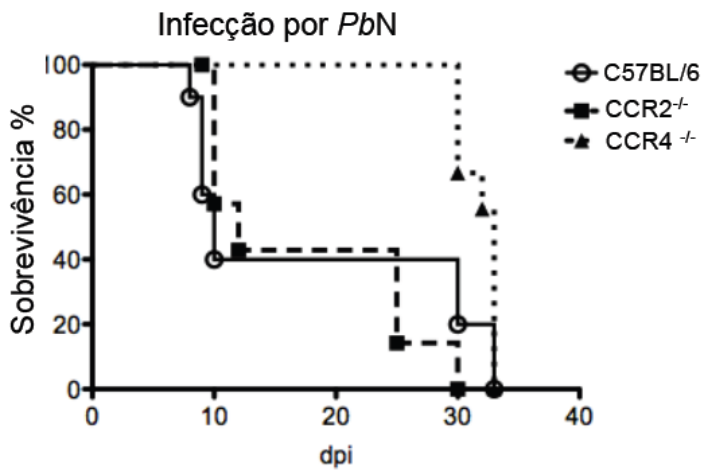
A



B



C

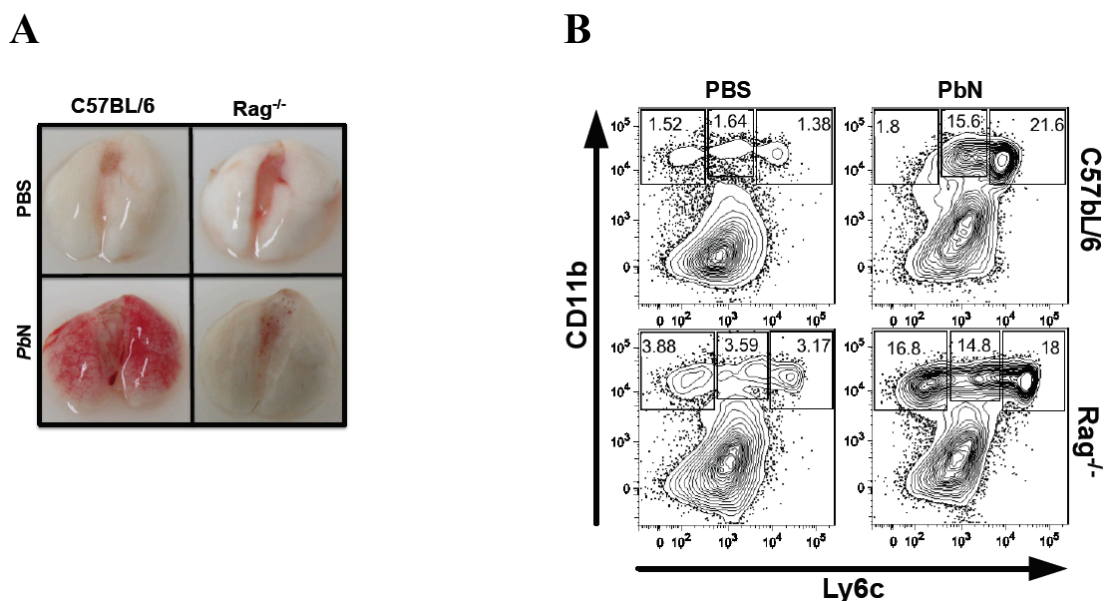


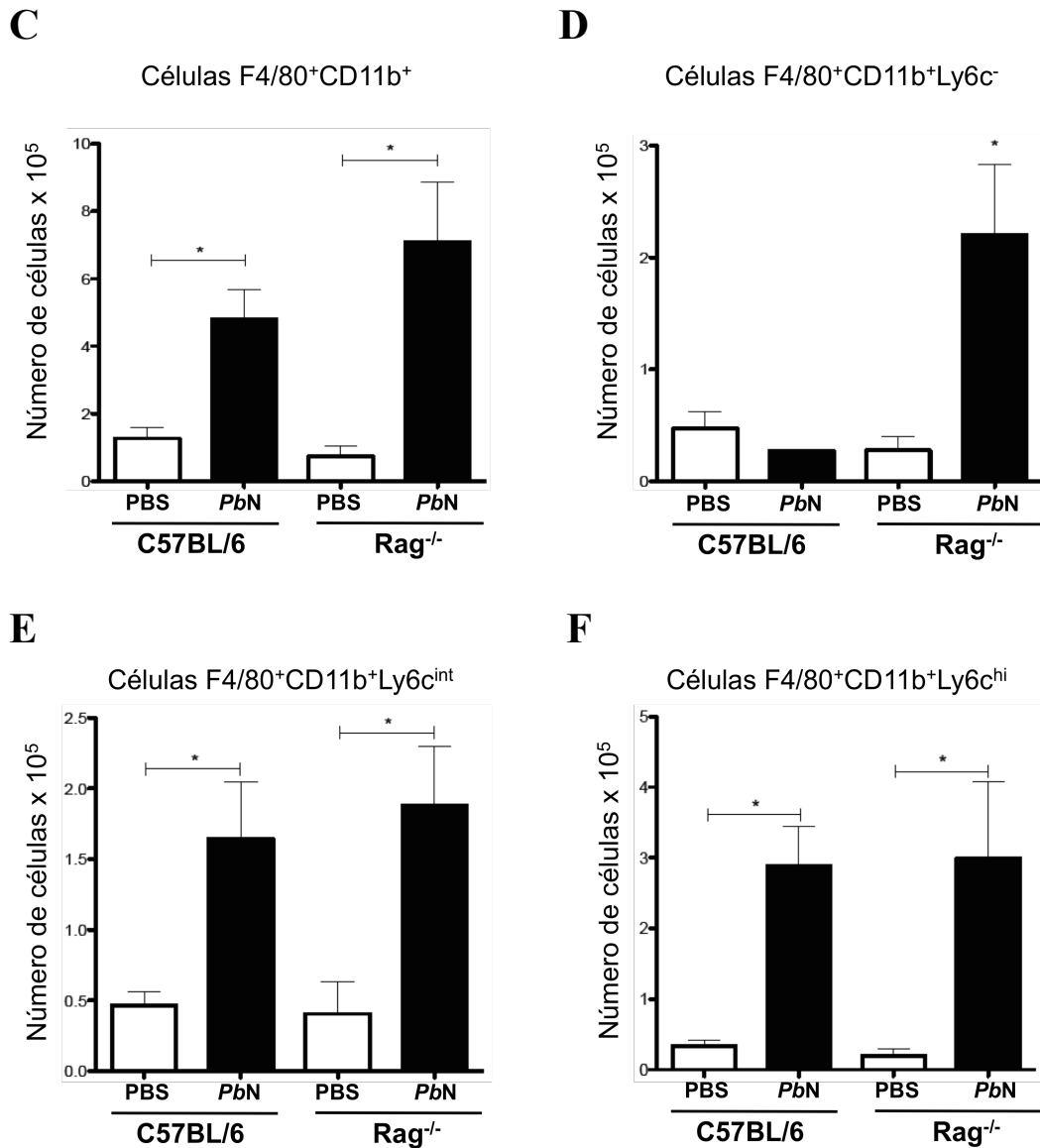
**Figura 19: Investigação do papel de CCR2 e CCR4 no desenvolvimento da MA-ALI/ARDS.** Foram avaliados o papel de CCR2 e de CCR4 na migração de células mielóides no pulmão. **A)** Expressão das moléculas CCR2 e CCR4 em células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> de camundongos C57BL/6 **B)** Frequência “Dot plots” a esquerda) e número total (gráfico a direita) de células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> no pulmão de camundongos C57BL/6, CCR2<sup>-/-</sup> e CCR4<sup>-/-</sup> durante a infecção por PbN. **C)** Gráfico de sobrevivência de camundongos C57BL/6, CCR2<sup>-/-</sup> e CCR4<sup>-/-</sup>. Figura representativa de dois experimentos realizados de maneira independente e apresentando resultados similares (n=4-5/grupo).



### 5.13. Avaliação da interferência de linfócitos na migração de células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> para o pulmão de camundongos infectados por *PbN*

Devido os camundongos CCR4<sup>-/-</sup> infectados por *PbN* possuírem um menor número de Tip-DCs no pulmão em relação aos camundongos selvagens, optamos por verificar se linfócitos seriam capaz de interferir com o recrutamento destas células. Para tanto, infectamos camundongos Rag<sup>-/-</sup>, visto que esses animais não possuem linfócitos. Verificamos que os camundongos Rag<sup>-/-</sup> não desenvolvem lesões no pulmão, o que confirma a importância de linfócitos para este modelo (Figura 20A). Observamos que a frequência de células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> aumentou nos camundongos selvagens e nos nocautes para Rag, apesar de que uma grande parte das células de origem monocítica presentes no pulmão de camundongos Rag<sup>-/-</sup> não expressam Ly6C, semelhante ao perfil de camundongos não infectados (Figura 20B). O número total de células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> aumentou claramente no pulmão de todos os camundongos infectados (Figura 20C), mas somente ocorreu o aumento do número total de células Ly6C<sup>-</sup> no pulmão de camundongos Rag<sup>-/-</sup> após a infecção por *PbN*, o que difere dos camundongos selvagens (Figura 20D). Também o número de células do pulmão que expressam níveis intermediários de Ly6C (Ly6C<sup>int</sup>) ou altos níveis de Ly6C (Ly6C<sup>hi</sup>) aumentaram em número em ambos os camundongos C57BL/6 e Rag<sup>-/-</sup> (Figuras 20E e 20F).





**Figura 20: Estudo do papel de linfócitos na migração de monócitos.** Camundongos Rag<sup>-/-</sup> e C57BL/6 infectados pelo *PbN* ou tratados com PBS. **A)** Fotografia do pulmão de um camundongo representativo de cada grupo avaliado. **B)** “Dot plots” indicando a migração de células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> para o pulmão e a variação da expressão de Ly6C destas células. **C)** Número total de células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>. **D)** Número total de células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup>. **E)** Número total de células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>int</sup>. **F)** Número total de células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>hi</sup>. Figura representativa de dois experimentos realizados de maneira independente e apresentando resultados similares (n=4-5/grupo).

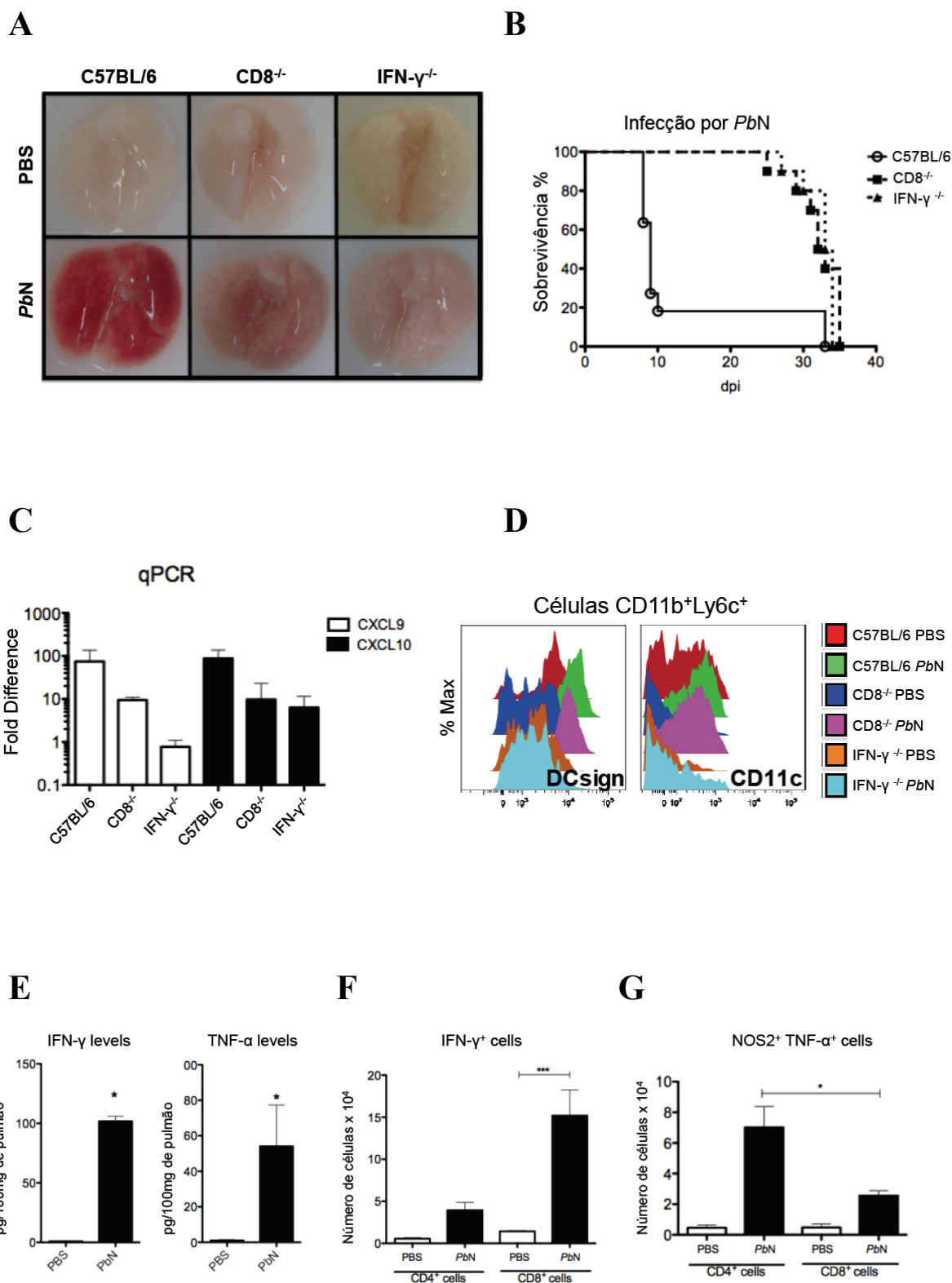
#### 5.14. Investigação do papel de IFN- $\gamma$ na maturação de Tip-DCs

A fim de verificar o papel de linfócitos CD8<sup>+</sup> e o papel de IFN- $\gamma$ , camundongos CD8<sup>-/-</sup> e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> foram infectados com *PbN*. Coerente com a

importância das células CD8<sup>+</sup> na indução da MA-ARDS (VAN DEN STEEN et al., 2010), verificamos que os camundongos CD8<sup>-/-</sup> e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> infectados por *PbN* não desenvolveram lesão grave no pulmão (Figura 21A). Além disso, esses camundongos sobrevivem ao desafio com *PbN* durante os dias em que a lesão pulmonar normalmente ocorre (Figura 21B). Devido à participação das células CD8<sup>+</sup> neste processo, supomos que esta célula deve agir como fonte principal de IFN- $\gamma$  no pulmão, já que seu número é bastante aumentado na infecção, enquanto as células CD4<sup>+</sup> e NK1.1<sup>+</sup> são poucas (Figuras 21A e 21B). Ocorreu ainda uma redução na expressão de CXCL9 e CXCL10 no pulmão de camundongos CD8<sup>-/-</sup> e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>, ambas quimiocinas sabidamente dependentes de IFN- $\gamma$  (Figura 21C).

Como IFN- $\gamma$  é importante na ativação/maturação de MO-DCs, verificamos a expressão de DC-sign e CD11c nos monócitos provenientes de camundongos C57BL/6, CD8<sup>-/-</sup> e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> infectados por *PbN* e não infectados. Utilizamos anticorpos marcados com fluorocromos e análise por citometria de fluxo para verificar a expressão de DC-sign e CD11c. A ausência de IFN- $\gamma$  bloqueou completamente a expressão de DC-sign e CD11c nos monócitos que migraram para os pulmões de animais infectados. No entanto, a ausência de células CD8<sup>+</sup> causou uma pequena alteração na expressão dessas moléculas (Figura 21D).

Avaliando a produção de citocinas em sobrenadante de homogenato de pulmão por CBA verificamos que não apenas IFN- $\gamma$  está presente no órgão de camundongos C57BL/6 infectados por *PbN*, mas também TNF- $\alpha$  (Figura 21E). Mostramos por marcação intracelular com anticorpos específicos conjugados a fluorocromos e citometria de fluxo que as células CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  estão em grande número no pulmão dos camundongos infectados (Figura 21F). E quando comparamos a presença de Tip-DCs nos pulmões de camundongos selvagens e  $\beta$ 2-microglobulina<sup>-/-</sup>, percebemos o menor número de Tip-DCs nos camundongos nocautes, cujas células CD8<sup>+</sup> estão ausentes (Figura 21G).



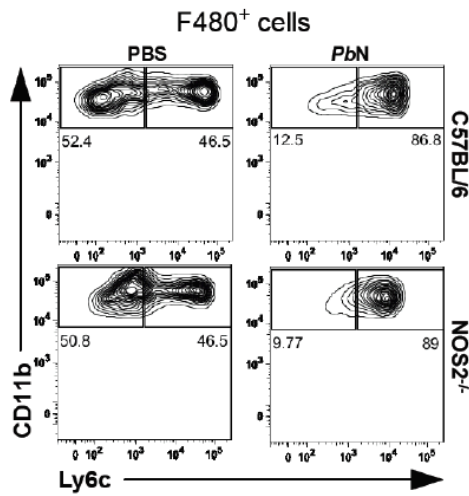
**Figura 21: Impacto do IFN- $\gamma$  na indução das Tip-DCs.** Foram avaliados o papel de CD8 e IFN- $\gamma$  no desenvolvimento da MA-ALI/ARDS. **A)** Fotografia do pulmão de camundongos C57BL/6,  $\beta$ 2-microglobulina $^{-/-}$  e IFN- $\gamma$  $^{-/-}$  infectados e não infectados. **B)** Gráfico de sobrevivência de camundongos C57BL/6,  $\beta$ 2-microglobulina $^{-/-}$  e IFN- $\gamma$  $^{-/-}$  após infecção por *PbN*. **C)** Expressão de CXCL9 e CXCL10 no pulmão de camundongos selvagens e nocautes **D)** Histograma mostrando expressão de DC-

sign (CD209) e CD11c de células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> derivadas de camundongos C57BL/6,  $\beta$ 2-microglobulina<sup>-/-</sup> e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> infectados e não infectados. **E)** Detecção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no homogenato de pulmões provenientes de camundongos C57BL/6 infectados e não infectados. **F)** Número de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  do pulmão de animais selvagens. **G)** Número total de células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> produtoras de TNF- $\alpha$  e NOS2 derivadas dos pulmões de camundongos C57BL/6 e  $\beta$ 2-microglobulina nocaute. Figura representativa de dois experimentos realizados de maneira independente e apresentando resultados similares (n=4-6/grupo).

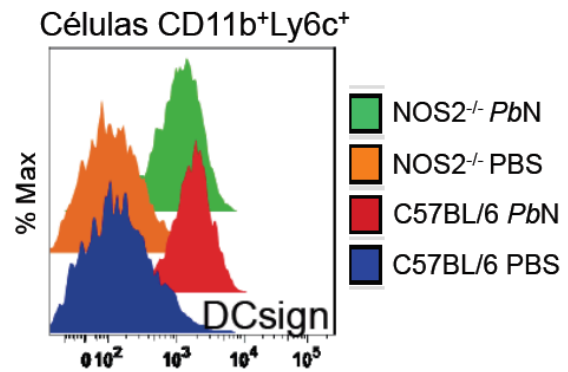
### **5.15. Desafio de camundongos NOS2 nocaute com *PbN***

As células Tip-Dcs poderiam estar agindo na patogênese da MA-ALI/ARDS pela produção de TNF- $\alpha$  e NOS2. Para investigar esta hipótese, nós infectamos camundongos NOS2<sup>-/-</sup> e comparamos o perfil de expressão e a frequência de células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> e as duas subpopulações Ly6C<sup>-</sup> e Ly6C<sup>+</sup>. O perfil dessas células nos animais selvagens e nos deficientes para NOS2 permaneceu semelhante (Figura 22A). Além disso, a expressão de DC-sign nos serviu para indicar que estas células estavam sendo ativadas normalmente nos camundongos NOS2<sup>-/-</sup> (Figura 22B). Mostramos que os camundongos C57BL/6 desenvolveram forte edema quando comparados com os camundongos NOS2<sup>-/-</sup> (Figura 22C). Para confirmar a possível resistência dos animais nocautes em relação aos selvagens no nosso modelo, infectamos e avaliamos a sobrevivência dos mesmos. De fato, os camundongos NOS2<sup>-/-</sup> se mostraram resistentes a MA-ALI/ARDS provocada pela infecção por *PbN* (Figura 22D).

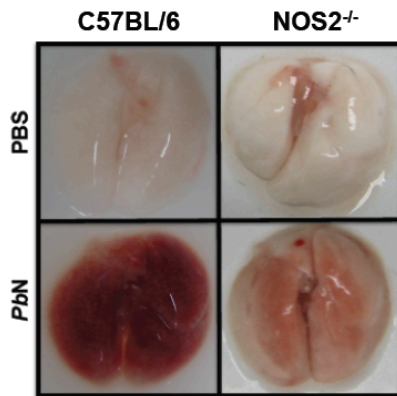
**A**



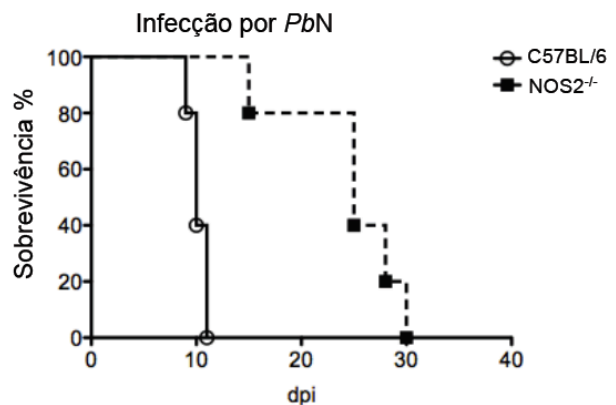
**B**



**C**



**D**



**Figura 22: Papel de NOS2 na patogênese da MA-ALI/ARDS.** Foi avaliado o perfil de expressão de Ly6C em células de CCR2 e de CCR4 na migração de células mielóides no pulmão. **A)** Perfil de expressão de CD11b e Ly6C em células F4/80<sup>+</sup> provenientes de camundongos C57BL/6 e NOS2<sup>-/-</sup>. **B)** Histograma demonstrando a expressão de DC-sign em células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> do pulmão de camundongos selvagens e NOS2<sup>-/-</sup>. **C)** Fotografia dos pulmões de camundongos C57BL/6 e NOS2<sup>-/-</sup> infectados e não infectados. **D)** Sobrevivência de camundongos NOS2<sup>-/-</sup> comparado com os camundongos C57BL/6. Figura representativa de dois experimentos realizados de maneira independente e apresentando resultados similares (n=4-6)

## 6. Discussão

---

Nosso trabalho mostra o importante papel de CCR4 na indução da MA-ALI/ARDS associada à infecção por *PbN*. Sabe-se que o perfil Th1 de resposta imune é predominante nos modelos de malária e que as células T CD8<sup>+</sup> tem papel relevante na doença (NIE et al., 2007; FINDLAY et al., 2010). Nós demonstramos que as células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no pulmão de camundongos infectados por *PbN* expressam ambos CXCR3 na superfície e fator de transcrição Tbet, o que indica a produção de IFN- $\gamma$  por estas células e confirmam o perfil Th1 (KOCH ET AL., 2009). Outra contribuição importante do nosso trabalho foi identificar que na malária, o CCR4 tem um papel independente do perfil Th2. Outra característica importante do nosso modelo, é que a deficiência de CCR4 não alterou o recrutamento de células T nos camundongos durante a malária, o que nos surpreendeu uma vez que esse receptor está relacionado com o recrutamento de células T (ARAUJO-PIRES et al., 2015).

Nossos resultados mostram um grupo de células mielóides com características de células dendríticas derivadas de monócitos (MO-DCs), as quais expressam CD11c, CD11b, F4/80, MHCII, CD80, CD86 e CD209. Além disso, estas células produzem simultaneamente TNF- $\alpha$  e NOS2, correspondendo com o fenótipo de Tip-DCs [57]. A migração de monócitos capazes de originar Tip-DCs é dependente de CCR4, mas não CCR2, e portanto esse receptor tem função no desenvolvimento da MA-ALI/ARDS. Os ligantes de CCR4, CCL17 e CCL22 não estão presentes na infecção por *PbN* (Figura 18). Vale ressaltar que já foi descrito que o receptor CCR4 também pode influenciar a migração de macrófagos e consequentemente o desenvolvimento da fibrose pulmonar em modelo murino (BELPERIO et al., 2014). Apesar da malária causada pelo *PbN* não ter induzido a expressão dos ligantes clássicos de CCR4, verificamos o aumento da expressão gênica de CCL2, CCL3 e CCL4 nos pulmões de camundongos infectados. CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5 são capazes de ativar a sinalização através de CCR4 e o CCL2 também é capaz de mediar a migração de células T (BROWN ET AL., 2007; SUN ET AL., 2016). CCR4 possui também um

papel crítico em modelo de choque séptico, onde camundongos CCR4 nocautes mostraram-se resistentes ao desafio com LPS, enquanto os camundongos selvagens foram susceptíveis. A sobrevivência destes animais foi associada aos baixos níveis de citocinas pró-inflamatórias no soro e o menor influxo de macrófagos para a cavidade peritoneal (CHVATCHKO et al., 2000). Da mesma forma, camundongos que não expressam CCR4 mostraram melhor sobrevivência num modelo de peritonite causada por sepse polimicrobial (TRAEGER et al., 2008). Outro trabalho mostrou que no modelo autoimune de encefalomielite experimental (EAE) mediado por Th1/Th17, a produção GM-CSF e IL-23 por células dendríticas são ativadas através de CCR4, portanto indica que este receptor tem papel na ativação destas células (POPPENSIEKER et al., 2012).

A importância das células CD8<sup>+</sup> foi estudada previamente neste modelo de MA-ALI/ARDS, no qual se mostrou a dependência destas células para o desenvolvimento da síndrome no pulmão, mas os mecanismos pelos quais estes linfócitos agem na doença não foram elucidados (VAN DEN STEEN et al., 2010). Nós confirmamos a dependência de linfócitos CD8<sup>+</sup> na indução da MA-ALI/ARDS e também verificamos que a produção de IFN- $\gamma$  foi fundamental na patogênese causada pelo *PbN* nos pulmões dos camundongos infectados. Devido à deficiência de CCR4 não ter interferido com a ativação/migração das células CD8<sup>+</sup>, pensamos que esses linfócitos teriam um papel indireto neste modelo. Acreditamos que as células CD8<sup>+</sup> são fontes importantes de IFN- $\gamma$  que participa efetivamente na indução da produção de TNF- $\alpha$  e NOS2 pelas Tip-DCs no pulmão. O reduzido número de células produtoras de NOS2 e TNF- $\alpha$  em camundongos  $\beta$ 2-microglobulina<sup>-/-</sup> infectados por *PbN* comparados aos camundongos selvagens, reforça nossa hipótese. Além disso, a produção de IFN- $\gamma$  está envolvida na diferenciação/maturação de monócitos em células dendríticas no pulmão de camundongos infectados por *PbN*.

Sabe-se que camundongos NOS2<sup>-/-</sup> são resistentes a lesão pulmonar induzida pelo polissacarídeo *carrageenan* e também induzida pelo antibiótico bleomicina (CUZZOCREA et al., 2000; GENOVESE et al., 2005). Adicionalmente, os camundongos NOS2<sup>-/-</sup> infectados por *PbN* se mostraram



resistentes ao desenvolvimento da lesão pulmonar, o que confirma um papel crucial das Tip-DCs neste modelo, visto que elas foram as principais produtoras desta enzima quando comparadas aos neutrófilos e macrófagos alveolares.

Nosso laboratório demonstrou num modelo não letal de malária que os neutrófilos podem exercer um papel significativo nesta doença (ROCHA et al., 2015). Todavia estas células não parecem ser importantes no desenvolvimento da síndrome respiratória quando esta é causada pelo *PbN* visto que não observamos aumento de células Ly6G<sup>+</sup> em nosso modelo. Nossos resultados diferem do modelo de MA-ALI, o qual usa camundongos DBA-2 infectados por *P. berghei* ANKA. Neste modelo, redes extracelulares oriundas de neutrófilos (NETs), mieloperoxidase e espécies reativas de oxigênio foram mostrados como mediadores no desenvolvimento da lesão pulmonar (SERCUNDES et al., 2016). Todavia em humanos, a lesão pulmonar associada à malária está principalmente relacionada com um grande aumento no número de monócitos e linfócitos no pulmão, enquanto os neutrófilos são pouco expressivos neste órgão, o que indica que nosso modelo parece mais próximo da síndrome em humanos (VALECHA et al., 2009). Além disso, a presença da óxido nítrico sintase (NOS2) correlaciona com a gravidade da doença e parece participar na patogênese da malária cerebral (CLARK et al., 2003). Outro fator importante é que o papel da óxido nítrico sintase induzida está relacionado a presença de polimorfismos do tipo SNP, o que pode definir o caráter regulador ou inflamatório desta molécula e influenciar o desenvolvimento de complicações na malária (CRAMER et al., 2004). A produção de NOS2 também pode ser induzida por TNF- $\alpha$  e esta citocina está envolvida na patogênese da malária em humanos (ROCKETT et al., 1994). Essa correlação entre TNF- $\alpha$  e NOS2 está de acordo com nossa hipótese, uma vez que acreditamos que as Tip-DCs são células muito importantes na indução da MA-ALI/ARDS.

Nossa outra hipótese é que CCR4 media a migração de monócitos para os pulmões de camundongos infectados por *PbN*. Neste local a produção de IFN- $\gamma$  por células T, especialmente células CD8<sup>+</sup>, induz a diferenciação/amadurecimento destes monócitos em Tip-DCs.

O papel de CCR4 na resposta imune do tipo Th1 não foi

profundamente investigado, portanto os mecanismos envolvidos na função deste receptor ainda precisam ser esclarecidos. Nossos resultados sugerem que outros ligantes de CCR4, que não o CCL17 ou CCL22, devem estar envolvidos no recrutamento de leucócitos que expressam este receptor em modelos de inflamação com perfil Th1. Além disso, o papel de CCR4 em células mielóides e linfóides em diferentes órgãos deve ser estudado, uma vez que este receptor de quimiocina atua no recrutamento de Tip-DCs para o pulmão. Nosso grupo mostrou que a migração de monócitos para o cérebro de camundongos CCR5<sup>-/-</sup> foi fortemente reduzida quando comparada com os camundongos selvagens, enquanto o papel de CCR2 está principalmente relacionado à saída dos monócitos da medula óssea (HIRAKO et al., 2016). Mas, neste modelo de MA/ALI/ARDS, o redirecionamento dessas células (maduras ou diferenciadas em outras) para o pulmão depende de CCR4 e seus ligantes. Isso pode estar relacionado com a eficiência da sinalização do CCR4 ou com o efeito sinérgico das várias quimiocinas capazes de se ligar a ele.

Outro aspecto relevante dos estudos com o receptor de quimiocina CCR4 é seu uso como alvo terapêutico. Em humanos, células de carcinoma renal são capazes de expressar CCR4 e o uso de antagonistas deste receptor no modelo murino foi capaz de reduzir o infiltrado de células mielóides imaturas e aumentar o número de células NK (BERLATO et al., 2017). O uso de toxinas direcionadas ao receptor CCR4 foi capaz de erradicar linfomas de células T que expressavam CCR4 em camundongos NOD-SCID (BAATAR et al., 2007). O uso de CCR4 como alvo terapêutico em carcinoma de fígado em humanos também tem sido testado e parece promissor (CHENG et al., 2017). No modelo de inflamação por alergia nos pulmões, cujo perfil de resposta predominante é Th2, o uso de antagonista de CCR4 também se mostrou eficiente (ZHANG et al., 2017). Todos estes estudos nos levam a crer que o uso de CCR4 como alvo terapêutico no combate a MA-ALI/ARDS ou outras complicações induzidas pela infecção por *Plasmodium sp.* pode ser eficiente, o que exige futuros testes nos diferentes modelos murinos existentes e a compreensão dos mecanismos envolvidos no reconhecimento e sinalização através de CCR4.

## 7. Conclusão

---

Os dados obtidos neste trabalho revelam mecanismos imunológicos envolvidos na síndrome respiratória aguda associada a malária. As células CD8<sup>+</sup> e os monócitos (F4/80+CD11b+Ly6c+) são recrutados para o pulmão durante o processo inflamatório, todavia somente a migração dos monócitos é prejudicada pela falta de CCR4. Parte destes monócitos se desenvolvem em células dendríticas capazes de produzir TNF- $\alpha$  e NOS2, o que as caracterizam como Tip-DCs. A produção de INF- $\gamma$  é fundamental para que os monócitos se diferenciem em dendríticas. Nós ainda mostramos que as células CD8<sup>+</sup> são as principais produtoras de INF- $\gamma$  neste modelo e que na falta destes linfócitos o número de Tip-Dcs é bastante reduzido. Portanto nosso trabalho mostra a importância do CCR4 na imunopatogênese da MA-ALI/ARDS.

## Referências bibliográficas

---

ACOSTA-RODRIGUEZ E. V. et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. **Nature Immunology**, 8:639-46, jun. 2007.

ALONSO M. N. et al. T(H)1, T(H)2, and T(H)17 cells instruct monocytes to differentiate into specialized dendritic cell subsets. **Blood**, 118:3311-20, mar. 2011

ARAUJO-PIRES AC. et al. IL-4/CCL22/CCR4 axis controls regulatory T-cell migration that suppresses inflammatory bone loss in murine experimental periodontitis. **Journal of Bone and Mineral Research**, 30:412-22, mar. 2015.

ASHLEY JW. et al. Genetic ablation of CD68 results in mice with increased bone and dysfunctional osteoclasts. **PLoS One**, 6:e25838, out. 2011.

ATAM V. et al. Acute pancreatitis and acute respiratory distress syndrome complicating Plasmodium vivax malaria. **Journal of Vector Borne Diseases**, 50:151-4, jun. 2013.

BAATAR D. et al. CCR4-expressing T cell tumors can be specifically controlled via delivery of toxins to chemokine receptors. **Journal of Immunology**, 179:1996-2004, ago. 2007.

BACCARELLA A. et al.. Toll-like receptor 7 mediates early innate immune responses to malaria. **Infection and Immunity**, 81:4431-42, dez. 2013.

BAPTISTA F. G. 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**, 78:4033-9, set. 2010.

BEDORET D. et al. Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, 119:3723-38, nov. 2009.

BELNOUE E. et al. Chemokine receptor CCR2 is not essential for the development of experimental cerebral malaria. **Infection and Immunity**, 71:3648-51, jun. 2003a.

BELNOUE E. et al. CCR5 deficiency decreases susceptibility to experimental cerebral malaria. **Blood**, 101:4253-9, jun. 2003b.

BELPERIO J. A. et al. The role of the Th2 CC chemokine ligand CCL17 in pulmonary fibrosis. **Journal of Immunology**, 173:4692-8, out. 2004.

BERAHOVICH R. D. et al. Evidence for NK cell subsets based on chemokine receptor expression. **Journal of Immunology**, 177:7833-40, dez. 2006.

BERLATO C. et al. A CCR4 antagonist reverses the tumor-promoting microenvironment of renal cancer. **Journal of Clinical Investigation**, 127:801-813, mar. 2017.

BOSSCHAERTS T. et al. Tip-DC development during parasitic infection is regulated by IL-10 and requires CCL2/CCR2, IFN-gamma and MyD88 signaling. **PLoS Pathogens**, 6:e1001045, ago. 2010.

BROWN C. E. et al. Tumor-derived chemokine MCP-1/CCL2 is sufficient for mediating tumor tropism of adoptively transferred T cells. **Journal of Immunology**, 179:3332-41, set. 2007.

CAMPANELLA G. S. et al. Chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9 and CXCL10 are required for the development of murine cerebral malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 105:4814-9, mar. 2008.

CAMPBELL J. J.; O'CONNELL D. J.; WURBEL M. A. Cutting Edge: Chemokine receptor CCR4 is necessary for antigen-driven cutaneous accumulation of CD4 T cells under physiological conditions. **Journal of Immunology**, 178:3358-62, mar. 2007.

CHANG W. L. et al. CD8(+)-T-cell depletion ameliorates circulatory shock in Plasmodium berghei-infected mice. **Infection and Immunity**, 69:7341-8, dez. 2001.

CHENG X. et al. Up-regulation of chemokine receptor CCR4 is associated with Human Hepatocellular Carcinoma malignant behavior. **Scientific Reports**, 7:12362, set. 2017.

CHEONG C. et al. Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. **Cell**, 143:416-29, out. 2010.

CHONG S. Z. et al. Human CD8(+) T cells drive Th1 responses through the differentiation of TNF/iNOS-producing dendritic cells. **European Journal of Immunology**, 41:1639-51, 2011.

CHVATCHKO Y. et al. A key role for CC chemokine receptor 4 in lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *The Journal of Experimental Medicine*, 191:1755-64, maio. 2000.

CLARK I. A. et al. Tissue distribution of migration inhibitory factor and inducible nitric oxide synthase in falciparum malaria and sepsis in African children. **Malaria Journal**, 2:6, abr. 2003.

COLUMBA-CABEZAS S. et al. Induction of macrophage-derived chemokine/CCL22 expression in experimental autoimmune encephalomyelitis and cultured microglia: implications for disease regulation. *Journal of Neuroimmunology*, 130:10-21, set. 2002.

COX-SINGH J. et al. Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. **Clinical Infections Disease**, 46:165-71, jan. 2008

CRAMER J. P. et al. iNOS promoter variants and severe malaria in Ghanaian children. **Tropical Medicine & International Health**, 9:1074-80, out. 2004.

CUZZOCREA S. et al. Inducible nitric oxide synthase-knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. **American Journal Respiratory and Critical Care Medicine**, 162:1859-66, nov. 2000.

D'AMBROSIO D. et al. Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. **Journal of Immunology**, 161:5111-5, nov. 1998.

DRESING P. et al. A fluorescence reporter model defines "Tip-DCs" as the cellular source of interferon beta in murine listeriosis. **PLoS One**, 5:e15567, dez. 2010.

ELLIS R. D. et al. Phase 1 trial of the Plasmodium falciparum blood stage vaccine MSP1(42)-C1/Alhydrogel with and without CPG 7909 in malaria naive adults. **PLoS One**, 5:e8787, jan. 2010.

EPIPHANIO S. et al. VEGF promotes malaria-associated acute lung injury in mice. **PLoS Pathogens**, 6:e1000916, maio 2010.

FAUSTINO L. et al. Regulatory T cells migrate to airways via CCR4 and attenuate the severity of airway allergic inflammation. **Journal of Immunology**, 190:2614-21, mar. 2013.

FINDLAY E. G. et al. Essential role for IL-27 receptor signaling in prevention of Th1-mediated immunopathology during malaria infection. **Journal of Immunology**, 185:2482-92, ago. 2010.

GAMBOA D. et al. A large proportion of P. falciparum isolates in the Amazon region of Peru lack pfhrp2 and pfhrp3: implications for malaria rapid diagnostic tests. **PLoS One**, 5:e8091, jan. 2010;

GAZZINELLI R. T. Innate sensing of malaria parasites. **Nature Reviews. Immunology**, 14:744-57, nov. 2014.

GENOVESE T. et al. Inhibition or knock out of inducible nitric oxide synthase result in resistance to bleomycin-induced lung injury. **Respiratory Research**, 6:58, jun. 2005.

GROOM JR. et al. CXCR3 chemokine receptor-ligand interactions in the lymph node optimize CD4+ T helper 1 cell differentiation. **Immunity**, 37:1091-103, dez. 2012.

HAQUE A. et al. High parasite burdens cause liver damage in mice following Plasmodium berghei ANKA infection independently of CD8(+) T cell-mediated immune pathology. **Infection and Immunity**, 79:1882-8, maio 2011.

HIRAKO I. C. et al. Splenic differentiation and emergence of CCR5+CXCL9+CXCL10+ monocyte-derived dendritic cells in the brain during cerebral malaria. **Nature Communication**, 7:13277, nov. 2016.

HOOGEWERF A. et al. Molecular cloning of murine CC CKR-4 and high affinity binding of chemokines to murine and human CC CKR-4. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, 218:337-43, jan. 1996.

KIM C. H. et al. Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo. **The Journal of Clinical Investigation**, 108:1331-9, nov. 2001.

KOCH MA. et al. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. **Nature Immunology**, 10:595-602, un. 2009.

KURIHARA T. et al. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. **Journal of Experimental Medicine**, 186:1757-62, nov. 1997.

LANGHORNE J. et al. Immunity to malaria: more questions than answers. **Nature Immunology**, 9:725-32, jul. 2008.

LIM H. W. et al. Human Th17 cells share major trafficking receptors with both polarized effector T cells and FOXP3+ regulatory T cells. **Journal of Immunology**, 180:122-9, jan. 2008.

LIU M. et al. Heme mediated STAT3 activation in severe malaria. **PLoS One**, 7:e34280, mar. 2012.

MACCORMICK I. J. et al. Cerebral malaria in children: using the retina to study the brain. **Brain: a Journal of neurology**, 137:2119-42, ago. 2014.

MALDONADO-LOPEZ R.; MOSER M. Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses. **Seminars in Immunology**, 13:275-82, out. 2001.

MAZHAR F. et al. Respiratory Manifestation of Malaria: an Update. **International Journal of Medical Research & Health Sciences**, 5(5):59-65, maio. 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de diagnóstico laboratorial da malária

MISHARIN A. V. et al. Flow cytometric analysis of macrophages and dendritic cell subsets in the mouse lung. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, 49:503-10, out. 2013.

MIU J. et al. Chemokine gene expression during fatal murine cerebral malaria and protection due to CXCR3 deficiency. **Journal of Immunology**, 180:1217-30, jan. 2008.

MOHAN A.; SHARMA S. K.; BOLLINENI S. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in malaria. **Journal of Vector Borne Diseases**, 45:179-93, set. 2008.

NIE C. Q. et al. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress CD4<sup>+</sup> T-cell function and inhibit the development of Plasmodium berghei-specific TH1 responses involved in cerebral malaria pathogenesis. **Infection and Immunity**, 75:2275-82, maio 2007.

NESS T. L. et al. CCR4 is a key modulator of innate immune responses. **Journal of Immunology**, 177:7531-9, dez. 2006.

PARROCHE P. et al. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 104:1919-24, fev. 2007.

PATOUILLARD E. et al. Global investment targets for malaria control and elimination between 2016 and 2030. **BMJ Global Health**, 2:e000176, maio 2017.

PICHYANGKUL S. et al. Malaria blood stage parasites activate human plasmacytoid dendritic cells and murine dendritic cells through a Toll-like receptor 9-dependent pathway. **Journal of Immunology**, 172:4926-33, abr. 2004.

POPPENSIEKER K. et al. CC chemokine receptor 4 is required for experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating GM-CSF and IL-23 production in dendritic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 109:3897-902, mar. 2012.

POWER C. A. et al. Molecular cloning and functional expression of a novel CC chemokine receptor cDNA from a human basophilic cell line. **The Journal of Biological Chemistry**, 270:19495-500, ago. 1995.

RAJ D. K. et al. Antibodies to PfSEA-1 block parasite egress from RBCs and protect against malaria infection. **Science**, 344:871-7, maio 2014.



REECE J. J.; SIRACUSA M. C.; SCOTT A. L. Innate immune responses to lung-stage helminth infection induce alternatively activated alveolar macrophages. **Infection and Immunity**, 74:4970-81, set. 2006.

ROCHA BC et al. Type I Interferon Transcriptional Signature in Neutrophils and Low-Density Granulocytes Are Associated with Tissue Damage in Malaria. **Cell Reports**, 13:2829-2841, dez. 2015.

ROCKETT KA. et al. Possible role of nitric oxide in malarial immunosuppression. **Parasite Immunology**, 16:243-9, maio 1994.

SALLUSTO F.; LANZAVECCHIA A.; MACKAY C. R. The role of chemokines and chemokine receptors in T cell priming and Th1/Th2-mediated responses. **Immunology Today**, 19(12):568-74, dez. 1998.

SARKAR S.; BHATTACHARYA P. Cerebral malaria caused by Plasmodium vivax in adult subjects. *Indian Journal of Critical Care Medicine*, 12:204-5, out. 2008.

SARKAR S, SAHA K AND DAS CS. Three cases of ARDS: An emerging complication of Plasmodium vivax malaria. **Lung India**, 27:154-7, set. 2010.

SATHER B. D. et al. Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. **The Journal of Experimental Medicine**, 204:1335-47, jun. 2007.

SERBINA N. V. et al. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. **Immunity**, 19:59-70, jul. 2003.

SERCUNDES M. K. et al. Targeting Neutrophils to Prevent Malaria-Associated Acute Lung Injury/Acute Respiratory Distress Syndrome in Mice. **PLoS Pathogens**, 12:e1006054, dez. 2016.

SHARMA S. et al. Innate immune recognition of an AT-rich stem-loop DNA motif in the Plasmodium falciparum genome. **Immunity**, 35:194-207, ago. 2011.

SPONAAS A. M. et al. Migrating monocytes recruited to the spleen play an important role in control of blood stage malaria. **Blood**, 114:5522-31, dez. 2009.

STRUYF S. et al. Enhanced anti-HIV-1 activity and altered chemotactic potency of NH2-terminally processed macrophage-derived chemokine (MDC) imply an additional MDC receptor. **Journal of Immunology**, 161:2672-5, set. 1998.

SUN W. et al. Blockade of MCP-1/CCR4 signaling-induced recruitment of activated regulatory cells evokes an antitumor immune response in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncotarget**, 7:37714-37727, jun. 2016.

SWANSON PA. et al. CD8+ T Cells Induce Fatal Brainstem Pathology during Cerebral Malaria via Luminal Antigen-Specific Engagement of Brain Vasculature. **PLoS Pathogens**, 12:e1006022, dez. 2016.

TAYLOR W. R.; CANON V.; WHITE N. J. Pulmonary manifestations of malaria : recognition and management. **Treatments in Respiratory Medicine**, 5:419-28, 2006.

TAYLOR W. R. J. et al. Respiratory manifestations of malaria. **Chest**,142:492-505, ago. 2012.

TRAEGER T. et al. Detrimental role of CC chemokine receptor 4 in murine polymicrobial sepsis. **Infection and Immunity**,76:5285-93, nov. 2008.

VALECHA N. et al. Histopathology of fatal respiratory distress caused by Plasmodium vivax malaria. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 81:758-62, nov. 2009.

VAN DEN STEEN PE.et al. Immunopathology and dexamethasone therapy in a new model for malaria-associated acute respiratory distress syndrome. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 181:957-68, maio 2010.

VAN DEN STEEN PE. et al. Pathogenesis of malaria-associated acute respiratory distress syndrome. **Trends in Parasitology**, 29:346-58, jul. 2013.

WANG J. et al. Bacterial colonization dampens influenza-mediated acute lung injury via induction of M2 alveolar macrophages. **Nature Communication**, 4:2106, jul. 2013.

WILSMANN-THEIS D. et al. Generation and functional analysis of human TNF-alpha/iNOS-producing dendritic cells (Tip-DC). **Allergy**, 68:890-8, jul. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria Report 2017. Tradução.

WU X. et al. Protein-DNA complex is the exclusive malaria parasite component that activates dendritic cells and triggers innate immune responses. **Journal of Immunology**, 184:4338-48, abr. 2010.

XU H. et al. CD4+ T cells acting independently of antibody contribute to protective immunity to Plasmodium chabaudi infection after apical membrane antigen 1 immunization. **Journal of Immunology**,165:389-96, jul. 2000.

WYKES M. N.; GOOD M. F. What have we learnt from mouse models for the study of malaria? **European Journal of Immunology**, 39:2004-7, aug. 2009.

YOSHIE O.; MATSUSHIMA K. CCR4 and its ligands: from bench to bedside. **International Immunology**, 27:11-20, jan. 2015.

ZHANG Y. et al. A new antagonist for CCR4 attenuates allergic lung inflammation in a mouse model of asthma. *Scientific Reports*, 7:15038, nov. 2017.

ZLOTNIK A.; YOSHIE O.; NOMIYAMA H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. ***Genome Biology***, 7:243, dez. 2006.

ZUZARTE-LUIS V.; MOTA M. M.; VIGARIO A. M. Malaria infections: what and how can mice teach us. ***Journal of Immunological Methods***, 410:113-22, aug. 2014