

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

Suelen Queiroz Diniz

**MECANISMOS EFETORES DE MONÓCITOS NA MALÁRIA HUMANA CAUSADA  
PELO *Plasmodium vivax***

Belo Horizonte  
2021

Suelen Queiroz Diniz

**MECANISMOS EFETORES DE MONÓCITOS NA MALÁRIA HUMANA CAUSADA  
PELO *Plasmodium vivax***

**Versão final**

Tese apresentada ao Programa da Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para à obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Imunologia: Imunologia.

Orientadores:

Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli

Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli

Belo Horizonte

2021

043

Diniz, Suelen Queiroz.

Mecanismos efetores de monócitos na malária humana causada pelo Plasmodium vivax [manuscrito] / Suelen Queiroz Diniz. – 2020.

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

Orientadores: Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli; Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Malária. 3. Plasmodium vivax. 4. Monócitos. 5. Metabolismo. I. Antonelli, Lis Ribeiro do Valle. II. Gazzinelli, Ricardo Tostes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
 31270-901 – Belo Horizonte – MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE SUELEN QUEIROZ DINIZ.** Ao um dia do mês de junho de 2020 às 09:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Mecanismos efetores de monócitos na malária humana causada pelo *Plasmodium vivax*", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Lis Ribeiro do Valle Antonelli, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. José Carlos Farias Alves Filho (Universidade de São Paulo-FMRP - USP), aprovada; Dr. Luíz Carlos Crocco Afonso (Universidade Federal de Ouro Preto), aprovada; Dr. Helton da Costa Santiago (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Leda Quercia Vieira (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Lis Ribeiro do Valle Antonelli - Orientadora (Centro de Pesquisa René Rachou - FIOCRUZ/MG), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

- APROVADA  
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 01 de junho de 2020.

Assinado de forma digital por José  
 Carlos Farias Alves Filho  
 Dados: 2020.06.01 17:36:51 -03'00'

Dr. José Carlos Farias Alves Filho (Universidade de São Paulo-FMRP - USP)

Dr. Luíz Carlos Crocco Afonso (Universidade Federal de Ouro Preto)

Dr. Helton da Costa Santiago (UFMG)

Dr. Leda Quercia Vieira (UFMG)

Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli - Coorientador (UFMG)

Dr. Lis Ribeiro do Valle Antonelli - Orientadora (Centro de Pesquisa René Rachou - FIOCRUZ/MG)

Profª Leda Quercia Vieira  
 Coordenadora do Programa de Pós-Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia



***Ao Mojito,  
por ter sido o melhor companheiro da vida.***

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por sempre me apoiar e nunca me deixar desistir. Por sempre me permitir ver positividade, mesmo nas situações mais negativas. Por me fazer querer ser uma pessoa melhor. E por me mostrar que apesar de todas as dificuldades o melhor ainda está por vir.

À minha orientadora Lis, por esses 10 anos de convivência. Obrigada por todos os ensinamentos durante essa longa caminhada. Você foi muito mais do que um exemplo profissional a ser seguido, foi um exemplo de ser humano. Obrigada por ser minha mãe científica, por ter dado oportunidade para uma menina de 19 anos que estava com medo de abrir a porta do laboratório, pois estava escrito “Risco Biológico”. Devo toda minha formação profissional a você. Quero te agradecer do fundo do meu coração por cada momento vivido. Obviamente, nem todos os momentos foram maravilhosos, tivemos uma boa cota de discussões ao longo desse percurso, mas todos eles me permitiram ser a pessoa que sou hoje. E por isso serei eternamente grata. Obrigada por confiar em mim.

A todos os amigos dos laboratórios de Biologia e Imunologia Parasitária, por todos os momentos compartilhados. Em especial ao Pedro, por tido uma paciência imensa para me ensinar o básico quando era só uma iniciação científica no laboratório. À Martinha, por ser esse ser humano incrível e professora nata. À Pri, por toda doçura e por sempre coletar sangue para mim. À Thaís, pela amizade e por ter sido minha sanidade em vários momentos ao longo desses anos, sem você esse percurso teria sido muito mais triste e laborioso.

Ao Dr. Ricardo Gazzinelli, líder do grupo de Imunopatologia do Instituto René Rachou (FIOCRUZ-MG), pela infraestrutura do laboratório e colaborações na área endêmica de malária.

Aos amigos do laboratório de Imunopatologia, obrigada pela amizade e companheirismo. Em especial, ao Bruno Rocha, Bruno Galvão e Guilherme, obrigada por todas cervejas e conversar jogadas foras na mesa do bar. À Larissa e à

Fernanda, obrigada pela amizade e por todos os almoços juntas. À Clecinha, obrigada por simplesmente ter existido. À Paty e Naty (George) por nunca deixarem a distância diminuir nossa amizade. À Marinex e a Biazuda pela nossa amizade que sinceramente é melhor do que respirar. E por último, mas não menos importante, à Fabi, obrigada por todo carinho comigo durante esses anos, serei eternamente sua pupila.

Ao Instituto René Rachou – FIOCRUZ-MG e às plataformas de citometria de fluxo e PCR (PDTIS); Em especial a Tiza, por sempre ser paciente e não reclamar quando eu esquecia de mandar os resultados. Meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Luiz Hildebrando Pereira da Silva e aos doutores Mauro Tada e Dhelio Pereira pela colaboração e por possibilitar o acesso aos pacientes e a utilização das estruturas laboratoriais do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM) e FIOCRUZ- Noroeste.

Ao Prof. Ricardo Gonçalves, pelas discussões e colaboração. E à Profa. Andrea Teixeira pelo carinho com o qual sempre me tratou e por toda ajuda profissional durante minha formação. E claro, por confiar em mim para utilizar o ImageStream. Ao Prof. Olindo Assis pela colaboração e por demonstrar novas formas de usar o Excel que eu não achava ser possível.

Ao Prof. Fabiano Oliveira do National Institutes of Health (NIH) pela colaboração e auxílio na análise e experimentos utilizando nanostring nCounter.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Vacinas (INCTV), pelo suporte financeiro que permitiu o desenvolvimento desse projeto.

A todos os pacientes que apesar de estarem passando mal, concordaram em participar desse projeto. Obrigada por acreditarem que estávamos trabalhando a fim de melhorar a qualidade de vida de vocês.

Acredito que o apoio profissional que recebi foi imprescindível para a realização desse trabalho, mas tão importante quanto foi o apoio emocional. Por isso que deixar registrado meus agradecimentos àquelas pessoas que não participaram diretamente no desenvolvimento desse trabalho, mas sem os quais eu não conseguiria tê-lo finalizado.

Aos meus pais, por todo apoio e amor incondicional durante toda a minha vida, sem os quais eu não seria quem sou hoje. Amo vocês eternamente.

A toda minha família, por compreender minha ausência em muitos momentos para que esse trabalho fosse concluído.

Aos meus amigos da vida, do crossfit, da célula, do colégio, da faculdade, aos meus bichinhos e a todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

*“A ciência serve para nos dar uma ideia de quão extensa  
é a nossa ignorância”.*

**Félicité Robert de Lamennais**

“Qualquer coisa que você faça será insignificante, mas é muito importante que você faça”.

**Mahatma Gandhi**

## RESUMO

Em grande parte das infecções parasitárias, existe uma relação dinâmica entre o agente etiológico e o sistema imunológico do hospedeiro, cujo equilíbrio, se alterado, pode influenciar o prognóstico da doença. Na infecção malárica, o *Plasmodium spp.* desencadeia a produção de altos níveis de citocinas inflamatórias que são essenciais para o controle do parasito, mas também são responsáveis pelos sintomas da doença. Nosso grupo demonstrou que os monócitos desempenham um papel importante na proteção contra o *P. vivax*, constituindo uma importante fonte de citocinas inflamatórias e de espécies reativas de oxigênio. A fim de modular a inflamação, citocinas anti-inflamatórias também são produzidas. Estudos sugerem que as diferentes apresentações clínicas dos pacientes com malária causada pelo *P. vivax* estão fortemente associadas a um desequilíbrio no balanço entre citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias. Apesar dos avanços no entendimento acerca dos mecanismos protetores e imunopatológicos, pouco é sabido em relação a manutenção desse equilíbrio durante a malária. O presente estudo demonstrou que durante a infecção pelo *P. vivax*, há uma reprogramação no metabolismo dos monócitos e a mitocôndria desempenha um papel central nesse fenômeno. Essa transição consiste em um aumento da captação de glicose, bem como na produção de ATP via glicólise. Essas alterações estão associadas a aumento no potencial de membrana mitocondrial, favorecendo a produção de mROS. Esse mecanismo pode estar envolvido no controle do parasito, visto que a mitocôndria é capaz de migrar para o fagolisossomo contendo o Pv-RET e produzir mROS. Por outro lado, os monócitos também atuam na modulação dessa resposta inflamatória. Essas células expressam níveis mais altos de ectonucleotidases em relação aos demais leucócitos, indicando um importante papel na modulação do ATP extracelular e conseqüentemente, na produção de adenosina. Apesar dos níveis plasmáticos de adenosina terem diminuído em pacientes com malária aguda causada pelo *P. vivax*, os mesmos pacientes exibem uma expressão aumentada de receptores purinérgicos P1 nas subpopulações de monócitos. Ademais, a adenosina aumenta a produção de IL-10 e diminui a de TNF pelos monócitos, sendo esse efeito completamente abolido com o bloqueio do receptor A<sub>2A</sub>. Em conjunto, nossos dados demonstram que os monócitos têm um papel duplo durante a malária causada pelo *P. vivax*, tentando simultaneamente controlar a infecção e a potencial resposta inflamatória deletéria.

Palavras-chave: Malária. Monócitos. Mitocôndrias. Adenosina. Metabolismo.

## ABSTRACT

In most parasitic infections, there is a relationship between the etiologic agent and the host's immune system, whose balance, if altered the prognosis of the disease. During malaria, *Plasmodium spp.* triggers the production of high levels of inflammatory cytokines that are both essential for the control of the parasite and responsible for the symptoms observed during the disease. Our group demonstrated that monocytes play an important role in host defense against *Plasmodium vivax* infection and represent the main source of inflammatory cytokines and reactive oxygen species. In order to modulate inflammation, anti-inflammatory cytokines, such as IL-10, are also produced. Studies suggested that different clinical presentations of malaria are strongly associated with an imbalance in inflammatory and anti-inflammatory cytokines production. Based on that, despite advances in our understanding of the involvement of protective and immunopathological immunity, little is known about maintaining this balance during malaria. The present study demonstrates that during *P. vivax* infection monocyte metabolism is altered with mitochondria playing a major function in this switch. This transition involves a reprogramming in monocyte metabolism in which the cells increase glucose uptake and produce ATP via glycolysis instead of via oxidative phosphorylation (OXPHOS). Moreover, the above changes are associated with altered mitochondrial membrane potential leading to an increase in mROS instead of ATP production, which can be involved in parasite control since these organelles are able to migrate to the phagolysosome containing the *Pv*-RET and produced mROS. On the other hand, monocytes also participate in the modulation of this inflammatory response during malaria. They express higher levels of ectonucleotidases than other leukocytes, indicating their important role in extracellular ATP modulation and consequently in adenosine production. Despite plasmatic levels of adenosine were decreased in patients experiencing acute malaria caused by *P. vivax*, the same patients display an increased expression of P1 purinergic receptors on monocyte subsets. In addition, adenosine increases IL-10 and decreases TNF production by monocytes. Importantly, this effect was completely abolished with the blockage of A<sub>2a</sub> receptor. All together our data show that monocytes have a dual role during malaria caused by *P. vivax*, simultaneously attempting to control the infection and the potential deleterious inflammatory response.

Keywords: Malaria. Monocytes. Mitochondria. Adenosine. Metabolism.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Incidência da malária globalmente.. ..	18
FIGURA 2. Mapa de risco da malária por município de infecção no Brasil.. ..	20
FIGURA 3. Ciclo da malária .....	23
FIGURA 4. Caracterização das subpopulações de monócitos circulantes em pacientes infectados pelo <i>P. vivax</i> .....	28
FIGURA 5. Sinalização de ATP e adenosina extracelular....	40
FIGURA 6. Respiração celular.. ..	47
FIGURA 7. A infecção pelo <i>P. vivax</i> altera o perfil de transcrição de genes envolvidos no metabolismo mitocondrial das subpopulações de monócitos.....	74
FIGURA 8. As subpopulações de monócitos apresentam expressão de genes envolvidos no metabolismo mitocondrial distinta que é intensificada durante a infecção pelo <i>P. vivax</i> .....	76
FIGURA 9. Padrão da expressão gênica mitocondrial nos subtipos de monócitos de doadores saudáveis e indivíduos infectados pelo <i>P. vivax</i> .. ..	77
FIGURA 10. Monócitos aumentam captação de glicose durante a infecção pelo <i>P. vivax</i> ... ..	79
FIGURA 11. Pacientes infectados pelo <i>P. vivax</i> apresentam ATP e FAD diminuídos .. ..	81
FIGURA 12. Níveis de ATP, FAD e NAD/NADH .. ..	82
FIGURA 13. A infecção pelo <i>P. vivax</i> altera características metabólicas de monócitos .. ..	84
FIGURA 14. Genes envolvidos no CAC e CTE possuem transcrição diminuída durante a infecção pelo <i>P. vivax</i> .. ..	86
FIGURA 15. Genes envolvidos no controle antioxidante da mitocôndria e na montagem do complexo TIM, mas não TOM, possuem transcrição diminuída durante a malária <i>vivax</i> .. ..	87
FIGURA 16. <i>Plasmodium vivax</i> altera o conteúdo mitocondrial nos subtipos de monócitos	88
FIGURA 17. <i>Plasmodium vivax</i> altera atividade de NADPH oxidase nos subtipos de monócitos .. ..	90
FIGURA 18. Monócitos de pacientes infectados pelo <i>P. vivax</i> apresentam maior taxa de fagocitose e migração de mitocôndrias do que os de HDs .. ..	92
FIGURA 19. Mitocôndrias migram para o lisossomo contendo o <i>Pv</i> -RET .. ..	94
FIGURA 20. Esquema geral das alterações causadas pelo <i>P. vivax</i> em monócitos. .. ..	96
FIGURA 21. Adenosina no plasma está aumentada em pacientes infectados pelo <i>P. vivax</i> após o tratamento .. ..	102
FIGURA 22. Expressão <i>ex vivo</i> de CD39 em leucócitos circulantes de pacientes infectados pelo <i>P. vivax</i> . .. ..	104
FIGURA 23. Expressão <i>ex vivo</i> de CD39 em leucócitos circulantes de pacientes infectados pelo <i>P. falciparum</i> . .. ..	105

FIGURA 24. Expressão <i>ex vivo</i> de CD73 em leucócitos circulantes de pacientes infectados pelo <i>P. vivax</i> . .....	107
FIGURA 25. Expressão <i>ex vivo</i> de CD73 em leucócitos circulantes de pacientes infectados pelo <i>P. falciparum</i> . ..	108
FIGURA 26. Co-expressão de CD39 e CD73 em leucócitos circulantes de pacientes infectados pelo <i>P. vivax</i> . .....	109
FIGURA 27. Co-expressão de CD39 e CD73 em leucócitos circulantes de pacientes infectados pelo <i>P. falciparum</i> . ..	110
FIGURA 28. A expressão de CD210 em leucócitos circulantes de pacientes infectados pelo <i>P. vivax</i> . ..	112
FIGURA 29. A expressão de CD210 em leucócitos circulantes de pacientes infectados pelo <i>P. falciparum</i> . .....	113
FIGURA 30. <i>Pv</i> -Ret induz a produção de iL-10 por monócitos que expressam altos níveis das ectonucleotidases CD39 e CD73 ..	114
FIGURA 31. As ectonucleotidases CD39 e CD73 exibem colocalização nos subtipos de monócitos ..	116
FIGURA 32. A infecção pelo <i>P. vivax</i> altera a expressão dos receptores de adenosina nos subtipos de monócitos. ..	119
FIGURA 33. A infecção pelo <i>P. vivax</i> não altera a expressão de receptores purinérgicos P2 nas subpopulações de monócitos ..	120
FIGURA 34. As subpopulações de monócitos exibem expressão gênica de receptores purinérgicos P1 e P2 distinta que é intensificada durante a malária ocasionada pelo <i>P. vivax</i> ..	122
FIGURA 35. Padrão da expressão gênica dos receptores adenosina e purinérgicos em subtipos de monócitos de doadores saudáveis e pacientes infectados pelo <i>P. vivax</i> ..	123
FIGURA 36. A adenosina aumenta a produção de IL-10 e diminui a de TNF pelos monócitos de maneira dependente do receptor da adenosina <sub>2A</sub> ..	124
FIGURA 37. A infecção pelo <i>P. vivax</i> altera o metabolismo de monócitos ..	139
FIGURA 38. Adenosina desempenha um papel na modulação da resposta de monócitos durante a infecção pelo <i>P. vivax</i> ..	140

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Resumo da anamnese e exame clínico realizados em pacientes infectados pelo <i>Plasmodium vivax</i> participantes do presente trabalho..	69
TABELA 2. Dados do hemograma realizado em pacientes infectados pelo <i>Plasmodium vivax</i> participantes do presente trabalho..	70
TABELA 3. Dados dos exames bioquímicos realizados em pacientes infectados pelo <i>Plasmodium vivax</i> participantes do presente trabalho.....	71
TABELA 4. Diferenças estatísticas entre a contagem do número de cópias de mRNA nas subpopulações de monócitos de pacientes infectados pelo <i>P. vivax</i> e indivíduos saudáveis..	73
TABELA 5. Resumo da anamnese e exame clínico realizados em pacientes infectados pelo <i>Plasmodium vivax</i> e <i>P. falciparum</i> participantes do presente trabalho.....	99
TABELA 6. Dados do hemograma realizado em pacientes infectados pelo <i>Plasmodium vivax</i> e <i>P. falciparum</i> participantes do presente trabalho ..	100
TABELA 7. Dados dos exames bioquímicos realizados em pacientes infectados pelo <i>Plasmodium vivax</i> e <i>P. falciparum</i> participantes do presente trabalho... ..	101
TABELA 8. Diferenças estatísticas entre a contagem do número de cópias de mRNA nas subpopulações de monócitos de pacientes infectados pelo <i>P. vivax</i> e indivíduos saudáveis... ..	118

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ADP - Adenosina Difosfato (*Adenosine diphosphate*)
- AMP - Adenosina Monofosfato (*Adenosine monophosphate*)
- cAMP - Adenosina monofosfato cíclica (*Cyclic Adenosine monophosphate*)
- ATP - Adenosina Trifosfato (*Adenosine triphosphate*)
- CAC - Ciclo do Ácido Cítrico
- CEMETRON - Centro de Medicina Tropical de Rondônia
- CEPEM - Centro de Pesquisa em Medicina Tropical
- CTE - Cadeia Transportadora de Elétrons
- DAMPs - Padrões Moleculares Associados ao Dano (*Danger Associated Molecular Patterns*)
- DDT - Dicloro-Difenil-Tricloroetano
- DPI - Difenil Iodônio (*Diphenyleneiodonium*)
- GSH – Glutathiona
- HIFs - Fatores Induzíveis por Hipóxia (*Hypoxia-inducible Factors*)
- IFN – Interferon
- LPS – Lipopolissacarídeo
- MFI - Intensidade Média de Florescência (*Median Fluorescence Intensity*)
- mROS - ROS mitocondrial
- NADPH - Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato
- NOX - NADPH oxidase
- OMS - Organização Mundial da Saúde
- PAMPs - Padrões Moleculares Associados a Patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*)
- PBMC - Células Mononucleares de Sangue Periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)
- PBS - tampão fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline*)
- PMF - Força Próton-motriz (*Proton-Motive Force*)
- PRRs - Receptores de Reconhecimento de Padrões (*Pattern Recognition Receptors*)
- ROS – Espécies Reativas de Oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)
- SOD - Superóxido Dismutase
- TIM - Translocase da Membrana Interna (*Translocase of Inner Membrane*)
- TLRs - Receptores Semelhantes à Toll (*Toll-like receptors*)
- TNF – Fator de necrose tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)
- TOM - Translocase da Membrana Externa (*Translocase of Outer Membrane*)
- TRAFs - Fatores Associados ao Receptor TNF (*TNF receptor associated factor*)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>1.1 Malária</b> .....	<b>17</b>
<b>1.1.1 Malária no Brasil</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1.2 Ciclo da malária</b> .....	<b>20</b>
<b>1.2 Imunidade na Malária</b> .....	<b>23</b>
<b>1.2.1 Imunidade inata</b> .....	<b>24</b>
<b><u>1.2.1.1 Monócitos</u></b> .....	<b>25</b>
1.2.1.1.1 Monócitos e imunopatogênese da malária.....	29
<b>1.2.2 Regulação da resposta imune</b> .....	<b>31</b>
<b><u>1.2.2.1 Interleucina-10</u></b> .....	<b>31</b>
<b><u>1.2.2.2 Adenosina</u></b> .....	<b>34</b>
<b>1.3 Metabolismo celular e resposta imune</b> .....	<b>41</b>
<b>1.3.1 Respiração celular</b> .....	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
<b>1.4 Metabolismo e dinâmica mitocondrial</b> .....	<b>47</b>
<b>1.4.1 Espécies Reativas de Oxigênio</b> .....	<b>50</b>
<b><u>1.4.1.1 ROS na Malária</u></b> .....	<b>52</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>54</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>56</b>
<b>3.1 Objetivo Geral 1</b> .....	<b>56</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos 1</b> .....	<b>56</b>
<b>3.3 Objetivo Geral 2</b> .....	<b>57</b>
<b>3.4 Objetivos Específicos 2</b> .....	<b>57</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>58</b>
<b>4.1 População avaliada - critérios de inclusão ou exclusão</b> .....	<b>58</b>
<b>4.2 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico</b> .....	<b>58</b>
<b>4.3 Purificação das subpopulações de monócitos</b> .....	<b>59</b>
<b>4.4 Análise de conteúdo mitocondrial</b> .....	<b>59</b>
<b>4.5 Análise da ativação do complexo NADPH oxidase</b> .....	<b>60</b>
<b>4.6 Detecção de ROS mitocondrial</b> .....	<b>60</b>
<b>4.7 Detecção de ácido ribonucleico (RNA)</b> .....	<b>60</b>
<b>4.8 Purificação de reticulócitos infectados pelo Plasmodium vivax</b> .....	<b>61</b>
<b>4.9 Ensaio de colocalização</b> .....	<b>61</b>
<b>4.10 Dosagem de ATP e FAD</b> .....	<b>63</b>

4.11 Dosagem de NAD/NADH .....	63
4.12 Captação de glicose .....	63
4.13 Análise do metabolismo de monócitos .....	63
4.14 Determinação dos níveis plasmáticos de adenosina .....	64
4.15 Caracterização fenotípica de leucócitos de sangue periférico: expressão do receptor de IL-10 e ectonucleotidases. ....	65
4.16 Análise da produção de citocinas .....	65
4.17 Avaliação da modulação da adenosina .....	65
4.18 Análise estatística.....	Erro! Indicador não definido.
4.19 Comitê de ética .....	Erro! Indicador não definido.
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>68</b>
5.1 População de estudo.....	68
5.2 <i>Plasmodium vivax</i> altera a transcrição de genes nucleares envolvidos no metabolismo mitocondrial .....	72
5.3 Subtipos de monócitos apresentam expressão de genes envolvidos no metabolismo mitocondrial distinta que é intensificada durante a malária causada pelo <i>P. vivax</i> .....	75
5.4 A infecção pelo <i>Plasmodium vivax</i> altera características metabólicas de monócitos.....	78
5.5 Monócitos de pacientes com malária causada pelo <i>P. vivax</i> estão programados para balancear a produção de ATP com a de mROS.....	80
5.6 A transcrição de PKM e SOD2 são induzidas em monócitos de pacientes durante a malária ocasionada pelo <i>P. vivax</i> .....	85
5.7 A infecção pelo <i>Plasmodium vivax</i> altera o conteúdo mitocondrial das subpopulações de monócitos .....	87
5.8 A infecção pelo <i>Plasmodium vivax</i> aumenta a atividade de NADPH oxidase nas subpopulações de monócitos .....	89
5.9 Monócitos de pacientes fagocitam mais Pv-RET que os de HDs.....	90
5.10 Mitocôndrias migram para o fagolissomo contendo Pv-RET e produzem mROS.....	93
5.11 Resumo esquemático dos resultados .....	95
5.12 População de estudo.....	98
5.13 Os níveis de adenosina no plasma aumenta em pacientes infectados pelo <i>P. vivax</i> após o tratamento.....	102

5.14 Leucócitos de pacientes expressam diferentemente a ectonucleotidases CD39 durante a malária causada pelo <i>P. vivax</i> .....	103
5.15 Leucócitos de pacientes possuem distinto padrão da expressão da ectonucleotidase CD73 durante a malária causada pelo <i>P. vivax</i> .....	105
5.16 Linfócitos circulantes de pacientes infectados pelo <i>P. vivax</i> expressam níveis aumentados do receptor de IL-10 em comparação aos indivíduos infectados pelo <i>P. falciparum</i> .....	111
5.17 Monócitos são importantes fontes de IL-10 durante a malária causada pelo <i>P. vivax</i> .....	113
5.18 Monócitos inflamatórios expressam níveis aumentados de ectonucleotidases que não são alterados pela infecção pelo <i>P. vivax</i> .....	115
5.19 <i>Plasmodium vivax</i> altera a transcrição de genes de receptores purinérgicos P1 nas subpopulações de monócitos .....	117
5.20 Subpopulações de monócitos apresentam expressão gênica de receptores purinérgicos distinta que é intensificada durante a malária causada pelo <i>P. vivax</i> .....	121
5.21 Adenosina aumenta a produção de IL-10 e diminui a de TNF por monócitos de maneira dependente de ADORA <sub>2A</sub> .....	124
6 DISCUSSÃO .....	125
7 CONCLUSÕES .....	Erro! Indicador não definido.
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	141

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Malária

A malária, considerada mundialmente como um dos maiores problemas de saúde pública, é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium* [1]. Dentro desse gênero, existem seis espécies capazes de ocasionar a doença em humanos, são elas: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e mais recentemente o *P. knowlesi*, que foi encontrado infectando humanos no sudeste asiático [2], e o *P. simium* identificado como responsável por um surto na região da floresta Atlântica no Rio de Janeiro [3]. As duas primeiras espécies são as de maior importância epidemiológica, sendo o *P. falciparum* considerado a espécie mais letal e encontrado predominante no continente africano e o *P. vivax*, embora relativamente menos perigoso, encontra-se mais difundido pelo mundo [4].

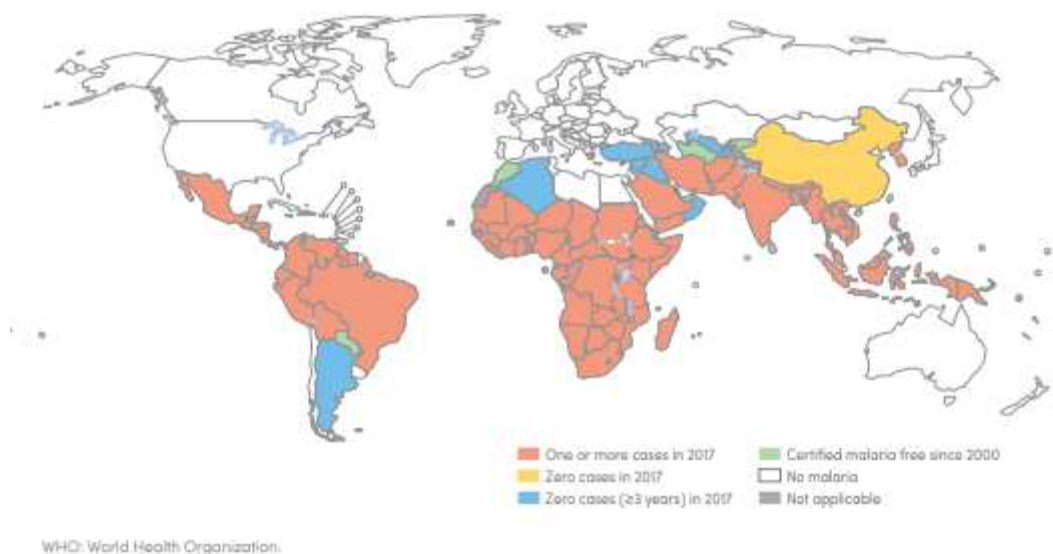
Apesar de sua incidência ter diminuído consideravelmente nos últimos anos, a malária é apontada como uma das doenças mais prevalentes no mundo (**Figura 1**). Em 2017, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que 219 milhões de casos de malária tenham ocorrido em todo o mundo, comparados com 239 milhões de casos em 2010, demonstrando de fato uma diminuição significativa. No entanto, ao compararmos dados de 2015-2017 é importante destacar que não houve um progresso efetivo na redução de casos globais de malária durante esse período [4].

Considerando esse cenário, a taxa de incidência da malária diminuiu de 72 para 59 casos por mil habitantes em risco entre 2010 e 2017. Embora esses dados representem uma redução de 18% nesse período, o número de casos por mil habitantes em risco permaneceu de 59 nos últimos três anos. É válido salientar que somente na região das Américas houve um aumento na taxa de incidência da malária, o que é um reflexo principalmente do aumento do número de casos no Brasil, Nicarágua e Venezuela [4].

Há décadas, diversas ações vêm sendo implantadas, em várias regiões do mundo, visando o controle da doença, porém a malária continua sendo uma das maiores epidemias mundiais e obstáculo ao pleno desenvolvimento econômico de comunidades e nações. O alto número de casos de malária no mundo se deve, em grande parte, ao aumento significativo da resistência dos parasitos aos



medicamentos antimaláricos, ao aparecimento de vetores resistentes aos inseticidas e à escassez de políticas que visem à melhora econômica e social das áreas endêmicas da doença [5].



**Figura 1. Incidência da malária globalmente.** A malária encontra-se restrita a países de clima tropical e subtropical. Em rosa estão representados os países com um caso ou mais de malária no ano de 2017. Em laranja, temos a China que pela primeira vez não registrou nenhum caso de malária no mesmo ano. Em azul, os países sem registro da doença por período igual ou superior a três anos, sendo então considerados livres de malária. Em verde, os países considerados livres de malária desde 2000. Em branco, os países nos quais não há a doença [4].

### 1.1.1 Malária no Brasil

Na década de 1930, o Brasil foi invadido, na região Nordeste, pelo vetor *Anopheles gambiae*, ocasionando um surto de malária grave com taxa de mortalidade de 13% em uma população que, em grande parte, nunca tivera contato com tal doença. Devido ao tráfego marítimo entre o Brasil e Senegal na época, acredita-se que o vetor tenha chegado à América em navios de guerra franceses que realizavam estudos na área [6].

Durante a década de 1950, foi realizada no País uma campanha nacional visando o controle da malária que obteve sucesso, diminuindo significativamente o número de pessoas infectadas. Tal programa baseava-se na pulverização de Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT) nas residências e no uso de cloroquina para tratar os indivíduos que apresentassem febre. Embora tenha conseguido erradicar a malária em grande parte do Brasil, o programa foi ineficiente em conter a

disseminação da doença na região Amazônica, na qual até hoje a malária continua a representar um grave problema de saúde pública [7].

O Programa Nacional de Controle da Malária modificou o foco de ação a fim de diminuir os casos de malária no Brasil. Em vez de dedetização intradomiciliar e do tratamento dos febris, o diagnóstico precoce e o tratamento adequado dos casos foram tidos como prioridade. Além disso, a política visando o aumento do número de postos de saúde capacitados a realizar as ações prioritárias resultou em uma menor proporção de casos de malária *falciparum* [7].

No Brasil, existem quatro espécies do gênero *Plasmodium*: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. simium*, não havendo casos de transmissão autóctone de *P. ovale* e *P. knowlesi* [3,8]. Em 1988, a incidência dos dois principais agentes etiológicos da malária, *P. vivax* e *P. falciparum*, era de aproximadamente 50% de cada espécie. Entretanto, esse quadro se alterou na década de 1990, na qual o *P. vivax* tornou-se a espécie predominante, posição que ocupa até hoje [6].

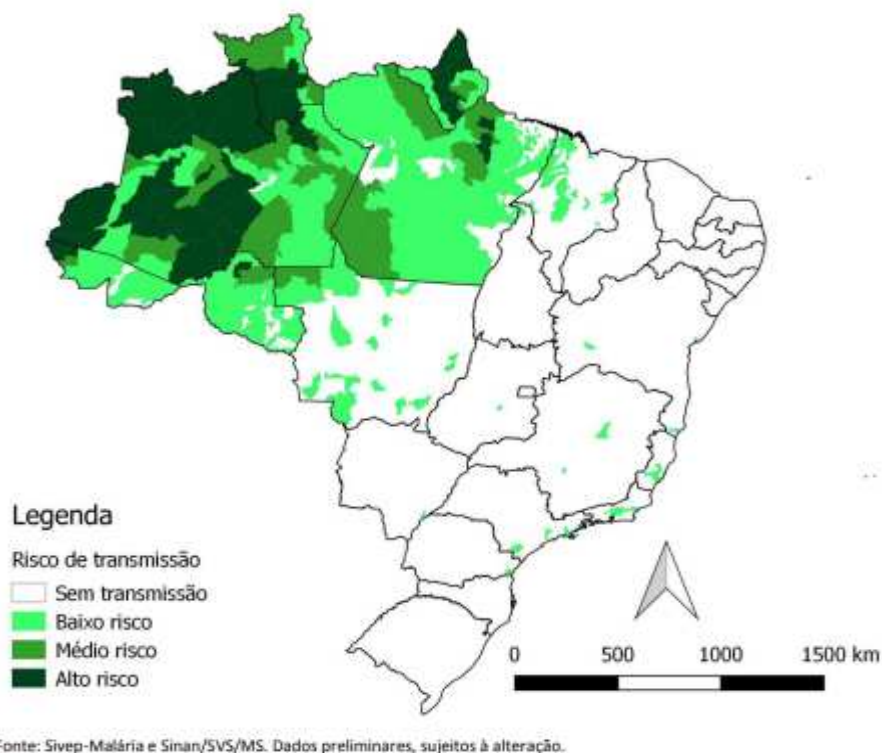
Essa predominância do *P. vivax* no Brasil ocorreu devido à intensificação do controle da doença por meio do diagnóstico rápido seguido de tratamento. Essa estratégia possibilitou eliminar eficientemente os gametócitos do *P. falciparum*, visto que eles aparecem na circulação do hospedeiro vertebrado somente 8-10 dias após a infecção. Os gametócitos de *P. vivax*, por sua vez, atingem a corrente sanguínea em aproximadamente três dias após a infecção, antes de o hospedeiro apresentar sintomas, possibilitando a infecção de novos mosquitos antes mesmo de o diagnóstico ser realizado, dificultando assim o controle da doença [9].

Tradicionalmente, o Brasil tem sido apontado como o responsável por mais da metade dos casos de malária notificados na América Latina. É importante salientar que no Brasil, os casos encontram-se restritos basicamente a região da Amazônia Legal (**Figura 2**), composta pelos estados do Amazonas, Acre, Roraima, Amapá, Pará, Tocantins, Rondônia e partes do Mato Grosso e do Maranhão [10].

Em 2016, segundo dados do Ministério da Saúde, dos 81.565 casos notificados até setembro no Brasil, 87,3% tinham como agente etiológico o *P. vivax*, o que significa que nosso País encontra-se em situação epidemiológica peculiar, sendo, portanto um dos poucos países do mundo a apresentarem uma predominância do *P. vivax* [1,8]. Embora as infecções pelo *P. vivax* sejam consideradas mais brandas

quando comparadas as de *P. falciparum*, é imprescindível citar que relatos de malária grave causada pelo *P. vivax* vêm sendo descritos na região Amazônica [11,12,13].

**Mapa de risco da malária por município de infecção, Brasil, 2017.**



**Figura 2. Mapa de risco da malária por município de infecção no Brasil.** A incidência de malária no Brasil é predominante na região Amazônica. Os tons de verdes mais escuros representam áreas de alto risco de transmissão e os tons mais claros áreas com baixo risco. As regiões em branco são áreas sem transmissão da malária [1].

### 1.1.2 Ciclo da malária

O ciclo de vida do *Plasmodium spp.* é extremamente complexo, o parasito apresenta mais de dez estágios celulares de diferenciação e invade pelo menos quatro tipos de células dentro de dois hospedeiros distintos (**Figura 3**) [14,15].

A malária é transmitida para hospedeiros vertebrados durante o repasto sanguíneo da fêmea do mosquito *Anopheles sp.*, desde que essa esteja previamente infectada com parasitos protozoários do gênero *Plasmodium*. Na saliva do mosquito estão presentes esporozoítos que uma vez dentro do organismo vertebrado alcançam a corrente sanguínea, na qual circulam por alguns minutos até chegarem ao fígado, onde invadem os hepatócitos dando início ao ciclo pré-

eritrocítico ou esquizogonia tecidual, caracterizado por ser um período de intensa replicação intracelular clinicamente silencioso [16].

Foi demonstrado que dentro de aproximadamente uma hora após a picada do mosquito, somente um número pequeno de parasitos alcançam os capilares sanguíneos ou vasos linfáticos através de sua própria mobilidade, a grande maioria dos parasitos tornam-se imóveis e permanecem na derme. Os esporozoítos drenados nos vasos linfáticos, ocasionalmente, chegam até o órgão linfoide mais próximo, sendo então fagocitados por células dendríticas e macrófagos, porém uma minoria consegue diferenciar-se parcialmente em estágios exoeritrocíticos. Essas observações demonstram que esporozoítos podem, de fato, migrar para diferentes lugares, além do fígado, liberando antígenos exoeritrocíticos [17,18].

Uma vez nas células hepáticas, o plasmódio permanece dentro de vacúolos parasitóforos e passa por um processo denominado cariocinese, que consiste na multiplicação do material genético sem que ocorra a divisão celular. Como consequência, há a formação de uma célula com vários núcleos denominada esquizonte tecidual. Cada núcleo adquire membrana celular, ocorrendo a diferenciação do parasito em merozoítos [19,20]. O grande número de merozoítos acaba por causar a ruptura do hepatócito e permite que os mesmos alcancem a corrente sanguínea. Nessa etapa do ciclo de vida, o *P. vivax* se destaca por apresentar uma característica biológica única que o distingue do *P. falciparum*, a capacidade de desenvolver formas dormentes nomeadas hipnozoítos que podem se ativar meses ou anos após a infecção, sendo, portanto responsáveis pelas recaídas observadas nos pacientes [15].

Estudos demonstraram, *in vitro* e *in vivo*, que os merozoítos uma vez dentro dos hepatócitos formam uma vesícula denominada merossomo, cuja cobertura é feita pela membrana plasmática do hospedeiro, sequestrando e protegendo os mesmos de mecanismos do sistema imune. Além disso, os merozoítos são capazes de inibir a expressão de moléculas na superfície do merossomo que poderiam servir de sinais de reconhecimento por fagócitos do hospedeiro [21]. Recentemente, um estudo utilizando modelo murino demonstrou que células CD11c<sup>+</sup> derivadas de monócitos são recrutadas para o fígado e fagocitam hepatócitos infectados, em seguida migram para os linfonodos drenantes e apresentam antígenos para células

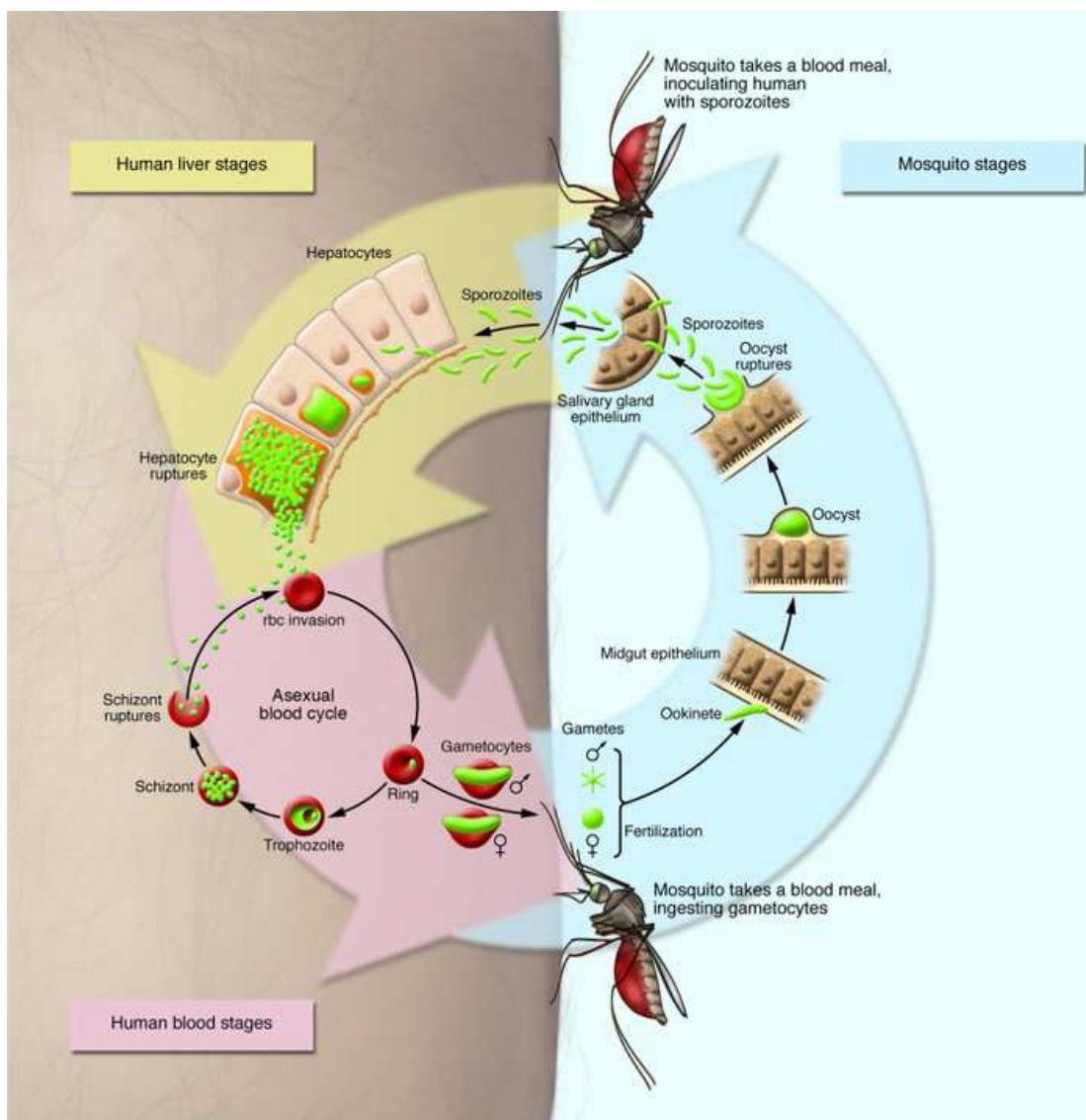
T CD8<sup>+</sup> (*Cluster of Differentiation – CD*) virgens, demonstrando que nessa etapa da infecção a evasão ao sistema imune não é completa [22].

Uma vez na corrente sanguínea, os merozoítos invadem os eritrócitos. Considerando-se o ciclo de vida do *P. vivax*, os reticulócitos são predominantemente, se não exclusivamente, as células a serem invadidas, tornando-se maiores e deformadas. Acredita-se que tal deformação, de alguma maneira, assegura ao parasito uma passagem segura pelo baço [15].

Após um período de intensa reprodução assexuada por esquizogonia, o grande número de merozoítos causa a ruptura dos eritrócitos, fazendo com que os primeiros sejam lançados na corrente sanguínea, promovendo o estágio eritrocítico do ciclo [16]. A liberação de parasitos devido à ruptura dos eritrócitos é percebida clinicamente pelo início do paroxismo malárico, fase na qual os sintomas da doença possuem maior intensidade [8].

Alguns merozoítos se diferenciam em gametócitos imaturos que posteriormente se tornarão gametócitos masculinos e femininos. No caso do *P. vivax*, é válido destacar que nessa fase é possível observar outra característica de extrema importância clínica que o distingue do *P. falciparum*: seus gametócitos se desenvolvem precocemente, podendo ser encontrados na circulação periférica antes ou no início dos sintomas clínicos da doença. Dessa maneira, um indivíduo infectado, porém assintomático, pode não receber o tratamento indicado e passa então a exercer o papel de reservatório para o agente etiológico da infecção [15].

Durante o repasto sanguíneo, o mosquito ingere gametócitos já maduros que se diferenciam em microgameta (masculino) e macrogameta (feminino) que serão fecundados originando a forma móvel denominada oocineto [8]. Esse atravessa o epitélio do intestino e forma o esporocisto, constituído por numerosos esporozoítos originados por esporogonia. Com a ruptura do esporocisto, os esporozoítos alcançam a hemolinfa do inseto e migram para as glândulas salivares, fechando o ciclo de vida do parasito [14,15].



**Figura 3. Ciclo da malária.** O ciclo se inicia durante o repasto sanguíneo de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles* que injetam esporozoítos na derme do hospedeiro vertebrado. Os esporozoítos atingem a corrente sanguínea e alcançam o fígado infectando os hepatócitos. Após milhares de divisões, se diferenciam em merozoítos que acabam por ocasionar a lise do hepatócito e alcançam a corrente sanguínea. Os merozoítos que atingem a corrente sanguínea iniciam o ciclo eritrócito, que consiste em invasão, replicação, lise do eritrócito e liberação de merozoítos, que se repetem a cada 48 horas aproximadamente. Alguns merozoítos se diferenciam em gametócitos masculinos e femininos que serão ingeridos por um mosquito durante o repasto sanguíneo. Após a fecundação e formação do oocineto, o parasita se diferencia novamente em esporozoítos migrando para as glândulas salivares do mosquito finalizando esse complexo ciclo [23].

## 1.2 Imunidade na Malária

Fatores relacionados ao parasito e ao hospedeiro podem influenciar o equilíbrio dinâmico que caracteriza as infecções parasitárias. Nesse contexto, tanto a imunidade inata quanto a adquirida são fundamentais para o controle da infecção malárica. A menos que a infecção seja limitada por mecanismos do sistema imune ou drogas antimaláricas, a parasitemia crescerá de maneira exponencial chegando a

um ponto no qual aproximadamente todos os eritrócitos se encontrarão infectados e a morte dos hospedeiros será inevitável [24].

Mecanismos efetores da imunidade inata e adquirida são capazes de limitar o pico de parasitemia e conseqüentemente evitar a gravidade da doença, reduzindo o número de eritrócitos infectados circulantes. Entretanto, esses mecanismos, tipicamente, falham em eliminar a infecção por *P. vivax* completamente, permitindo que uma baixa quantidade de parasitos permaneça no organismo, persistindo por meses ou até anos [25]. Entretanto, os motivos pelos quais a resolução completa da doença não é alcançada ainda não são bem esclarecidos [26,27].

Em regiões com alta incidência de malária, a doença sintomática é prevalente em crianças mais jovens, enquanto as crianças mais velhas e os adultos, tipicamente, encontram-se protegidos da infecção ou não apresentam sintomas da mesma [28]. Por outro lado, em áreas de transmissão baixa e sazonal, como é o caso do Brasil, a doença é comumente instável, podendo ser sintomática em todas as faixas etárias. Tais diferenças são devidas a imunidade naturalmente adquirida por esses indivíduos e o principal marcador dessa proteção é o alto nível de anticorpos específicos para merozoítos circulantes [29,30].

Nessa conjuntura, apesar de se acreditar que a resistência clínica a doença é eventualmente adquirida com a exposição acumulativa ao parasito, a resistência à infecção *per se* é raramente alcançada. Assim, a aquisição de imunidade contra a malária em seres humanos é complexa, envolvendo primeiramente a resistência contra formas graves, seguida da resistência à malária não complicada e raramente resistência à infecção [31].

Quando os indivíduos deixam a área endêmica sua imunidade contra formas graves da doença parece persistir, por sua vez, a imunidade contra casos não complicados de malária diminui com o passar dos anos [32,33,34,35]. Sugerindo que a malária induz apenas uma memória imunológica de curto prazo [36].

### **1.2.1 Imunidade inata**

Durante a malária causada pelo *P. vivax*, o sangue é o principal tecido afetado, visto que o sequestro de parasitos para outros tecidos não é um evento central nessa infecção. Quando ocorre a ruptura dos reticulócitos e conseqüente liberação de merozoítos na corrente sanguínea, vários componentes do parasito são

reconhecidos por receptores do sistema imune inato levando a ativação dos leucócitos [39,40].

A ruptura dos reticulócitos é tipicamente acompanhada por febre, náuseas, dores de cabeça e outros sintomas devidos à resposta de citocinas pró-inflamatórias produzidas em sua maioria por células do sistema imune inato, tais como Interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12(p70), interferon (IFN)- $\gamma$  e fator de necrose tumoral (*Tumoral Necrosis Factor* - TNF) [26,46,47]. Nesse contexto, é fundamental destacar que mediadores inflamatórios vêm sendo repetidamente relacionados à gravidade da malária, o que corrobora com a ideia de que, pelo menos em parte, o sistema imune seja responsável pelos sintomas observados durante a doença [24,48].

A infecção pelo plasmódio induz uma forte resposta imune inata pelo hospedeiro na fase sanguínea que é necessária para iniciar a imunidade protetora adquirida, mediada principalmente por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e anticorpos [49,50,51]. Além disso, as respostas imunes inatas são essenciais para limitar a fase inicial de replicação do parasito durante a malária, controlando a primeira onda de parasitemia e permitindo ao hospedeiro tempo para desenvolver respostas adaptativas específicas [24].

Trabalhos utilizando modelos animais e em humanos demonstram um papel para várias células do sistema imune inato no reconhecimento do estágio sanguíneo da doença, promovendo inflamação, inibindo o crescimento do parasito e moldando a resposta imune adaptativa. Incluindo monócitos/macrófagos [48,52,53], mastócitos [54], neutrófilos [55,56], células NK (*Natural Killers*) [57], NKT e linfócitos T  $\gamma\delta$  [58,59].

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que os monócitos desempenham um papel fundamental na resposta inflamatória contra o *P. vivax*, além de apresentarem capacidade fagocítica contra o parasito, encontram-se altamente ativadas durante a doença e produzem altos níveis de citocinas pró-inflamatórias [52,60].

### **1.2.1.1 Monócitos**

Tratam-se de leucócitos mononucleados, equipados com uma variedade de PRRs, que fazem parte do sistema imune inato e compõem uma das primeiras populações celulares a atuar na defesa do organismo contra patógenos [66,67]. Em



condições inflamatórias, uma das principais funções dos monócitos é a sua capacidade de renovação de células dendríticas (*Dendritic Cells* – DCs) e de macrófagos teciduais [68,69,70,71]. No entanto, estudos têm demonstrado que além de originar outros tipos celulares teciduais, os monócitos atuam como células efetoras inatas da resposta inflamatória contra micro-organismos. Nessa circunstância, suas funções são inúmeras, incluindo, por exemplo, a morte de patógenos por meio da fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species* - ROS), óxido nítrico, mieloperoxidase e citocinas inflamatórias [52,60,72,73]. Além dessa atuação direta contra micro-organismos, os monócitos desempenham um papel importante na polarização e expansão de linfócitos, contribuindo na resposta de células T primárias e de memória em humanos e camundongos [61,68,74,75,76,77].

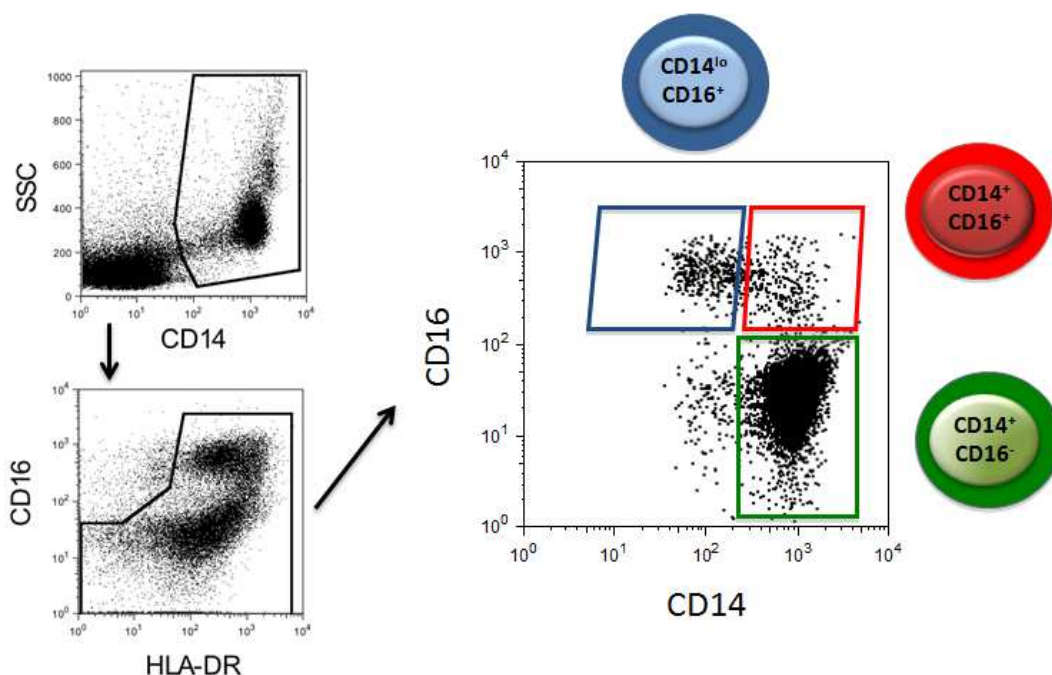
Os monócitos formam uma população de células heterogênea, com variadas funções, fazendo com que sua caracterização e fenotipagem sejam dificultadas. Em camundongos, existem duas subpopulações de monócitos que podem ser discriminadas pela expressão variada do antígeno linfocitário 6C (*Lymphocyte Antigen 6 Complex* – Ly6C) [78,79].

Monócitos expressando altos níveis de Ly6C (monócitos Ly6C<sup>high</sup>) têm funções pró-inflamatórias e antimicrobianas e expressam altos níveis de CCR2 (*C-C Chemokine Receptor Type 2*) e baixos níveis de receptor de quimiocina CX3CR1 (*CX3C Chemokine Receptor 1* - CX3CR1) [68]. Esses monócitos inflamatórios transitam entre a medula óssea e a corrente sanguínea e constituem uma pequena população de leucócitos circulantes em condições de homeostase. Após a infecção, no entanto, a saída de monócitos da medula óssea para a corrente sanguínea é aumentada e mediada pela interação CCR2-CCL2 (*C-C Motif Chemokine Ligand 2*) [79]. Esses monócitos Ly6C<sup>high</sup> são capazes de transportar antígenos ao linfonodo e de se acumular nos locais de inflamação, onde podem se diferenciar em macrófagos ou células dendríticas, dependendo do microambiente de citocinas [75,80]. Os monócitos Ly6C<sup>low</sup>, também conhecidos como monócitos patrulhadores, por sua vez, patrulham o endotélio dos vasos sanguíneos e estão envolvidos com respostas precoces à inflamação e reparação tecidual. Estes monócitos alternativos expressam altos níveis de CX3CR1 e baixos níveis de CCR2 (CX3CR1<sup>high</sup>CCR2<sup>low</sup>) [78].

A dicotomia de subconjuntos de monócitos observada em camundongos também está presente em humanos e é classificada com base nos níveis de expressão de CD14, um componente do complexo receptor lipopolissacarídeo (LPS), e CD16, o receptor de imunoglobulina FCγRIII [81]. A população de monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> é capaz de produzir IL-10 e baixos níveis de TNF *in vitro*. Já os monócitos CD16<sup>+</sup> são os principais produtores de citocinas inflamatórias, como o TNF e IL-1β quando estimulados com LPS [82].

Dados da literatura mostram que a subpopulação de monócitos CD16<sup>+</sup> ainda é heterogênea [83]. Cros e colaboradores (2010) subclassificaram a população de monócitos CD16<sup>+</sup> em duas subpopulações de acordo o nível da expressão de CD14: CD14<sup>++</sup>(*high*) CD16<sup>+</sup> e CD14<sup>+</sup>(*low*) CD16<sup>+</sup>. Os últimos são denominados não clássicos (ou patrulhadores), sendo responsáveis por patrulhar o endotélio dos vasos sanguíneos, mas não são bons fagócitos e não produzem espécies reativas de oxigênio ou citocinas em resposta a estimulação com agonistas de *TLR* de superfície. No entanto, em resposta aos agonistas de TLR7 e 8, esses monócitos são capazes de produzir TNF, IL-1β, e CCL3 [84].

Dessa maneira, os monócitos circulantes de humanos foram divididos em três subpopulações: monócitos clássicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>), inflamatórios ou intermediários (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) e patrulhadores ou não clássicos (CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>) (**Figura 4**) [66,84]. Monócitos clássicos humanos são análogos aos monócitos Ly6C<sup>high</sup> murinos, que são CCR2<sup>high</sup>CX3CR1<sup>low</sup>, e monócitos não clássicos representam um subconjunto semelhante aos monócitos Ly6C<sup>low</sup> e CX3CR1<sup>high</sup>CCR2<sup>low</sup> murinos [84].



**Figura 4. Caracterização das subpopulações de monócitos circulantes em pacientes infectados pelo *P. vivax*.** As subpopulações de monócitos são distinguidas baseando-se na expressão de CD14 e CD16. Em verde estão representados os monócitos clássicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>), em vermelho os monócitos inflamatórios ou intermediários (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) e por último, em azul os monócitos patrulhadores (CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>) [52].

A subpopulação de monócitos inflamatórios ou intermediários em humanos foi proposta como sendo composta por células em transição entre os monócitos clássicos e os não clássicos. Essas células exibem função fagocítica e efeitos anti-inflamatórios, produzindo também níveis mais altos de IL-1 $\beta$  intracelular e TNF no estado homeostático [85,86]. A identificação dessa população de monócitos intermediários, que possui características de monócitos clássicos e não clássicos [84,85,87], contribuiu para o conceito de que as subpopulações de monócitos circulantes em humanos possuem um desenvolvimento celular relacionado entre si [78].

O perfil de expressão gênica dessas subpopulações demonstrou aumento na expressão de genes associados à maturação, indo de monócitos clássicos para monócitos intermediários e monócitos não clássicos [85]. Numerosos estudos observaram aumentos nos monócitos CD16<sup>+</sup> circulantes em doenças cardiovasculares, trauma, sepse e autoimunidade [88,89,90,91], sugerindo que essa resposta de maturação/polarização pode ser um mecanismo importante na regulação das respostas imunes e, em alguns casos podem contribuir para a

patogênese da doença. De fato, diferentes níveis de subpopulações de monócitos foram correlacionados com maus prognósticos em diversas doenças [92,93,94].

Considerando-se o âmbito da malária, nosso grupo de pesquisa demonstrou que as subpopulações de monócitos encontram-se diferentemente ativadas durante a infecção pelo *P. vivax*, expressando diferentes níveis de moléculas de ativação e de adesão, bem como de receptores de quimiocinas [52].

#### 1.2.1.1.1 Monócitos e imunopatogênese da malária

No contexto de uma infecção contínua por parasitos da malária, a frequência relativa de monócitos na circulação periférica reflete a capacidade de um indivíduo em desenvolver uma resposta imune efetiva, visto serem componentes essenciais da resposta imune inata e formarem um elo com o sistema imune adaptativo, principalmente através da apresentação de antígenos aos linfócitos. Dessa maneira, qualquer fator que perturbe a função ou frequência relativa desse tipo celular pode afetar potencialmente a resposta de um indivíduo à infecção malárica [95].

Vários estudos demonstraram o papel dos monócitos durante a malária. Por exemplo, no modelo murino de malária, o *P. chabaudi* induz a emigração de monócitos da medula óssea. Esse fenômeno foi demonstrado ser dependente de CCR2 e a ausência desse ocasionou um aumento da parasitemia dos animais infectados. Durante a infecção, essas células foram responsáveis pela produção de óxido nítrico sintase induzível (*Inducible Nitric Oxide Synthase* - iNOS) e ROS [49]. Dessa maneira, esses estudos evidenciam que os monócitos são um componente de defesa imediata contra patógenos, sendo importantes no controle da infecção pelo plasmódio [48,66].

Na malária, para que ocorra o controle do parasito, são desencadeadas respostas essencialmente inflamatórias, que também são responsáveis pelos sintomas observados durante a doença [39,40]. Assim, os monócitos provavelmente desempenham um importante papel na defesa do hospedeiro contra a infecção pelo plasmódio, uma vez que são os principais produtores de citocinas pró-inflamatórias [60]. As respostas das citocinas na malária são extensivamente estudadas, porém qual é o perfil de citocinas que leva à proteção e não à patologia ainda não foi determinado. Acredita-se que o momento e a magnitude da produção de citocinas são fatores cruciais que podem influenciar a resolução da infecção [96,97].

A fagocitose de eritrócitos infectados por monócitos é uma forma eficaz de reduzir a parasitemia. Todavia, a eficiência de fagocitose de eritrócitos pode diferir entre os indivíduos, resultando em graus variados de proteção e susceptibilidade à malária. Um importante fator que regula a eficiência fagocítica de monócitos é disponibilidade de opsoninas, tais como fragmentos do complemento e anticorpos que se ligam aos eritrócitos infectados e aumentam a interação desses com os receptores dos monócitos [97]. Os monócitos podem também atuar no controle do parasito através da inibição celular dependente de anticorpos (*Antibody-Dependent Cellular Inhibition* - ADCI), que parece ser um importante mecanismo de proteção associado à redução da carga parasitária [98].

O recrutamento e ativação de monócitos são essenciais para a eliminação da infecção pelo *Plasmodium spp.*, porém essas células também têm sido associadas com uma maior gravidade da doença [40,97]. Em pacientes infectados com malária, ambos os eritrócitos infectados e não infectados podem apresentar certas anormalidades que serão reconhecidas pelos monócitos incitando a fagocitose [99]. Além disso, o estado altamente ativado de monócitos em indivíduos infectados pode contribuir para o aumento da atividade fagocítica dos mesmos, ocasionando à perda acelerada de eritrócitos [16]. O papel de vários mediadores produzidos por monócitos na patogênese da anemia da malária grave foi recentemente revisado [100]. Entre estes, o TNF e o óxido nítrico se mostraram associados à supressão da eritropoiese na medula óssea [101].

Nosso grupo de pesquisa demonstrou, na malária causada pelo *P. vivax*, que os monócitos dos pacientes apresentam um perfil de ativação diferenciado durante a fase aguda da doença. Há uma diminuição na expressão de HLA-DR (*Human Leukocyte Antigen*) (molécula de ativação) que pode refletir a ativação dessas células, PECAM-1 (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule – 1*) (moléculas de adesão) e CCR7 (receptor de CCL19 e CCL21) e um aumento de ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*), VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Protein 1*) (moléculas de adesão) e CX3CR1 (receptor da fractalquina). Além disso, todas as subpopulações de monócitos apresentam um perfil fenotípico distinto, sendo que os monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> e CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> apresentam um perfil mais inflamatório que os patrulhadores [52].

É importante destacar que os monócitos inflamatórios apresentaram um aumento de suas funções efectoras *in vitro*, tais como fagocitose e morte do parasito, sugerindo que eles sejam fundamentais no controle da parasitemia e na resistência do hospedeiro à infecção pelo *P. vivax* [52].

### **1.2.2 Regulação da resposta imune**

Na maioria das infecções parasitárias, existe uma relação dinâmica entre o agente etiológico e o sistema imunológico do hospedeiro, cujo equilíbrio, se alterado, pode influenciar na progressão da doença [24]. Assim, o equilíbrio entre uma resposta imune inflamatória e uma resposta imune reguladora é rigorosamente controlado, de maneira a possibilitar o controle eficaz da carga parasitária, limitando simultaneamente os danos ao hospedeiro [102].

A infecção pelo *Plasmodium spp.* desencadeia a produção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Esses mediadores são essenciais para o controle do parasito, mas também são responsáveis pelos sintomas observados durante a doença [26,46,47], destacando assim o papel crítico desempenhado por esse equilíbrio entre respostas imunes pró e anti-inflamatórias na progressão da malária. Para que esse equilíbrio de fato ocorra, é necessário o estabelecimento de redes imunorreguladoras que controlem o momento e a magnitude da resposta imune desencadeada pelo plasmódio que está diretamente relacionada ao melhor ou pior prognóstico do paciente [12,50,103,104,105].

Muitas moléculas e células contribuem para o funcionamento dessas redes imunorreguladoras. No entanto, o entendimento em relação a como essas redes se desenvolvem após a infecção pelo *Plasmodium spp.* e como são mantidas após a resolução da doença ainda é incompleto [103]. Nesse contexto, a IL-10 se destacou como uma importante molécula reguladora produzida durante a malária.

#### **1.2.2.1 Interleucina-10**

Atualmente, é amplamente reconhecido que muitas das complicações graves oriundas de diferentes infecções resultam da ativação exarcebada do sistema imunológico. Nesse contexto, estudos demonstraram que o controle máximo de patógenos, refletido por uma resposta imune inflamatória robusta, não significa, necessariamente, um dano mínimo decorrente da doença, destacando assim, o

papel essencial dos componentes imunorreguladores na limitação de patologias [106,107,108].

A IL-10 emergiu como um imunorregulador importante durante infecções causadas por diversos patógenos. Essa citocina atua impedindo a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- $\gamma$  e TNF, que são responsáveis por grande parte dos efeitos imunopatológicos associados a infecções causadas por *Toxoplasma gondii* [106,109], *Trypanosoma spp.* [107] e *Plasmodium spp.* [110,111]. Entretanto, a produção excessiva de IL-10 pode resultar em efeitos deletérios ao hospedeiro, uma vez que ao inibir a resposta pró-inflamatória contra diversos patógenos [112,113,114,115], incluindo os agentes etiológicos da malária [12,104,116,117], pode favorecer o desenvolvimento de infecções mais graves e duradouras. Em conjunto, esses estudos indicam que a resolução de infecções requer uma resposta imune finamente coordenada, na qual mecanismos pró-inflamatórios eliminam o patógeno e são modulados, posteriormente, pela IL-10, antes da resposta imune ocasionar danos graves aos tecidos do hospedeiro. Assim, o momento e as quantidades relativas de produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias são fundamentais para que haja uma resolução segura da infecção [105,118].

Nesse cenário, a ausência de IL-10, em algumas infecções, pode levar a uma eliminação mais eficaz e mais rápida do parasito sem causar danos colaterais mediados pelo sistema imunológico do hospedeiro [119,120]. No entanto, durante outras infecções, a falta de IL-10 é acompanhada por efeitos imunopatológicos, mas sem necessariamente afetar a carga parasitária [106,108,121], sugerindo que a ausência de IL-10 nem sempre é compensada por outro mecanismo regulador [122].

A IL-10 atua de várias maneiras na regulação da resposta imune, seja regulando diretamente a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias ou atuando indiretamente no controle da expressão de MHC de classe II e de moléculas co-estimuladoras em células apresentadoras de antígenos [121,123,124]. Trata-se de um citocina que é secretada por uma variedade de células, incluindo linfócitos B, Th1, Th2, Th17 e Treg, além de células da imunidade inata, como monócitos, macrófagos e células dendríticas [125]. Estudos *in vitro* mostram que tanto macrófagos quanto células dendríticas expressam IL-10 após ativação de PRRs específicos. Já foi relatado a contribuição de TLR2, TLR4 e TLR9, bem como de

mecanismos independentes de TLRs, na produção de IL-10 por células da imunidade inata, principalmente macrófagos e células dendríticas [126,127,128,129].

Os efeitos da IL-10 na produção de citocinas e na funcionalidade de macrófagos humanos são geralmente similares àqueles ocorridos em monócitos, embora de maneira menos pronunciada [130,131]. Há a inibição da produção de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18, TNF, dentre outras por monócitos e macrófagos ativados [124,132,133,134]. Os efeitos de IL-10 em relação a produção de IL-1 e TNF são primordiais para sua atividade anti-inflamatória, visto que essas citocinas frequentemente atuam em sinergia amplificando a resposta de vias inflamatórias, por meio da indução da síntese de mediadores secundários, tais como quimiocinas e prostaglandinas [121]. A IL-10 também inibe diretamente a produção de quimiocinas dos tipos CC e CXC em monócitos ativados [135,136], agindo, portanto, na inibição da maioria das quimiocinas envolvidas no processo inflamatório [121]. Importante destacar que IL-10 não só inibe a produção desses mediadores inflamatórios, como também aumenta a produção de seus antagonistas [137,138,139].

A dualidade da IL-10 na manutenção de uma resposta imune protetiva e eficaz é bem exemplificada na malária. Estudos utilizando modelo experimental da malária relataram um papel claro da IL-10 no controle das respostas inflamatórias e consequente prevenção de danos teciduais. Por exemplo, foi demonstrado que camundongos com deficiência de IL-10 infectados pelo *P. chabaudi chabaudi* AS apresentaram sintomas exarcebados da doença, incluindo hipoglicemia, hipotermia e perda acentuada de peso corporal, juntamente com um aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias [108]. Esse ambiente altamente inflamatório propicia o sequestro de parasitos para o cérebro, condição associada ao desenvolvimento de edemas e hemorragias cerebrais. Também foi relatado que a IL-10 desempenha um papel protetivo na malária cerebral experimental causada pelo *P. berghei* ANKA [140]. De maneira interessante, em uma infecção letal pelo *P. yoelli*, a produção de IL-10 e TGF- $\beta$  foi correlacionada com alta parasitemia e anemia grave nos animais [116,141]. Dados semelhantes foram encontrados em um estudo utilizando camundongos infectados pelo *P. chabaudi adami* [142]. Sendo assim, os dados obtidos em modelos experimentais indicam que a IL-10 é necessária para proteger os tecidos do hospedeiro contra a infecção, mas ao fazê-lo pode promover um



aumento na replicação de parasitos e das consequentes manifestações clínicas associadas.

Em seres humanos, achados semelhantes foram encontrados. Verificou-se que os polimorfismos do gene *IL10* associados à alta produção de IL-10 correlacionou-se com um aumento no risco de crianças menores de 2 anos desenvolverem malária clínica [143]. Em concordância com esses dados, também foi demonstrado que tanto os níveis de IL-10 quanto TNF encontravam-se elevados em pacientes com malária grave e se correlacionavam positivamente com a parasitemia [144]. No entanto, outros estudos relatam associações diferentes. Por exemplo, foi demonstrado que crianças africanas com anemia grave apresentaram níveis plasmáticos mais baixos de IL-10 do que pacientes com anemia moderada, sugerindo que a IL-10 desempenha um papel importante na prevenção da anemia grave [145]. Outro estudo mostrou que níveis plasmáticos mais altos de IL-10/TNF foram fortemente associadas à proteção contra anemia grave da malária, fornecendo evidências de que a IL-10 pode ser protetora por inibir a atividade do TNF [146]. Assim, a IL-10 parece desempenhar um papel crítico na regulação dos efeitos patogênicos do TNF durante a malária, mas ao desempenhar esse importante papel, pode promover infecções de alta densidade que podem resultar em outras complicações [103]. De maneira interessante, na malária causada pelo *P. vivax* foi demonstrado que a secreção de moléculas imunoreguladoras pode ser influenciada tanto pela parasitemia quanto pelo número de episódios prévios da doença [147]

Em conjunto esses dados destacam a IL-10 como uma molécula imunoreguladora crítica que desempenha papéis positivos e negativos durante a infecção causada por diferentes espécies de plasmódio [103]. Sendo assim, estudos que visem a identificação de subpopulações de células que produzem essa citocina, bem como outros fatores responsáveis por sua produção são de extrema importância no contexto de doenças parasitárias, principalmente na malária.

#### **1.2.2.2 Adenosina**

Em 1929, foi descrito, pela primeira vez, que um nucleosídeo de purina denominado adenosina poderia atuar como uma molécula de sinalização extracelular, aumentando o fluxo sanguíneo coronário, diminuindo a frequência cardíaca e a pressão sanguínea em cachorros anestesiados [148]. Com o passar dos anos, outros papéis foram atribuídos a adenosina, incluindo a supressão da

ativação de leucócitos tanto em camundongos quanto em humanos [149,150,151]. Assim como a IL-10, a adenosina também é uma importante molécula que vem sendo frequentemente implicada no controle da resposta inflamatória do hospedeiro à infecções, a fim de evitar lesões teciduais [102]. De maneira interessante, esse papel regulador da adenosina dá-se principalmente em função da sua associação com a produção de IL-10 [152].

Trata-se de um nucleosídeo, formado pela união de uma base nitrogenada de adenina e uma molécula de ribose, cuja produção é proveniente da catabolização de adenosina trifosfato (ATP) extracelular pelas ectonucleotidasas CD39 e CD73 [153,154]. Em muitos casos, os eventos de sinalização purinérgicos são desencadeados pela liberação do ATP intracelular para o meio extracelular. Considerando que a concentração intracelular de ATP é relativamente alta [155], não é de surpreender que muitas formas de estresse celular, tais como hipóxia, estresse mecânico, inflamação ou invasão por patógenos, ocasionem essa liberação, seja por lise celular ou por mecanismos não líticos [156,157,158,159,160].

Uma vez liberado no compartimento extracelular, o ATP, bem como o ADP, atuam como agonistas nos receptores purinérgicos P2 [155]. Os receptores P2 podem ser classificados em receptores P2Y acoplados à proteína G ou em canais iônicos dependentes de ATP, denominados receptores P2X [161]. O ATP extracelular pode também ser hidrolisado à adenosina. Esse processo ocorre em duas etapas separadas, sendo cada reação controlada por uma ectonucleotidase específica (**Figura 5**). O primeiro passo para a produção de adenosina, consiste na desfosforilação do ATP extracelular a ADP e em seguida a AMP, pela enzima NTPDase1 (CD39). A expressão de CD39 foi estudada exaustivamente em várias células de camundongos e humanos, incluindo neutrófilos, monócitos, células B, NK, NKT e linfócitos T [162,163,164,165], sendo essa expressão regulada por citocinas pró-inflamatórias, estresse oxidativo e hipóxia [157,166,167].

O segundo e último passo consiste na desfosforilação de AMP produzindo adenosina, essa reação é catalizada pela enzima ecto-5'-nucleotidase (CD73) [102,157,168,169,170,171]. CD73 é a enzima limitadora da taxa de produção de adenosina, sendo expressa em muitas células e tecidos imunes, tais como células T, mielóides, células estromais da medula óssea, células epiteliais tímicas e células B [172,173]. Estudos sugerem que a expressão e função dessa enzima geralmente

encontram-se superreguladas durante hipóxia, bem como pela presença de citocinas pró-inflamatórias [166,171,174]. Embora também existam vias alternativas para a produção extracelular de adenosina [175,176], a produção dependente de CD73 é frequentemente considerada a reação principal durante condições inflamatórias ou isquêmicas [177,178,179]. O papel dessas ectonucleotidasas no contexto imunológico é tão importante que qualquer alteração desse mecanismo pode modificar o prognóstico de muitos eventos fisiopatológicos [157].

Além das células do hospedeiro, muitos patógenos estão armados com a maquinaria do tipo CD39/CD73, que pode auxiliar na colonização e disseminação de patógenos [180,181,182,183]. Um estudo sugeriu que os patógenos produzem adenosina a partir do AMP via adenosina sintase A (AdsA), uma ectonucleotidase extracelular expressa na superfície da parede celular de bactérias, permitindo a evasão dos mesmos ao sistema imunológico do hospedeiro [182]. Além disso, foi demonstrada a existência de uma enzima bacteriana, semelhante ao CD39 humano, crítica para a multiplicação intracelular de *Legionella pneumophila* [184,185]. Mais recentemente, foi relatada uma segunda NTPDase do tipo eucariótica, Lpg0971, de *L. pneumophila*, que permite ao patógeno hidrolisar o ATP dentro de um compartimento intracelular [186]. Essas evidências sugerem que patógenos podem manipular as vias de sinalização da adenosina do hospedeiro em seu benefício, como uma estratégia para subverter o sistema imunológico [102]. Apesar desse papel pró-infecção observado em alguns casos, em certas situações CD39 e CD73 atuam controlando infecções e inflamações excessivas, bem como a mortalidade associada as mesmas [187,188].

O eixo CD39/CD73 ganhou importância crescente devido ao seu papel crítico no controle inflamatório *in vivo* [187,189,190,191]. Dessa maneira, a via CD39/CD73, através de sua atividade coordenada, regula a duração da sinalização purinérgica em resposta a várias condições extracelulares. Nesse contexto, assim como ocorre para IL-10, há uma dualidade no papel da adenosina. Embora ela atue no controle do dano tecidual mediado pelas respostas imunes inflamatórias do hospedeiro, é possível que também possa contribuir para que haja certo grau de imunossupressão. Sendo assim, durante uma infecção, a adenosina pode prejudicar o hospedeiro, diminuindo a resposta antimicrobiana protetora, elaborada principalmente para combater o patógeno durante os estágios iniciais da infecção.

Ao mesmo tempo, ela é importante para controlar a inflamação exacerbada durante a infecção aguda que pode ser prejudicial ao hospedeiro [102]. Sendo assim, a concentração de adenosina extracelular também deve ser regulada a fim de modular os seus efeitos imunossupressores. Nesse contexto, a indução da enzima adenosina desaminase (ADA) representa um importante regulador negativo dos níveis extracelulares de adenosina e conseqüentemente, atua modulando a estimulação dos receptores de adenosina [192].

As numerosas respostas mediadas pela adenosina atuam por meio de quatro receptores de superfície denominados purinérgicos P1, são eles:  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  e  $A_3$  [102]. Essa divisão dos receptores foi primeiramente proposta em 1979 baseada na observação de que a adenosina poderia inibir ou estimular a atividade da adenililciclase em cultura de célula nervosas [193]. Dessa maneira, esses receptores funcionam principalmente através da inibição ou estimulação da adenililciclase para diminuir ou aumentar os níveis intracelulares de cAMP. Os receptores  $A_1$  e  $A_3$  atuam diminuindo os níveis de cAMP, enquanto os receptores da família  $A_2$  os aumenta [154,157,194]. Apesar da existência dos receptores específicos é importante destacar que a adenosina também pode entrar nas células por meio de transportadores passivos e ativos, exercendo seus efeitos de maneira independente dos receptores [171,195].

De maneira geral, a sinalização da adenosina visa evitar a inflamação excessiva, suprimindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, inibindo a entrada de leucócitos nos tecidos através da regulação negativa de moléculas de adesão e quimiocinas, e por fim, desencadeando a produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 [196,197,198]. O acúmulo extracelular de adenosina em resposta à danos teciduais é um importante evento no controle da reparação tecidual. Sendo assim, a natureza da ação da adenosina depende da magnitude da concentração de adenosina extracelular, bem como da expressão de cada subtipo dos receptores de adenosina nos diferentes tipos celulares [199].

A geração de modelos de camundongos deficientes para genes de receptores de adenosina forneceu um papel exclusivo dos receptores  $A_2$  em vários modelos de inflamação aguda e de lesão tecidual. Camundongos deficientes para o receptor  $A_{2A}$  apresentaram um aumento drástico no dano tecidual acompanhado pela presença prolongada de citocinas pró-inflamatórias em comparação aos animais selvagens.

Nesse estudo, doses sublimiáres de estímulos inflamatórios, que não causam lesões em camundongos selvagens, induziram extensa lesão hepática e níveis elevados de citocinas em camundongos deficientes. Em concordância com esses dados, efeitos semelhantes foram observados após a injeção do antagonista do receptor  $A_{2A}$ , ZM241385, em camundongos selvagens. Esses animais desenvolveram graves danos teciduais em resposta a doses sublimiáres dos estímulos inflamatórios, sugerindo, assim, um papel não redundante *in vivo* do receptor  $A_{2A}$  na regulação da inflamação [154,200,201,202].

Considerando o papel da adenosina em células do sistema imunológico, vários estudos vêm demonstrando o papel dos receptores de adenosina em macrófagos e monócitos, tanto em humanos quanto em modelos animais. Por exemplo, foi demonstrado que o  $IFN-\gamma$  regula positivamente a expressão do receptor  $A_{2B}$  em macrófagos [203,204,205]. De maneira semelhante, o LPS parece estimular a expressão do receptor  $A_{2A}$  em macrófagos murinos e humanos, como um mecanismo de regulação da produção de TNF por essas células [204,205], visto já ter sido extensamente mostrado que a ligação da adenosina aos receptores  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  inibe a produção de TNF [206,207,208,209] e aumenta a liberação de IL-10 [210,211,212] por macrófagos. Em relação ao receptor  $A_3$ , foi descrito que o uso de glicocorticóides aumenta a sua expressão e conseqüentemente a sobrevivência de macrófagos anti-inflamatórios [213], e que sua ativação ocasiona a secreção de metaloproteínase-9 de matriz por macrófagos [214]. É importante destacar que os macrófagos são capazes de hidrolisar o ATP extracelular liberados por eles mesmos, produzindo adenosina, evidenciando um importante mecanismo autorregulador dessas células [215].

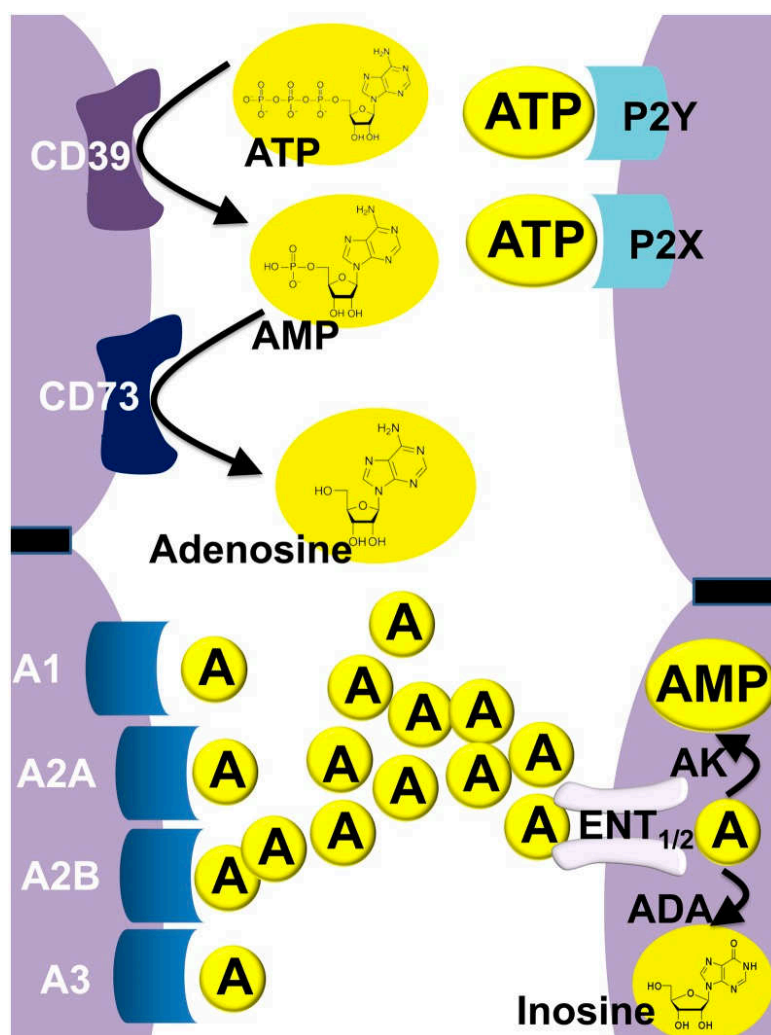
Em monócitos, foi demonstrado que a ativação dos receptores  $A_1$  aumentou a fagocitose mediada pelo receptor  $Fc\gamma$ , enquanto os receptores  $A_2$  a reduziram [216]. Tanto o receptor  $A_{2A}$  como o  $A_{2B}$  estão envolvidos na inibição da secreção de TNF por monócitos [217]. Além disso, a ativação de  $A_{2A}$  também estimula a produção de IL-10 e inibe a de IL-12 por monócitos humanos [217,218], de maneira dependente de cAMP [219], além de inibir a produção de IL-18 induzida por LPS [220]. Foi também demonstrado que cAMP extracelular é capaz de modular o fenótipo, função e diferenciação de monócitos através da ação de CD73 e dos receptores de adenosina  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$ . Esse processo induziu a diferenciação de monócitos em

células dendríticas com capacidade reduzida em polarizar células T CD4<sup>+</sup> virgens em linfócitos produtores de IFN- $\gamma$  [221]. Considerando esses estudos, fica claro que o papel da adenosina na modulação da inflamação estéril tem sido uma área de pesquisa ativa. No entanto, a relevância da sinalização do eixo CD39/CD73 e do receptor de adenosina na defesa contra a patógenos recebeu menos atenção [102].

Diante dessa defasagem, estudos recentes têm focado em definir o papel do sistema CD39/CD73 e dos receptores de adenosina em infecções, causadas principalmente por bactérias e vírus. Foi demonstrado, por exemplo, que camundongos que superexpressam CD39 humano nos epitélios das vias aéreas aumentaram a resposta inflamatória e a eliminação bacteriana na infecção por *Pseudomonas aeruginosa*. Os autores especularam que a superexpressão da ectonucleotidase reduziu o nível de ATP extracelular, limitando a dessensibilização dos receptores purinérgicos P2, que atuam desencadeando a inflamação das vias aéreas em resposta a bactérias [188]. Outro trabalho, utilizando *Escherichia coli* demonstrou que a produção de IL-10 por macrófagos, desencadeada pela adenosina, ocorria principalmente por meio do receptor A<sub>2A</sub>, enquanto o receptor A<sub>2B</sub> desempenhava um papel menor nesse processo. De maneira interessante, esse efeito se mostrou independente da ativação de TLR4 [212]. Apesar do foco nos efeitos anti-inflamatórios ocasionados pela adenosina, é importante destacar que em 2008, foi demonstrado pela primeira vez o que o receptor A<sub>2B</sub> poderia desempenhar um papel pró-inflamatório na colite desencadeada pela infecção por *Salmonella typhimurium* [222].

Na infecção por citomegalovírus, foi demonstrado que o aumento na produção de adenosina, associado à regulação positiva na expressão de ectonucleotidases, produz um ambiente imunossupressor, facilitando a invasão celular pelo vírus [223]. Além disso, o relato de aumento na expressão de CD39 em linfócitos de indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) indica um papel potencial das ectonucleotidases na disfunção imune relacionada a essa doença [224]. Em protozoários, um estudo utilizando diferentes espécies de *Leishmania spp.* demonstrou que a ativação do receptor A<sub>2B</sub> durante a infecção por *Leishmania amazonensis*, mas não por *L. major* e *L. braziliensis*, é responsável, pelo menos em parte, pelo efeitos inibitórios causados pelo parasito em células dendríticas [225].

A maioria das pesquisas relacionadas à adenosina concentra-se no estudo dos receptores ou das ectonucleotidases, devido a quantificação da adenosina ser limitada e dificultada, principalmente por restrições técnicas e pela meia-vida extremamente curta dessa molécula [226]. Trabalhos que dosaram os níveis plasmáticos de adenosina em humanos estavam interessados, principalmente, em mensurar seus níveis homeostáticos [227,228,229], bem com defini-la como um biomarcador para doenças cardiovasculares [229,230,231,232]. Sendo assim, trabalhos que se disponham a dosar os níveis de adenosina são de suma importância para compreendermos a importância dessa molécula em outros contextos fisiopatológicos.



**Figura 5. Sinalização de ATP e adenosina extracelular.** Durante situações de estresse celular ocorre a liberação de ATP para o meio extracelular. O ATP extracelular pode sinalizar via receptores purinérgicos P2, especificamente através dos receptores da família P2X ou P2Y. Além disso, pode atuar como principal precursor metabólico para a geração de adenosina extracelular, através da ação das ectonucleotidases CD39 e CD73. De maneira semelhante ao ATP, adenosina atua como

ativador direto dos receptores purinérgicos P1:  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  e  $A_3$ . A sinalização da adenosina é encerrada pela atuação da enzima adenosina deaminase (ADA) que gera inosina, ou pela adenosina quinase (AK) que transforma adenosina novamente em AMP [155].

### 1.3 Metabolismo celular e resposta imune

Durante a ativação da resposta imune, os leucócitos passam de um estado metabólico relativamente quiescente para uma fase caracterizada por um metabolismo altamente ativo [233]. Para que essa conversão ocorra é necessário que a célula passe de um estado catabólico para anabólico. No primeiro, macromoléculas são completamente degradadas e transportadas através de vias que geram energia a fim de produzir ATP e manter a homeostase celular. Por outro lado, durante o anabolismo, o metabolismo celular é reorganizado com a finalidade de balancear a produção de ATP com a produção de metabólitos intermediários que são requeridos para síntese *de novo* de macromoléculas [234].

A resposta desenvolvida pelas células imunes, tipicamente, envolve mudanças em sua expressão gênica, resultando na aquisição de novas funções, tais como a alta produção de citocinas, mediadores lipídicos, dentre outras. Há uma crescente apreciação do fato de que as transições entre estados quiescentes e ativados exigem a distribuição de nutrientes em diferentes vias e, portanto, há um forte interesse em entender como essas vias metabólicas são reguladas para apoiar ou direcionar as mudanças funcionais observadas nas células imunes [233,235].

Nesse contexto, é interessante ressaltar que há muito tempo se sabe que, ao contrário das bactérias ou leveduras, que respondem diretamente aos nutrientes em seus ambientes, as células de mamíferos devem ser instruídas por fatores de crescimento, a fim de utilizar eficientemente esses nutrientes [235]. Um exemplo clássico disso no sistema imunológico é como a IL-2 promove a expressão do transportador de glicose e, como tal, direciona efetivamente as células T ativadas para um metabolismo glicolítico [236,237,238].

A necessidade de produzir ATP como fonte de energia para a manutenção da função celular é, obviamente, essencial tanto nas células quiescentes como nas ativadas. Dessa maneira, o esperado é que as células possuam diversas vias que levem a produção de ATP, sendo que a atividade entre diferentes vias metabólicas será influenciada pela disponibilidade relativa de nutrientes e oxigênio no ambiente



[233,235]. A maioria dos seres vivos utiliza a respiração celular a fim de produzir ATP e suprir as necessidades celulares [239].

### **1.3.1 Respiração celular**

Algumas células obtêm energia química na forma de ATP através do processo de fermentação, degradando a glicose na ausência de oxigênio [240]. Todavia, a maioria das células eucarióticas e muitas bactérias, que vivem em condições aeróbias, oxidam os compostos orgânicos completamente gerando CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono) e H<sub>2</sub>O (água). Essa fase aeróbia do catabolismo é denominada respiração. No sentido fisiológico mais amplo, a respiração se refere à captação de O<sub>2</sub> (oxigênio) e eliminação de CO<sub>2</sub> por organismos multicelulares. Entretanto, bioquímicos utilizam esse termo para referirem-se ao processo molecular no qual as células consomem O<sub>2</sub> e produzem CO<sub>2</sub>, nomeando-o respiração celular (**Figura 6**) [241].

A respiração celular acontece em três fases principais. A primeira consiste na oxidação de moléculas combustíveis orgânicas – glicose, ácidos graxos e alguns aminoácidos – até compostos de dois carbonos na forma de grupo acetil da acetil-coenzima A (acetil-CoA) [239,241]. A glicose é comumente utilizada para alimentar esse processo através da glicólise, atividade que envolve a conversão de glicose em piruvato no citoplasma celular [102].

A glicose ocupa uma posição central no metabolismo de diversos seres vivos, uma vez que se trata de uma molécula rica em energia potencial, sendo, portanto um bom combustível para as células; a oxidação completa da glicose a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O gera uma variação da energia livre padrão ( $\Delta G$ ) de -2.840kJ/mol [241]. Entretanto, o metabolismo glicolítico é uma via relativamente ineficiente para a geração de energia química, produzindo apenas duas moléculas de ATP por unidade de glicose. Apesar disso, essa via fornece benefícios importantes para as células, pois além da geração rápida de ATP, também ocasiona a redução de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH), que é usado por inúmeras enzimas como cofator, bem como permite o desvio de produtos intermediários para as vias de crescimento biossintéticos a fim de apoiar o crescimento anabólico [235].

A glicólise parece estar envolvida em vários processos imunológicos, por exemplo, estudos demonstraram que macrófagos e linfócitos T ativados aumentam consideravelmente o consumo de glicose [242,243]. Além disso, trabalhos que

utilizaram um bloqueador da glicólise denominado 2-deoxiglicose (2-DG) mostraram a inibição da ativação de macrófagos *in vitro*, diminuição da inflamação em modelos *in vivo* [244,245] e a conversão de células Th17 (*T helper* – Th) em células Treg (T reguladoras) [246]. O aumento da glicólise pode, portanto, ser considerado uma alteração metabólica marcante na maioria das células imunológicas que sofrem ativação rápida, por exemplo em resposta à estimulação de PRRs, receptores de citocinas ou receptores de antígenos. A glicólise aumentada permite que a célula imune produza ATP e intermediários biossintéticos suficientes para realização de suas funções efetoras particulares [235].

A segunda fase da respiração celular é denominada ciclo do ácido cítrico (CAC), também conhecido como ciclo tricarboxílico ou ciclo de Krebs, na qual os grupos acetil serão oxidados a CO<sub>2</sub> e a energia liberada por essa reação será armazenada nos equivalentes redutores de NADH e dinucleotídeo de flavina e adenina (FADH<sub>2</sub>), que atuam doando seus elétrons para a cadeia transportadora de elétrons (CTE), abastecendo a fosforilação oxidativa (*Oxidative Phosphorylation* - OXPHOS), última etapa da respiração celular [102].

O ciclo do ácido cítrico é um pivô do metabolismo, com vias catabólicas chegando e vias anabólicas partindo, sendo cuidadosamente regulado em coordenação com outras vias [241]. Esse processo ocorre na matriz mitocondrial e é uma das principais vias metabólicas utilizadas na maior parte das configurações celulares não proliferativas ou quiescentes. Em conjunto com a fosforilação oxidativa, o CAC é um modo altamente eficiente de geração de ATP usado por células cujos requisitos primários são energia e longevidade [235].

Ambos foram estudados extensivamente em células imunes. De particular interesse, têm sido realizados estudos relativos ao CAC em subtipos de macrófagos. Nos macrófagos M2, há um CAC intacto acoplado à fosforilação oxidativa [247]. No entanto, nos macrófagos M1, o ciclo mostrou-se quebrado em dois locais - após o citrato (devido a uma diminuição na expressão da isocitrato liase) e após o succinato [247,248]. O citrato que se acumula nos macrófagos M1 é exportado da mitocôndria através do transportador de citrato, sendo então usados na produção de ácidos graxos, que por sua vez são utilizados para a biogênese da membrana celular. O excesso de citrato também pode alimentar vias que geram óxido nítrico e prostaglandinas, moléculas efetoras fundamentais produzidas pelos macrófagos

[249]. O succinato, por sua vez, tem impacto direto na produção de citocinas e de ROS [248,250,251].

Na última fase da respiração celular, as coenzimas reduzidas geradas nas fases anteriores são oxidadas, doando elétrons ao  $O_2$ , acceptor final de elétrons, através da CTE ou cadeia respiratória. Durante a transferência de elétrons através desses complexos enzimáticos constituintes da CTE, gera-se uma grande quantidade de energia que será conservada na forma de ATP, por meio da fosforilação oxidativa [241,252].

A fosforilação oxidativa começa com a entrada de elétrons na CTE, sendo que a maioria desses elétrons surge da ação das desidrogenases que os coletam das vias catabólicas e os canalizam para aceptores universais de elétrons, NADH ou  $FADH_2$ . Além desses, outros três tipos de moléculas carreadoras de elétrons atuam na cadeia respiratória: uma quinona hidrofóbica (ubiquinona) e dois tipos diferentes de proteínas que contém ferro (citocromos e proteínas ferro-enxofre) [252].

A descoberta em 1948 por Eugene Kennedy e Albert Lehninger de que a fosforilação oxidativa ocorre nas mitocôndrias das células eucarióticas foi um marco nos estudos de metabolismo celular. A membrana mitocondrial externa é prontamente permeável a moléculas pequenas e a íons, que se movem livremente por canais transmembrana. A membrana interna, por outro lado, é impermeável à maioria das moléculas pequenas e aos íons, incluindo prótons; as únicas espécies que cruzam a membrana o fazem por meio de transportadores específicos. É justamente nessa membrana que se encontram os quatro complexos da CTE e a ATP-sintase [241].

O primeiro desses complexos é o NADH/ubiquinona oxidorreductase (complexo I) ou NADH-desidrogenase. Trata-se de um complexo enzimático incluindo uma flavoproteína contendo mononucleotídeo de flavina (*Flavin Mononucleotide* – FMN) e pelo menos seis centros de ferro-enxofre. O complexo I catalisa dois processos simultâneos e obrigatoriamente acoplados: (1) a transferência exergônica para a ubiquinona de um íon hidreto do NADH e (2) a transferência endergônica de quatro prótons da matriz para o espaço intermembranas. A ubiquinona, também conhecida como coenzima Q, é uma molécula lipossolúvel que pode aceitar um elétron para se tornar o radical semiquinona ou dois elétrons para formar ubiquinol. Por ser pequena e hidrofóbica ela é livremente difusível dentro da bicamada lipídica da membrana

mitocondrial interna e capaz de movimentar equivalentes redutores entre outros carreadores de elétrons móveis na membrana. O complexo I é, portanto, um bombeador de prótons que utiliza a energia da transferência de elétrons para mover prótons em uma direção específica de um local (a matriz, que se torna negativamente carregada com a saída dos prótons) a outro (o espaço intermembranas que se torna positivamente carregado) [241,252].

Succinato desidrogenase (ou complexo II), única enzima do CAC ligada à membrana mitocondrial, é outro local de entrada de elétrons na cadeia respiratória. Neste caso, os elétrons derivados da oxidação do succinato são passados pelo  $\text{FADH}_2$  para a ubiquinona. Uma vez que a ubiquinona é reduzida ao ubiquinol, esse transfere elétrons para o complexo III, a ubiquinona/citocromo c oxidoredutase. Aqui, os elétrons são movidos através de vários grupos heme a partir da ubiquinona transportadora lipossolúvel para o citocromo c [241].

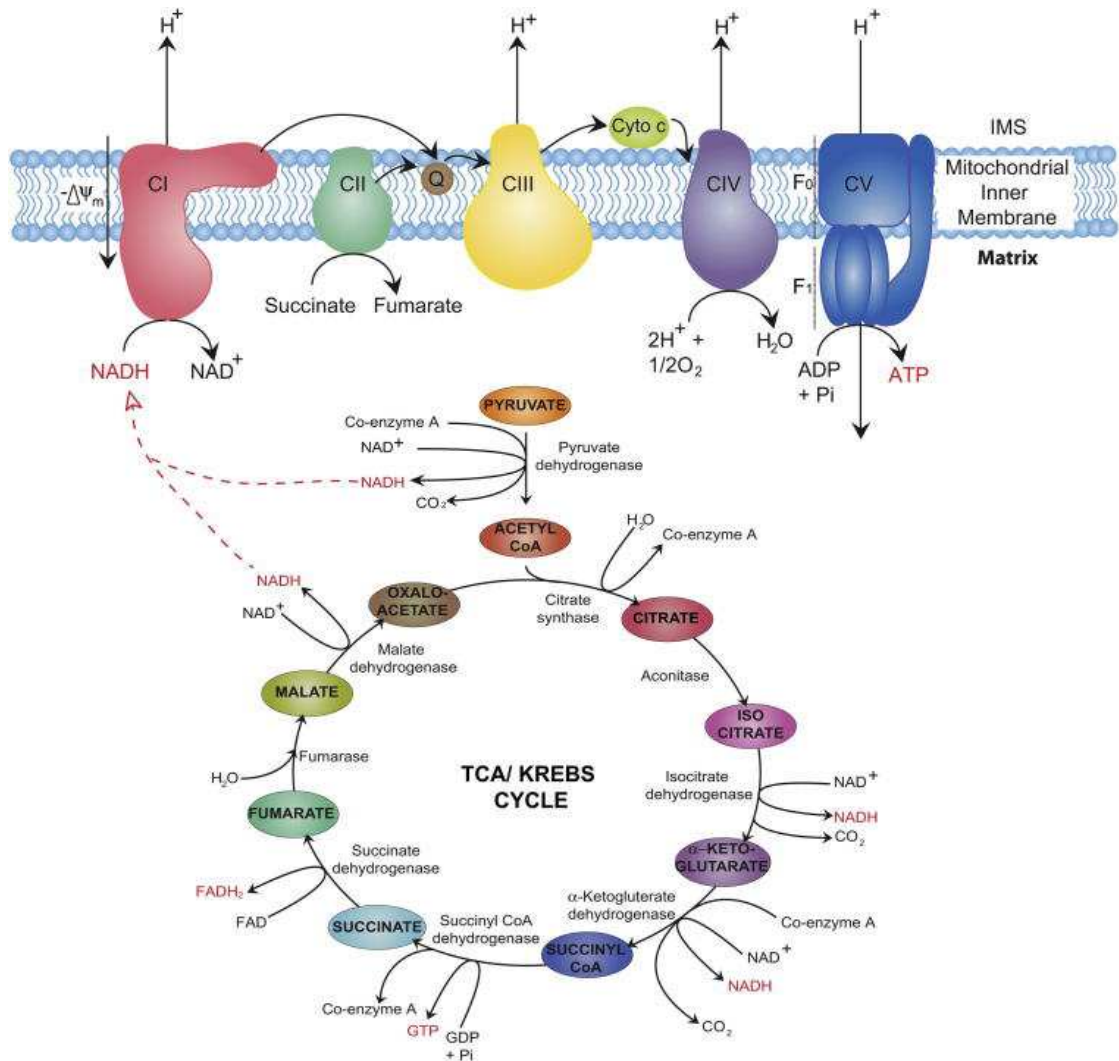
O citocromo c, por sua vez, atua na conexão entre o complexo III e o IV, transferindo os elétrons para o último passo da CTE, o complexo citocromo c oxidase (COX). Esse complexo recebe um elétron de cada molécula de citocromo c e os transfere para uma molécula de oxigênio, convertendo-o assim em duas moléculas de água. Nesse processo, há a translocação de quatro prótons [241].

O complexo da citocromo c oxidase é formado por três subunidades catalíticas codificadas por genes mitocondriais e múltiplas subunidades estruturais codificadas por genes provenientes do ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid* – DNA) genômico. As subunidades mitocondriais atuam na transferência de elétrons e as genômicas, acredita-se, atuam na regulação e montagem do complexo, como é o caso da Cox10 que é importante para a funcionalidade do complexo, uma vez que está envolvida na maturação do grupo prostético heme da enzima e da Cox18 que é essencial para a inserção do complexo na membrana mitocondrial interna, além de ser necessária para a atividade do complexo, visto ser requerida especificamente para que haja o acúmulo de Cox2, umas das subunidades catalíticas [253].

O transporte de elétrons através dos complexos I, III e IV induz o bombeamento de prótons da matriz para o espaço intermembranas. Especificamente, para cada dois elétrons provenientes de uma molécula de NADH, quatro  $\text{H}^+$  são movidos pelo complexo I, quatro pelo complexo III e dois pelo complexo IV, o segundo complexo respiratório não gera movimento de prótons. A

cadeia respiratória em mitocôndrias ativas gera uma grande diferença na  $[H^+]$  em toda a membrana mitocondrial interna, resultando na geração de um potencial elétrico (cerca de -180 a -200 mV) e variação no potencial hidrogeniônico (pH) de cerca de 0,75. Uma força motriz de prótons constante conduz a síntese de ATP através da última etapa da OXPHOS, a ATP sintase [241].

A ATP sintase pode ser dividida em dois componentes principais: F<sub>0</sub>, que permite a canalização de prótons e F<sub>1</sub>, que catalisa a fosforilação do ATP. O F<sub>0</sub> é embutido na membrana mitocondrial interna, enquanto o F<sub>1</sub> reside na matriz mitocondrial e é ligado ao F<sub>0</sub> através de uma subunidade  $\gamma$ , que impulsiona mudanças conformacionais no complexo, e um dímero b<sub>2</sub> $\delta$ , que mantém efetivamente F<sub>0</sub> e F<sub>1</sub> juntos. Os prótons fluem do IMS para a matriz através da F<sub>0</sub> induzindo sua rotação; o movimento é transmitido da subunidade  $\gamma$  para a F<sub>1</sub>, causando rearranjos conformacionais. Essas mudanças sequenciais estão relacionadas à ligação de substratos, fosforilação e liberação de ATP [14]. Foi calculado que, para a síntese de uma molécula de ATP, são necessários quatro prótons (três para os rearranjos da ATP sintase e um para o transporte de ATP, adenosina difostato (*Adenosine Diphosphate* – ADP) e fosfato inorgânico (Pi) [15]). Uma vez sintetizado, o ATP pode localizar-se no interior da matriz mitocondrial ou ser transportado para o espaço intermembranas e posteriormente para o citosol [241,252].



**Figura 6. Respiração celular.** A respiração celular acontece em três fases principais. A primeira baseia-se na oxidação de moléculas até compostos de 2 carbonos na forma de Acetil CoA. A glicose é utilizada nesse processo através da glicólise, que envolve a conversão da glicose em piruvato no citoplasma celular. Esse por sua vez, é convertido em moléculas de alta energia como NADH, GTP e  $FADH_2$  por meio das reações da segunda etapa da respiração celular, o ciclo de Krebs. Por último, acontece a fosforilação oxidativa que consiste na entrada de elétrons na CTE por meio da ação das desidrogenases. A transferência de elétrons através dos complexos da CTE mantém o potencial de membrana mitocondrial via bombeamento de prótons para o espaço intermembranas que gera energia para a fosforilação de ADP a ATP pelo complexo da ATP sintase [254].

#### 1.4 Metabolismo mitocondrial

As mitocôndrias são compostas por dois subcompartimentos: a matriz mitocondrial e o espaço intermembranas. Esses compartimentos são formados pelas duas membranas mitocondriais: a membrana interna, que possui extensas invaginações denominadas cristas, e a membrana externa que está em contato com o citosol [255].

A maior parte das proteínas mitocondriais, incluindo todas envolvidas nos processos de fusão e fissão são provenientes de DNA nuclear [263], dessa maneira, apesar de possuir seu próprio genoma, esse codifica apenas um pequeno número de proteínas mitocondriais, sendo o núcleo responsável pela codificação da grande maioria das proteínas. Aproximadamente 10-15% dos genes nucleares de organismos eucariotos codificam proteínas mitocondriais que são traduzidas em ribossomos no citosol da célula na forma de precursores e se diferenciam em sua forma funcional uma vez dentro da mitocôndria. Sendo assim, a biogênese de proteínas mitocondriais é extremamente dificultada devido à arquitetura da organela [264].

O transporte de proteínas precursoras pela membrana externa da mitocôndria é realizado pelo complexo de Translocase da Membrana Externa (*Translocase of the outer membrane* - TOM). O complexo TOM é responsável por reconhecer as proteínas precursoras no citosol e transportá-las através dos poros da membrana externa da mitocôndria, além de mediar a inserção de algumas proteínas residentes da membrana externa [265].

Esse complexo é formado por diferentes proteínas que atuam de maneiras diversas, por exemplo, Tom34 está envolvida na importação de proteínas precursoras para a mitocôndria, apresenta atividade semelhante à chaperona, se ligando a proteínas não enoveladas auxiliando na importação das mesmas para a mitocôndria [266]. Tom40, por sua vez, é a subunidade formadora do poro do complexo TOM, sendo, portanto essencial para o transporte de proteínas para a mitocôndria [264]. E Tom70, um dos receptores de superfície do complexo TOM, é responsável pelo reconhecimento de proteínas precursoras no citosol para posterior transporte pela membrana externa mitocondrial [265].

Uma vez no espaço intermembranas, as proteínas precursoras precisam ser transportadas através da membrana interna da mitocôndria a fim de alcançar a matriz mitocondrial. Esse transporte é realizado pelo complexo de Translocase da Membrana Interna (*Translocase of Inner Membrane* - TIM). Atualmente, foram identificadas três rotas de importação de proteínas pela membrana interna da mitocôndria, uma que utiliza o complexo TIM22 e duas que utilizam o complexo TIM23 [264]

Assim como o complexo TOM, o complexo TIM é formado por uma variedade de proteínas com funções diversas, tais como a proteína Tim10 que participa da importação e inserção de proteínas hidrofóbicas na membrana mitocondrial interna. O complexo Tim9/Tim10 é essencial para a viabilidade celular, sendo requerido no transporte de ADP para a mitocôndria e exportação de ATP para o citosol [267]. A Tim17 é um componente integral do complexo TIM23 [268], bem como a Tim44 que está envolvida na importação de proteínas para a matriz mitocondrial [269]. Por sua vez, a proteína Tim50 é uma subunidade essencial do complexo TIM23 que interage com o canal do complexo. A ligação de Tim50 a Tim23 antagoniza a ativação e induz o fechamento do canal quando nenhuma proteína está sendo transportada [270].

Historicamente, o papel central da mitocôndria é efetuar a ligação eficiente entre a oxidação de metabólitos através do CAC e a produção de ATP pela CTE. Além disso, outra função primordial, de igual importância desempenhada pela mitocôndria, é a utilização de metabólitos do CAC para a síntese de macromoléculas. Essas duas funções, gerar ATP e suportar a biossíntese, têm que ser cuidadosamente balanceadas a fim de suprir as demandas celulares. Assim, a mitocôndria se destaca no metabolismo celular, sendo capaz de alterar sua função de acordo com as necessidades celulares [234].

Existem vários tipos de mecanismos de transdução de sinal entre a mitocôndria e o restante da célula. Primeiro, a via anterógrada na qual a transdução ocorre do citosol para a mitocôndria. O melhor exemplo para essa via é o rápido sequestro de cálcio para a matriz mitocondrial em resposta a altos níveis de cálcio citosólicos. Esse influxo resulta na ativação de múltiplas enzimas do CAC e da CTE [271]. Segundo, a via retrógrada na qual a sinalização ocorre da mitocôndria para o citosol, sendo o papel de ROS mitocondrial (mROS) na regulação da ativação de fatores induzíveis por hipóxia (*Hypoxia-Inducible Factors* - HIFs) um bom exemplo dessa via [272].

Nesse contexto, é importante ressaltar o papel da mitocôndria na regulação da resposta imune. Por exemplo, foi demonstrado que macrófagos M1 apresentam glicólise robusta mesmo na presença de altos níveis de oxigênio e consomem menos oxigênio quando comparados a macrófagos não polarizados, sugerindo uma dependência mínima do metabolismo mitocondrial [273,274]. Em contraste,



macrófagos M2 apresentam um aumento do consumo de oxigênio. A importância da diferença do metabolismo mitocondrial entre M1 e M2 *in vivo* é corroborada pelo achado que camundongos deficientes em NDUFS4, subunidade do complexo I da CTE, exibem um aumento da polarização para M1 e diminuição para M2 [275].

Os estudos iniciais implicando a mitocôndria como uma organela de sinalização na imunidade inata vieram de observações que LPS sinalizando via TLR4 e TNF através de fatores associados ao receptor TNF (*TNF Receptor Associated Factors* - TRAFs) ativam a produção de citocinas inflamatórias por meio da produção de mROS [276]. Estudos mais recentes demonstraram que a diminuição de mROS afeta a sinalização de múltiplos TLRs e a atividade bactericida em macrófagos [277]. Sendo assim, o papel de mROS na regulação da resposta imune se destaca como um tema emergente que vem sendo continuamente abordado.

#### **1.4.1 Espécies Reativas de Oxigênio**

As espécies reativas de oxigênio desempenham um papel crucial durante o desenvolvimento de respostas imunes contra diversos patógenos, incluindo bactérias e parasitos intracelulares, principalmente através da produção de superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) pela enzima nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (NADPH) oxidase (NOX) [278]. ROS derivadas da NOX são essenciais na defesa do hospedeiro, uma vez que a deficiência em alguns componentes da NOX leva a um fenótipo de alta susceptibilidade a diversas infecções [279,280], sendo, portanto, bem estudadas no contexto de capacidade fagocítica.

Outra fonte importante de superóxido intracelular na maioria das células de mamíferos é proveniente do metabolismo mitocondrial. Essa produção ocorre através da redução de um elétron da molécula de  $O_2$  formando  $O_2^{\cdot-}$ . Sendo assim, fatores cinéticos e termodinâmicos que controlam a interação entre potenciais doadores de elétrons com o  $O_2$  controlam a produção de mROS. O potencial de redução que determina a tendência termodinâmica do  $O_2$  formar  $O_2^{\cdot-}$  varia de acordo com as concentrações dos mesmos [281]. A mitocôndria *in vivo* está exposta a concentrações relativamente baixas de oxigênio que podem variar dependendo do estado fisiológico e do tecido analisado. Isso ocorre, pois o oxigênio mitocondrial *in vivo* é controlado pela concentração de oxigênio extracelular no tecido, que por sua vez é determinado pelo transporte e consumo de oxigênio no local [282].

Atualmente, ROS são consideradas moléculas de sinalização capazes de regular diversas vias fisiológicas, contudo é válido citar que essa não é uma ideia nova. Esse papel para ROS foi proposto na década de 90 quando estudos demonstraram que o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) era importante para a produção de citocinas, insulina, fatores de crescimento e sinalização via fator nuclear kappa B (*Nuclear Factor Kappa B* - NF- $\kappa$ B) [283]. Além disso, o  $H_2O_2$  pode inativar fosfatases por meio da oxidação de resíduos de cisteína, promovendo assim um mecanismo bioquímico plausível pelo qual ROS podem atuar nas cascatas de sinalização [284].

Dessa maneira, uma regulação precisa da produção de mROS é crítica para a manutenção de sua habilidade em atuar em vias de sinalização celular, sendo, portanto, realizada em diversos níveis. Primeiro, a célula possui diversas enzimas com atividade antioxidantes aptas em eliminar ROS, geralmente transformando-as em água, sendo que essa função depende de quão rápido essas enzimas conseguem reagir com ROS e da concentração de ambas, enzima e ROS [285]. Segundo, o ajustamento da produção de mROS é fundamental para alterar a sua capacidade de sinalização. Os maiores determinantes da produção de mROS são o estado redox da CTE e força próton-motriz que é gerada pelo transporte de prótons da matriz para o espaço intermembranas pelos complexos I, III e IV a medida que os elétrons são transferidos através da cadeia respiratória [286].

Por último, a capacidade de sinalização de mROS pode ser alterada pela localização da mitocôndria. ROS são geralmente moléculas de meia-vida curta, sendo assim, a colocalização entre o seu sítio de produção e o sítio de sinalização provavelmente aumenta sua eficiência. Teoricamente, a quantidade de mitocôndria em uma célula pode alterar a quantidade de mROS e sua função intracelular. Entretanto, há também um aumento na produção de enzimas antioxidantes a fim de manter o balanço redox [287]. Assim, a quantidade de mitocôndria não necessariamente correlaciona com a quantidade de mROS.

Hoje se sabe que mROS são biologicamente importantes em uma variedade de sistemas fisiológicos, destacando seu papel na regulação da resposta imune. O papel de ROS mais bem conhecido em células do sistema imune é na morte direta de patógenos por meio da explosão oxidativa mediada por NOX em fagócitos. Entretanto, vários trabalhos vêm demonstrando o papel do mROS na imunidade inata. Por exemplo, macrófagos nocautes para a proteína desacopladora 2

(*Uncoupling Protein 2* - UCP2), proteína responsável pelo transporte de prótons e elétrons através da mitocôndria, produzem mais mROS e eliminam mais eficientemente taquizoítos de *Toxoplasma gondii in vitro*, efeito eliminado com o uso de antioxidantes [288]. Dessa maneira, foi demonstrado que a expressão aumentada de UCP2 correlaciona-se negativamente com a produção mROS [289].

Um estudo mais recente demonstrou o papel de ROS na morte de bactérias, uma vez que monócitos superexpressando a enzima antioxidante catalase apresentavam um comprometimento em sua capacidade de eliminação de *Salmonella typhimurium*. De maneira interessante, esse mesmo estudo também apontou a capacidade das mitocôndrias de migração para os vacúolos contendo a bactéria [277].

#### **1.4.1.1 ROS na Malária**

A função do estresse oxidativo durante a malária ainda não é completamente entendida. Alguns autores sugerem um papel de defesa, enquanto outros relacionam com a fisiopatologia da doença [290]. Entretanto, estudos recentes sugerem que a geração de ROS está associada com o estresse oxidativo, desempenhando um papel decisivo no desenvolvimento de complicações sistêmicas causadas pela malária [291].

Um estudo demonstrou que não há diferença na parasitemia de camundongos infectados por *P. berguei* ANKA/KI73, *P. yoelli*, *P. chabaudi* K562 e *P. vinckei*, quando NADPH oxidase não está presente. Sugerindo que a geração de radicais livres não é devido à explosão respiratória por fagócitos, mas sim pela infecção e talvez pela produção pelo próprio parasito [292].

É importante salientar que a atividade antimalárica de várias drogas utilizadas no controle da doença, por exemplo, o artesunato e seus derivados, envolve o dano ao DNA do parasito mediado por ROS. O uso de antioxidantes, como o manitol, diminuem significativamente esse efeito [293]. Com a finalidade de conter o estresse oxidativo, os parasitos da malária possuem um sistema de proteção antioxidante, incluindo GSH (glutationa), SOD (superóxido dismutase) entre outros [294]. O tratamento com artesunato diminui os níveis de GSH totais do parasito e paralelamente aumenta os níveis de GSH na forma oxidada, indicando um alto estresse oxidativo no parasito [293]. Em conjunto, esses resultados sugerem que

ROS são necessárias para a morte do parasito, mas também participam da patogênese da doença.

Os seres humanos também possuem esse mecanismo de proteção antioxidante, composto principalmente pelas superóxidos dismutases, enzimas que catalisam a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. As principais enzimas são SOD1 e SOD2, sendo SOD1 a principal enzima antioxidante presente no citoplasma da célula e SOD2, encontrada na matriz mitocondrial, responsável pela ação antioxidante contra o alto estresse oxidativo que ocorre na mitocôndria [295].

## 2 JUSTIFICATIVA

Em grande parte das infecções parasitárias, existe uma relação dinâmica entre o agente etiológico e o sistema imunológico do hospedeiro, cujo equilíbrio, se alterado, pode influenciar a susceptibilidade do mesmo e, portanto o prognóstico da doença [24]. Assim, o equilíbrio entre uma resposta imune inflamatória e uma resposta imune anti-inflamatória é minuciosamente regulado, permitindo um controle eficaz da carga parasitária, limitando, simultaneamente, danos teciduais ao hospedeiro [102]. Na infecção malárica, o *Plasmodium spp.* desencadeia a produção de altos níveis de mediadores inflamatórios que são essenciais para o controle do parasito, mas também são responsáveis pelos sintomas observados durante a doença [39,40].

Recentemente, foi demonstrado por nós e outros grupos que células da imunidade inata, como monócitos e neutrófilos, desempenham um papel fundamental nas respostas inflamatória contra o *P. vivax* [52,56,60]. Neste sentido, as funções dessas subpopulações celulares são inúmeras, incluindo, a morte do parasito através da fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio [60,72,296]. Essa resposta imune desenvolvida por leucócitos ocasiona mudanças na expressão gênica dessas células, resultando na aquisição de novas funções [233]. Nessa conjectura, sabe-se que a transição entre o estado quiescente para ativado exige uma redistribuição de nutrientes em diferentes vias e, portanto, é de suma importância compreender como essas vias metabólicas são reguladas a fim de direcionar as mudanças funcionais observadas nas células imunes [233,235].

Por outro lado, com a finalidade de modular a inflamação, citocinas anti-inflamatórias, tais como a IL-10, também são produzidas [122]. Estudos sugerem que as diferentes apresentações clínicas dos pacientes com malária ocasionada pelo *P. vivax* estão fortemente associadas a um desequilíbrio no balanço entre citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, sendo as primeiras predominantes em formas mais graves da doença [103]. Dentro desse contexto, apesar dos avanços no nosso entendimento acerca dos mecanismos envolvendo imunidade protetora e imunopatologia, pouco é sabido em relação aos mecanismos reguladores responsáveis pela manutenção desse equilíbrio durante a malária. Recentemente, pesquisadores demonstraram que a hidrólise do ATP até adenosina, via enzimas ectonucleotidases, faz parte de um mecanismo modulador que limita a resposta

inflamatória em macrófagos [206,207,208,209], principalmente por meio da alta produção de IL-10 [210,211,212].

Dessa maneira, a realização do presente estudo visa auxiliar no entendimento da resposta imune desencadeada pelo *Plasmodium vivax*, aumentando a compreensão a cerca do equilíbrio inflamatório e regulador das respostas imunes de monócitos e conseqüentemente aumentando a compreensão da resistência versus susceptibilidade à malária em indivíduos naturalmente expostos ao *P. vivax*, servindo para o fortalecimento da capacidade local em pesquisa básica e aplicada. Nesse contexto, nossa hipótese é que os monócitos atuam tanto na resposta inflamatória, essencial para controle eficaz do parasito, quanto na modulação dessa, visando diminuir os seus efeitos deletérios. Sendo assim, a fim de facilitar o entendimento do presente trabalho, o mesmo foi dividido em dois objetivos gerais, sendo o primeiro voltado para o estudo do metabolismo mitocondrial de monócitos e o seu papel na resposta imune protetora e o segundo para a modulação da resposta inflamatória mediada pela adenosina.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 *Objetivo Geral 1*

Avaliar se a infecção pelo *Plasmodium vivax* altera o metabolismo mitocondrial das subpopulações de monócitos.

#### 3.2 *Objetivos Específicos 1*

**Objetivo específico 1: Determinar se a malária causada pelo *P. vivax* desencadeia mudanças nas fontes produtoras de ROS em subpopulações de monócitos.**

- Avaliar o conteúdo mitocondrial nos subtipos de monócitos de pacientes na fase aguda da malária e de indivíduos saudáveis;
- Mensurar a ativação do complexo NADPH oxidase em indivíduos infectados pelo *P. vivax* e doadores saudáveis.

**Objetivo específico 2: Determinar o papel de espécies reativas de oxigênio no processo de fagocitose e produção de citocinas por monócitos circulantes de pacientes durante a infecção pelo *P. vivax*.**

- Avaliar a contribuição de ROS na morte do parasito por monócitos após fagocitose de reticulócitos infectados;
- Investigar se a fagocitose de reticulócitos infectados pelo *P. vivax* desencadeia o recrutamento de mitocôndrias para fagossomos.

**Objetivo específico 3: Avaliar o metabolismo mitocondrial em subtipos de monócitos durante a malária ocasionada pelo *P. vivax*.**

- Investigar a transcrição gênica de genes nucleares envolvidos no metabolismo mitocondrial;
- Dosar a produção de ATP extracelular por monócitos;
- Avaliar os níveis de NADH e FADH<sub>2</sub> nas subpopulações de monócitos.

**Objetivo específico 4: Determinar se a malária ocasiona mudanças no metabolismo das subpopulações de monócitos.**

- Avaliar a captação de glicose dos subtipos de monócitos em pacientes infectados pelo *P. vivax* e doadores saudáveis;
- Investigar a transcrição gênica de genes nucleares envolvidos nas vias da respiração celular e metabolismo de lipídios nas subpopulações de monócitos durante a malária causada pelo *P. vivax* e em indivíduos saudáveis.

### **3.3 Objetivo Geral 2**

Avaliar se a adenosina, através da produção de IL-10, desempenha um papel modulador na resposta imune exacerbada desencadeada pela infecção pelo *P. vivax*.

### **3.4 Objetivos Específicos 2**

**Objetivo específico 1: Determinar se a malária causada pelo *P. vivax* desencadeia a produção de altos níveis de IL-10.**

- Avaliar os níveis plasmáticos de IL-10 em pacientes infectados pelo *P. vivax*;
- Avaliar os níveis intracelulares de IL-10 em monócitos de sangue periférico de pacientes infectados pelo *P. vivax*;
- Determinar a expressão do receptor de IL-10 (CD210) em leucócitos do sangue periférico de pacientes infectados pelo *P. vivax*.

**Objetivo específico 2: Determinar se a adenosina desempenha um papel na modulação da resposta inflamatória desencadeada pelo *P. vivax*.**

- Mensurar os níveis plasmáticos de adenosina em indivíduos saudáveis e infectados pelo *P. vivax*;
- Determinar os níveis de expressão das ectonucleotidases responsáveis pela produção de adenosina, CD39 e CD73, em leucócitos, em especial monócitos circulantes, de pacientes na fase aguda da malária;
- Investigar a localização das ectonucleotidases CD39 ou CD73 em subpopulações de monócitos e avaliar a colocalização entre ambas;
- Avaliar a transcrição gênica dos receptores purinérgicos P1 e P2 em monócitos circulantes de pacientes infectados pelo *P. vivax* e comparar com os níveis de doadores saudáveis.
- Determinar a capacidade da adenosina em desencadear a produção de IL-10 por monócitos de pacientes experimentando a fase aguda da malária ocasionada pelo *P. vivax*.



## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 População avaliada - critérios de inclusão ou exclusão**

Os pacientes participantes são provenientes de Porto Velho, RO, e foram selecionados em colaboração com o grupo de pesquisadores e médicos do CEPEM (Centro de Pesquisa em Medicina Tropical) e CEMETRON (Centro de Medicina Tropical de Rondônia). Foram selecionados pacientes residentes em área endêmica que se encontravam na fase aguda da infecção por *P. vivax*. Foram incluídos no estudo indivíduos adultos (idade  $\geq 18$  anos), que não apresentavam nenhuma infecção aguda ou crônica ou gravidez, hematócrito  $< 33$ , eosinofilia  $> 4\%$  e não estavam em tratamento com drogas imunossupressoras. Os indivíduos apresentaram positividade no exame de gota espessa no momento da coleta, sendo o resultado confirmado posteriormente por PCR para *P. vivax*. Os mesmos parâmetros avaliados em pacientes portadores de malária foram avaliados em indivíduos saudáveis, residentes em área endêmica, que não tinham tido a doença pelo menos nos últimos dez anos.

Todos os pacientes incluídos neste estudo foram examinados por médicos especialistas em malária e assinaram termos de consentimento em português, formulado de acordo com as normas da resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Pesquisa do Brasil (CEP-CPqRR 2004/CONEP 15652). Os pacientes foram informados dos objetivos do estudo antes da coleta de sangue. Os pacientes que aceitaram participar voluntariamente da pesquisa puderam se retirar do estudo quando assim o desejaram, sem prejuízo ou danos no atendimento clínico e tratamento terapêutico. O tratamento foi realizado com os medicamentos e dosagens preconizadas pelo Ministério da Saúde recomendado para a malária não complicada causada pelo *P. vivax*. Esse consiste na ingestão de três comprimidos por dia de cloroquina durante 3 dias e de 2 comprimidos por dia de primaquina durante 7 dias, caracterizando o tratamento por esquema curto [8].

### **4.2 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico:**

O sangue periférico de pacientes infectados pelo *P. vivax* e controles saudáveis (HD) foi coletado em tubos de heparina. O mesmo foi diluído em solução salina 0,9% estéril (vol/vol). Após a diluição, 30 ml de sangue foram adicionados delicadamente em um tubo contendo 15 ml de Ficoll Hypaque (GE Healthcare Life Sciences) e as

amostras foram centrifugadas por 40 minutos a 265 g. Foi realizada a coleta da nuvem de células mononucleares de sangue periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells* – PBMC) que foi transferida para um tubo cônico de 50 ml. As PBMC foram lavadas duas vezes com adição 30 ml de solução salina contendo 2% de soro fetal bovino. A concentração celular foi determinada com a utilização de câmara de Neubauer e ajustada de acordo com o ensaio a ser realizado.

#### **4.3 Purificação das subpopulações de monócitos:**

Após separação de PBMC, as células foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-antígenos de superfície celular ( $\alpha$ -CD14 conjugado com APC,  $\alpha$ -CD16 conjugado com PerCP-Cy5.5 e  $\alpha$ -HLA-DR conjugado com APC-eFluor 780), conjugados com fluorocromos de acordo com o citômetro de fluxo utilizado, previamente diluídos em tampão fosfato-salino (PBS) contendo 2% de soro fetal bovino (tampão FACS). A incubação foi realizada durante 30 minutos a 4°C e as células foram lavadas duas vezes por centrifugação por 5 minutos a 350 g com tampão FACS. Em seguida, foi realizada a purificação de subpopulações de monócitos com o emprego do citômetro de fluxo FACSaria II cell sorter (BD Biosciences). A utilização deste equipamento permitiu a purificação das três subpopulações de monócitos: CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> e CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>. Em experimentos específicos, monócitos totais foram purificados através da seleção positiva utilizando microbeads magnéticas  $\alpha$ -CD14, de acordo com as instruções do fabricante (MACS Miltenyi Biotec).

#### **4.4 Análise de conteúdo mitocondrial:**

A análise do conteúdo mitocondrial foi realizada utilizando as sondas MitoTracker Green e MitoTracker Red CMXRos (Life Technologies). De maneira geral, após separação de PBMC, as células foram distribuídas em placas de 96 poços e incubadas durante 15 min, 4°C com o marcador de morte celular Live/Dead (Invitrogen) e em seguida levadas por centrifugação a 630 g, 5 min a temperatura ambiente. Em seguida foi adicionada a sonda MitoTracker Green na concentração de 20nM, ou MitoTracker Red (37,5 nM) por 15 min. Após esse período, as células foram incubadas com anticorpos de superfície  $\alpha$ -CD14,  $\alpha$ -CD16 e  $\alpha$ -HLA-DR durante 30 min a 4°C. Após a lavagem, as células foram adquiridas em citômetro de fluxo LRSFortessa e analisadas utilizando o software FlowJo versão 9.3.2 (TreeStar).

#### **4.5 Análise da ativação do complexo NADPH oxidase:**

A expressão das subunidades do complexo NADPH oxidase, p47phox e p67phox, foi realizada através da marcação das células com anticorpos contra antígenos de superfície  $\alpha$ -CD14,  $\alpha$ -CD16 e  $\alpha$ -HLA-DR durante 30 min a temperatura ambiente. Em seguida as células foram permeabilizadas e fixadas de acordo com as instruções do fabricante (Cytotfix/Cytoperm, BD Biosciences). As células foram marcadas com anticorpos contra os antígenos intracelulares p47phox e p67phox durante 20 minutos. Por último, adicionamos o anticorpo  $\alpha$ -IgG1 conjugado com PE por adicionais 20 minutos. Após a lavagem, as células foram adquiridas em citômetro de fluxo BD FACSCelesta e analisadas utilizando o software FlowJo versão 9.3.2 (TreeStar).

#### **4.6 Detecção de ROS mitocondrial:**

A produção de ROS mitocondrial foi detectada respectivamente através do indicador de superóxido mitocondrial MitoSOX Red (MitoSOX) (Invitrogen) na concentração de 2,5  $\mu$ M. PBMC foram lavadas em PBS e incubadas em meio, *Pv*-RET (1 *Pv*-RET/PBMC). MitoSOX foi adicionado às células durante incubação por 3h à 37°C. As células foram então lavadas e coradas para caracterização de subpopulações de monócitos com os anticorpos  $\alpha$ -CD14 conjugado com APC,  $\alpha$ -CD16 conjugado com PerCP-Cy5.5 e  $\alpha$ -HLA-DR conjugado com APC-eFluor 780, e analisadas por citometria de fluxo LSRFortessa e avaliadas utilizando o software FlowJo versão 9.3.2 (TreeStar).

#### **4.7 Detecção de ácido ribonucleico (RNA):**

As análises de expressão de RNA mensageiro (mRNA) foram realizadas através do método de *Nanostring Technologies*. O Sistema *NanoString nCounter* é uma tecnologia desenvolvida para captura e contagem de moléculas individuais de ácido nucleico em solução que consiste em uma reação não enzimática utilizando sondas fluorescentes. De maneira geral, são utilizadas duas sondas de sequências específicas para cada gene alvo [297].

A primeira sonda, designada sonda de captura, contém de 35 a 50 pares de bases complementares a sequência do mRNA de interesse e uma sequência universal na extremidade 3' acoplada a um marcador (tag), por exemplo biotina. A sonda repórter também consiste de 35 a 50 pares de bases, cuja sequência é

complementar ao mRNA alvo, acoplados a outra tag contendo segmentos de RNA marcados com fluorocromos específicos. A ordem linear dos diferentes segmentos de RNA marcados cria um código de identificação única para cada gene de interesse [297].

Um total de  $1 \times 10^4$  células de cada subpopulação foram lisadas com tampão RLT (Qiagen) suplementado com  $\beta$ -Mercaptoetanol, e em seguida congeladas no freezer  $-80^\circ\text{C}$ . Posteriormente, os lisados celulares foram hibridizados com as sondas repórter e de captura por 16 horas a  $65^\circ\text{C}$  e depois foram colocados em uma plataforma na qual ocorre a separação magnética das sondas hibridizadas, lavagem para remover excessos de sondas e imobilização destas nos cartuchos. Por fim, a quantificação foi realizada no analisador digital utilizando 600 campos para detecção das sondas hibridizadas.

Os dados adquiridos foram normalizados de duas maneiras distintas. A primeira normalização visa às pequenas variações que ocorrem entre os experimentos e consiste na utilização de controles positivos para o teste de eficiência da técnica. Em seguida, os dados são normalizados utilizando sete genes constitutivos para possibilitar comparações entre as amostras.

#### **4.8 Purificação de reticulócitos infectados pelo Plasmodium vivax (Pv-RET):**

Uma fração da camada de eritrócitos obtida da centrifugação do gradiente de densidade utilizando o Ficoll Hypaque foi lavada em PBS. As hemácias foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich) a um hematócrito final de 10%. Cinco mililitros desta suspensão foram sobrepostos a 5 ml da solução de Percoll 45% [2,25 ml de Percoll isotônico (90% Percoll em PBS 10x) e 0,5 ml de RPMI 1640 ( $\times 10$ ) e 2,25 ml de água destilada] em um tubo de 15 ml. Após centrifugação a 800 g durante 10 min, os reticulócitos parasitados pelo *P. vivax* (Pv-RET) foram coletados e suspensos em RPMI 1640. A pureza do enriquecimento de Pv-RET foi avaliada por microscopia ótica.

#### **4.9 Ensaios de colocalização:**

A fim de avaliar a colocalização entre mitocôndrias e fagossomos em monócitos circulantes de pacientes infectados pelo *P. vivax*, os mesmos foram marcados com MitoTracker Green e  $\alpha$ -CD107a (LAMP) conjugado com Brilhante Violeta 450 respectivamente. Os monócitos foram identificados a partir da expressão

de CD14 conjugado com PE-Cy7. Após purificação de monócitos por FACS *sorting*, os mesmos foram distribuídos em placas de 96 poços em meio HBSS e colocados em cultura durante 3 horas na ausência (*Pv*-RET -) ou na presença (*Pv*-RET +) de reticulócitos infectados pelo *P. vivax* marcados com Alexa na proporção 1:1. O LAMP conjugado com Brilhante Violeta 450 e o CD14 conjugado com PE-Cy7 foram adicionados no início da cultura. Após a cultura, as células foram lavadas e ressuspensas em 50 µl de MitoTracker Green (10nM) e incubadas durante 15 minutos. Após esse período as células foram lavadas novamente e ressuspensas em 50 µl de tampão FACS e analisadas no citômetro de fluxo de imagem (ImageStreamX Mark II, Merck-Millipore), que além de gerar imagens de qualidade ainda permite a realização de análises estatísticas.

Para a análise de colocalização de ROS mitocondrial foi utilizada a sonda MitoSox Red. Após purificação de monócitos por FACS *sorting*, os mesmos foram plaqueados em meio HBSS e colocados em cultura durante 3 horas na ausência (*Pv*-RET-) ou na presença (*Pv*-RET+) de reticulócitos infectados pelo *P. vivax* marcados com FITC na proporção 1:1. O LAMP conjugado com Brilhante Violeta 450 e o CD14 conjugado com PE-Cy7 foram adicionados no início da cultura. Nos últimos 30 minutos de cultura foi adicionada a sonda MitoSox Red (2,5 µM). Após o término da cultura, as células foram lavadas novamente e ressuspensas em 50 µl de tampão FACS e analisadas no citômetro de fluxo de imagem (ImageStreamX Mark II, Merck-Millipore). As análises foram efetuadas utilizando o software IDEAS v6.1. Para as análises de colocalização foi utilizada a ferramenta do wizard “Colocalization”

Para as análises de colocalização entre as ectonucleotidases CD39 e CD73, as subpopulações de monócitos purificadas foram colocadas em cultura durante 3 horas na ausência (*Pv*-RET-) ou na presença (*Pv*-RET+) de reticulócitos infectados pelo *P. vivax* marcados com FITC na proporção 1:1. Após a cultura, as células foram lavadas e marcadas com os anticorpos de superfície, α-CD39 conjugado com PE e α-CD73 conjugado com PerCPCy5.5. Após esse procedimento, as células foram lavadas e ressuspensas em 50 µl de tampão FACS e analisadas no citômetro de fluxo de imagem (*ImageStreamX Mark II, Merck-Millipore*). As análises foram efetuadas utilizando o software IDEAS v6.1. Para as análises de colocalização foi utilizada a ferramenta do wizard “*Colocalization*”

#### **4.10 Dosagem de ATP e FAD:**

A dosagem de ATP e FAD no sangue total de pacientes infectados pelo *P. vivax* e indivíduos saudáveis foi realizada com a utilização de kits comerciais (Abcam). Em resumo, 200 µl de sangue foram transferidos para tubos de 5 ml. No caso do ATP, foi adicionado também suramina (200 µM), com o intuito de bloquear a ação da ectonucleotidase CD39 responsável pela hidrólise do ATP até ADP ou AMP. Em seguida, meio RPMI ou reticulócitos infectados ( $4 \times 10^4$ ) foram adicionados e incubados durante 10 min, 1 hora ou 4 horas. Em seguida centrifugamos os tubos e coletamos 100 µl do sobrenadante, precipitamos as proteínas com 100 µl de acetonitrila e misturamos vortex as amostras durante 15 segundos com a utilização de um. Após centrifugação, coletamos o sobrenadante e congelamos até a utilização do kit específico, seguindo as especificações do fabricante.

#### **4.11 Dosagem de NAD/NADH:**

A dosagem de NAD/NADH foi realizada utilizando kit comercial (Abcam). Após purificação de PBMC, cultivamos  $2 \times 10^6$  células na presença ou ausência de LPS durante 4 horas. Após esse período, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 100 µl de tampão de lise (Lysis Buffer), seguindo instruções do fabricante, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o lisado celular foi congelado até a utilização do kit.

#### **4.12 Captação de glicose:**

Para a análise de captação, 90 µl de sangue, coletado em tubos de citrato, foi pipetado em tubos de polipropileno. Foi adicionado 10 µl de 2-NBDG (14,60 µM), em seguida a amostra foi homogeneizada gentilmente e incubada durante 30 minutos ao abrigo da luz a 37°C. Após esse período, o tubo foi colocado imediatamente no gelo. Foi adicionado então 4 ml de BD FACS™ Lysing Solution (BD Bioscience). As amostras foram centrifugadas a 200 g, a 4°C por 5 minutos. Esse processo foi repetido mais uma vez. Foram adicionados os anticorpos de superfície, α-CD14 e α-CD16. Após 30 minutos, as células foram lavadas e ressuspensas em tampão de FACS e lidas no citômetro de fluxo.

#### **4.13 Análise do metabolismo de monócitos**

O metabolismo dos monócitos foi avaliado utilizando o *Seahorse XF* (Agilent). Em resumo, após a purificação dos monócitos por separação magnética, as células

foram ressuspensas em meio específico (XF - Agilent) suplementado com glicose 5,5 mM e piruvato 1 mM. Foram distribuídos 300.000 monócitos em placas de cultura de células XF-96 (Seahorse Bioscience) na ausência ou presença de Pv-RET (proporção de 1: 1) ou PMA (100 µM), durante 3 horas e 1 hora, respectivamente. Foram utilizados o *Seahorse XFp Cell Energy Phenotype Test Kit* e o *Seahorse XF Cell Mito Stress Kit*, seguindo as instruções do fabricante. A taxa de consumo de oxigênio (*oxygen consumption rate* - OCR; pmoles / min) e a taxa de acidificação extracelular (*extracellular acidification rate* - ECAR; mpH) foram medidas durante o ensaio de fenótipo com o uso de injeções em tempo real de oligomicina (1 µM) e cianeto de carbonila-4- (trifluormetroxi) fenil-hidrazona (FCCP; 1 µM). Para o ensaio de estresse mitocondrial, foram utilizadas as mesmas concentrações, com adição de rotenona/antimicina A (ambas de 1 µM). Os dados foram analisados no software *Seahorse Wave Desktop*.

#### **4.14 Determinação dos níveis plasmáticos de adenosina**

A determinação dos níveis de adenosina no plasma foi realizada através de métodos de separação por cromatografia líquida de alta performance associada à análise dos compostos por ultra-violeta e espectrometria de massa. O sangue periférico dos pacientes foi coletado em tubos com heparina contendo uma solução de 75 µM Dypiramole, 15 µM EHNA e 3 mM EDTA que foi imediatamente adicionada ao sangue a fim de impedir a degradação/consumo da adenosina. O sangue foi então centrifugado a 3.300 g por 10 min o sobrenadante coletado. A exclusão das proteínas foi realizado adicionando acetonitrila ao plasma, seguida por centrifugação a 14.000 rpm 10°C por 5 min. O sobrenadante foi aliquoteado e armazenado em freezer -80°C até análise. Uma solução de fenacetina (50 ng/ml) foi preparada em acetonitrila (solução de precipitação) e usada como padrão interno para avaliação da eficiência da extração da adenosina. A separação dos compostos presentes no sobrenadante foi feita por meio da técnica de cromatografia líquida de alta performance num cromatógrafo Maxis ETD da Bruker. A coluna utilizada foi a Shimadzu Shim-Pack XR-ODS III (C18, 2.2 µm, 80A, 2.0 x 200 mm). A quantidade de amostra injetada no cromatógrafo foi 10 µl. Um gradiente binário de fase móvel A (água) e B (acetonitrila) foi programado na vazão de 200 µl/min, ambos com 0,1% de ácido fórmico. No intervalos de 0-0,5 min foi usado 5% do eluente B, de 0,5-13 min 5-100 % de B, 13-14 min 100% B, 14-15 min 100-5% B e 15-20 min 5%

B. Durante todo o processo a temperatura foi mantida a 40°C. A espectrometria de massa foi realizada utilizando-se o método MS positivo com 0,5 Hz de frequência e com alcance de 40-400 m/z. Foi realizada uma calibração de alta precisão (HPC) no início de cada corrida injetando 20 µl de uma solução formiato de sódio/acetato 10 mM.

#### **4.15 Caracterização fenotípica de leucócitos de sangue periférico: expressão do receptor de IL-10 e ectonucleotidases.**

A caracterização fenotípica dos leucócitos do sangue periférico foi realizada utilizando citometria de fluxo convencional e de imagem. Avaliamos a expressão das moléculas de interesse CD39, CD73 e CD210 em células B, subpopulações de monócitos, neutrófilos, células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Para esta análise, os PBMC foram incubados com anticorpos de superfície (α-CD14, α-CD16, α-CD66b, α-CD19, α-CD3, α-CD4, α-CD8) usando diferentes combinações e avaliados por citometria de fluxo convencional (BD FACSCan) e citometria de fluxo de imagem (*ImageStreamX Mark II, Merck-Millipore*). Para avaliar quais populações celulares estariam alteradas em função da infecção pelo *P. vivax*, amostras de sangue de pacientes com malária foram coletadas antes e 30-45 dias após tratamento, bem como de doadores saudáveis. Paralelamente, pacientes infectados pelo *P. falciparum* também foram incluídos no estudo.

#### **4.16 Análise da produção de citocinas**

O nível plasmático de IL-10 foi medido usando o kit de CBA Th1/Th2/Th17 em pacientes infectados pelo *P. vivax* durante a fase aguda da doença (BT) e após o tratamento (AT), seguindo as especificações do fabricante. A produção intracelular de IL-10 e TNF por monócitos também foi avaliada por citometria de fluxo. Em resumo, os monócitos foram estimulados com Pv-RET (proporção de 1:1) ou LPS (100 ng/ml) na presença de brefeldina (0,2 µL/200 µL) durante 3 horas. Após a cultura, as células foram fixadas e permeabilizadas para posterior incubação com anticorpos α-IL-10 conjugado com PE e α-TNF conjugado com FITC. O procedimento foi realizado de acordo com a descrição do fabricante (BD Cytfix/Cytoperm™).

#### **4.17 Avaliação da modulação da adenosina**

Para avaliar a capacidade dos monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax* em modular a resposta imune quando estimulados pela adenosina (10 nM), os



mesmos foram estimulados com LPS (100 ng/ml) na ausência e presença de adenosina. Posteriormente, os níveis intracelulares de IL-10 e TNF foram avaliados como descrito acima. Em experimentos específicos, os antagonistas de ADORA<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub>, ZM241385 (4- (2- (7-amino-2- (2-furil) (1,2,4) triazol (2,3- $\alpha$ ) (1,3,5) triazina-5-ilamino) etil) fenol) e MRS1754 (N- (4-cianofenil) -2 (4- (2,3,6,7tetra-hidro-2,6-dioxo-1,3-dipropil-1H-purina- 8-il) fenoxi) acetamida), respectivamente (*Tocris Bioscience*), foram utilizados. Resumidamente, as células foram cultivadas durante 30 minutos com os antagonistas dos receptores de adenosina (5  $\mu$ M) antes de adicionar LPS (100 ng/ml) e adenosina (10 nM).

#### **4.18 Análise estatística:**

A análise estatística foi realizada, levando-se em consideração, primeiramente, as variáveis de independência, normalidade e variância para definição dos dados como paramétricos ou não paramétricos. Dados não paramétricos foram avaliados pelo Teste de *Mann-Whitney* para amostras não pareadas ou *Wilcoxon matched-pair* para amostras pareadas. Dados paramétricos foram avaliados pela análise do teste t não pareado ou pareado. Em todos os casos, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para um valor de  $p < 0,05$ . O software *GraphPad Prism* 6.0 foi utilizado para as análises dos dados.

#### **4.19 Comitê de ética:**

A realização desse estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética do CEPEM (CEP-CEPEM 095/2009) e do Centro de Pesquisas René Rachou-FIOCRUZ-MG.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 População de estudo

Um total de 48 pacientes com malária não complicada causada pelo *Plasmodium vivax* foram incluídos nesse estudo no Centro de Pesquisa de Medicina Tropical de Rondônia (CEPEM) em Porto Velho, Rondônia, área endêmica na região Amazônica do Brasil. A população de estudo foi constituída por oito mulheres (16,1%) e 40 homens (83,9%), com faixa etária de 18 a 72 anos ( $38 \pm 13,16$ ). As manifestações clínicas observadas foram: febre, calafrio, náusea, vômito, diarreia, mialgia, cefaleia, artralgia e icterícia (**Tabela 1**). Adicionalmente, foram realizados exames complementares como hemograma (**Tabela 2**) e avaliação de parâmetros bioquímicos (**Tabela 3**).

**Tabela 1.** Resumo da anamnese e exame clínico realizados em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax* participantes do presente trabalho

ID	Sexo	Idade	# Casos			Parasitemia	Sintomas									
			1	<5	>5		Febre	Calafrio	Náusea	Vômito	Diarreia	Mialgia	Cefaleia	Artralgia	Icterícia	
P287	M <sup>(1)</sup>	38		NI <sup>(3)</sup>		NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
P288	M	54		NI		NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
P292	M	37		NI		++	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
P293	M	62		X		+++	N <sup>(4)</sup>	S	N	N	N	S	S	N	N	N
P294	M	38		NI		++	S <sup>(5)</sup>	S	S	S	N	S	S	S	S	S
P295	M	33		X		+++	S	S	S	S	N	S	S	S	S	N
P297	F <sup>(2)</sup>	32	X			++	S	S	S	N	N	S	S	S	S	N
P298	M	51		NI		++	S	S	S	S	N	S	S	S	S	N
P299	M	67		X		+	S	S	N	N	N	S	N	N	N	N
P300	M	41		X		++	S	S	N	N	N	S	N	S	N	N
P301	M	21	X			++	N	S	S	N	N	S	S	S	S	N
P302	F	54	X			++	S	S	N	S	N	S	S	S	S	N
P303	F	49		X		++	N	S	N	S	S	S	N	S	N	N
P304	M	34	X			++	N	S	N	N	S	S	S	S	S	N
P305	M	33		X		++	S	S	S	S	N	N	N	S	N	N
P306	M	37		X		+++	S	S	S	N	N	S	S	S	S	N
P307	F	30	X			+	S	S	N	N	N	S	S	S	S	N
P308	M	33		X		+++	S	N	S	N	N	S	S	S	S	N
P309	M	30	X			++	S	S	S	N	S	S	S	S	S	N
P310	M	51		X		++	N	S	N	N	N	S	S	S	S	N
P311	M	38	X			+	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N
P312	M	32		X		+++	S	S	N	N	S	S	S	S	S	N
P313	M	18		X		++	S	S	S	S	N	S	S	S	S	N
P314	M	37		X		++	S	S	S	N	S	S	S	S	S	N
P315	M	23	X			+++	S	S	S	S	N	S	S	S	S	N
P316	M	46		X		++	S	S	S	S	N	S	S	S	S	N
P317	M	30		X		++	S	S	N	N	N	S	S	S	S	N
P318	M	20	X			++	S	S	S	S	N	S	S	S	S	S
P319	M	32		X		+++	S	S	S	N	N	S	S	S	S	N
P320	M	20	X			+	S	S	S	S	N	N	S	S	S	S
P321	F	44		X		++	N	S	S	N	N	S	S	S	S	N
P322	M	44		X		++	S	S	S	N	S	S	S	S	S	N
P323	M	51		X		++	N	NI	N	N	N	S	S	S	S	N
P325	M	43		X		++	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N
P326	M	59		X		+	S	S	N	N	N	N	S	N	N	N
P327	M	53		X		++	S	S	N	N	N	S	S	S	S	N
P328	M	50		X		+	S	S	N	N	S	S	S	S	S	N
P329	F	47		X		++	S	S	S	S	N	S	S	S	S	N
P330	M	57		X		++	N	N	N	N	N	S	S	S	S	N
P331	F	64	X			+	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N
P332	M	65		X		++	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N
P333	M	29		X		++	S	S	N	N	N	S	S	N	N	N
P334	M	44		X		+	S	S	S	N	S	S	S	N	N	N
P339	M	39	X			+	S	S	S	N	S	S	S	S	S	N
P340	M	37		X		++	N	N	N	N	N	S	S	N	N	N
P341	M	44		X		+	S	S	S	N	N	S	S	S	S	N
P342	F	42		X		++	S	S	S	S	S	S	S	N	N	N
P343	M	30		X		++	S	S	S	N	N	S	S	S	S	N

(1) Masculino (M); (2) Feminino (F); (3) Não informado (NI); (4) Não (N); (5) Sim (S). + (≤500 parasitas/μl); ++ (500-10000 parasitas/μl); +++ (>10000 parasitas/μl).

**Tabela 2.** Dados do hemograma realizado em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax* participantes do presente trabalho

ID	Hemograma											
	Hct <sup>(1)</sup> %	Hb <sup>(2)</sup> g/dL	Hemáceas 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	VCM <sup>(3)</sup> fL	HCM <sup>(4)</sup> pg	CHCM <sup>(5)</sup> %	Leucócitos 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	Monócitos %	Monócitos /mm <sup>3</sup>	Plaq <sup>(6)</sup> 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	Grupo ABO	Rh
P287	41,5	14,9	4,89	84,86	30,47	35,9	9,8	7	686,7	121	O	+
P288	40,9	13,6	4,56	89,7	29,8	33,3	5,1	9	461,7	181	O	+
P292	42,1	13,7	4,97	84,7	27,6	32,5	3,5	7	247,1	58	NA	NA
P293	NA <sup>(7)</sup>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P294	35,9	11,8	4,3	83,48	27,44	32,86	8,5	4	343,2	154	O	+
P295	41,0	12,5	4,42	92,8	28,3	30,5	4,2	10	429	163	A	+
P297	36,7	12,1	4,63	79,3	26,1	33	6,8	7	480,9	122	O	+
P298	47,2	15,2	5,23	90,2	29,1	32,2	3,9	2	78,4	154	A	+
P299	46,1	15,1	5,01	92	30,1	32,8	3,6	8	289,6	90	O	+
P300	43,3	14,5	4,74	91,4	30,6	33,5	3,8	4	152	71	O	+
P301	45,8	14,8	5,23	87,6	28,3	32,3	4,2	14	590,8	170	O	+
P302	34,3	11,5	3,9	87,9	29,5	33,5	4,6	10	467	138	NA	NA
P303	37,9	12,4	4,34	87,3	28,6	32,7	4,1	9	376,2	110	NA	NA
P304	53,0	17	6,08	87,2	28	32,1	7,1	10	719	240	O	+
P305	38,6	13,2	4,36	88,5	30,3	34,2	3,9	6	234,6	89	NA	NA
P306	43,6	14,6	5,26	82,9	27,8	33,5	5	2	100,2	152	NA	NA
P307	36,4	12,5	4,05	90	31	34,3	8,3	9	755,1	182	A	+
P308	45,2	15,5	5,34	84,6	29	34,3	6,2	4	251,2	171	B	+
P309	41,8	14,7	5,03	83,1	29,2	35,2	3	9	277,2	145	O	+
P310	40,4	14,1	4,41	91,6	32	34,9	7,9	7	553,7	136	A	-
P311	40,3	13,8	4,38	92	31,5	34,2	7,4	12	895,2	401	B	+
P312	47,7	15,4	5,55	85,4	27,7	32,5	9,9	9	896,4	145	A	+
P313	40,8	13,8	4,49	90,9	30,7	33,8	9,2	7	684,2	159	O	+
P314	40,5	14,3	4,79	84,6	29,9	35,3	5,4	9	491,4	152	NA	NA
P315	37,1	12,6	4,72	78,6	26,7	34	6	4	240,8	89	A	+
P316	43,2	14,7	4,74	91,1	31	34	4,5	8	365,6	56,8	A	+
P317	45,9	15,8	5,38	85,3	29,4	34,4	4,9	8	393,6	118	NA	NA
P318	43,6	14,9	5,04	86,5	29,6	34,2	8,8	7	622,3	254	O	+
P319	48,3	15,8	5,6	86,3	28,2	32,7	8,8	9	792,9	112	NA	NA
P320	40,6	13,5	4,61	88,1	29,3	33,3	1,2	6	77,4	104	B	+
P321	39,1	13,4	4,43	88,3	30,2	34,3	6,5	7	457	161	NA	NA
P322	43	14,5	4,87	88,3	29,8	33,7	10,4	7	732,9	203	NA	NA
P323	40,8	15	4,17	97,8	36	36,8	3,9	9	358,2	73	NA	NA
P325	43,6	15,5	4,86	89,7	31,9	35,6	3,6	7	254,8	110	NA	NA
P326	48,5	16,2	5,8	83,6	27,9	33,4	6	7	205,8	198	NA	NA
P327	46,8	15,9	4,79	97,7	33,2	34	5,2	10	528	249	NA	NA
P328	49	16,7	5,6	84,5	29,8	34,1	4,4	11	487,3	135	NA	NA
P329	33,4	10,9	3,97	84,1	27,5	32,6	2,9	26	761,8	190	NA	NA
P330	37,5	12,8	4,51	83,1	28,4	34,1	4,1	7	288,4	126	NA	NA
P331	44,4	14,4	5,29	83,9	27,2	32,4	5,4	8	432,8	301	NA	NA
P332	35,5	12,5	3,76	94,4	33,2	35,2	4,3	9	389,7	146	NA	NA
P333	41,1	13,9	4,85	84,7	28,7	33,8	5	9	457,2	181	NA	NA
P334	48	16,3	5,27	91,1	30,9	34	8,5	4	343,2	142	NA	NA
P339	45,5	14,3	4,7	96,6	30,4	31,4	5,3	9	478,8	173	NA	NA
P340	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P341	39,8	12,6	4,24	93,9	29,7	31,7	3,4	18	619,2	206	NA	NA
P342	40,2	12,8	4,33	92,8	29,6	31,8	7,8	9	709,7	112	NA	NA
P343	36,9	12	3,92	94,1	30,6	32,5	4,8	9	440,1	198	NA	NA
<b>Média</b>	<b>42,0</b>	<b>14,1</b>	<b>4,8</b>	<b>88,2</b>	<b>29,6</b>	<b>33,6</b>	<b>5,7</b>	<b>8,3</b>	<b>454,3</b>	<b>155,3</b>		

(1) Hematócrito (Hct); (2) Hemoglobina (Hb); (3) Volume corpuscular médio (VCM); (4) Hemoglobina corpuscular média (HCM); (5) Concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM); (6) Plaquetas (Plaq); (7) Não avaliado (NA).

**Tabela 3.** Dados dos exames bioquímicos realizados em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax* participantes do presente trabalho

ID	Parâmetros bioquímicos													
	Cr <sup>(1)</sup> mg/dL	U <sup>(2)</sup> mg/dL	Ácido úrico mg/dL	BT <sup>(3)</sup> mg/dL	BD <sup>(4)</sup> g/dL	BI <sup>(5)</sup> g/dL	Colesterol total mg/dL	HDL mg/dL	LDL mg/dL	Triglicérides mg/dL	TGO U/L	TGP U/L	FAL <sup>(6)</sup> U/L	GGT <sup>(7)</sup> U/L
P287	1,3	35	NA <sup>(8)</sup>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P288	0,99	45,5	NA	0,78	0,23	0,55	192,7	41	0	437,5	21	20	63	74
P292	0,81	19,7	NA	NA	NA	NA	135,5	3	67	327,5	17	29	110	211
P293	6	40,8	NA	2,61	0,59	2,02	146,9	15	109	112,4	25	24	67	47
P294	0,8	29,6	NA	1,15	0,27	0,88	162,7	32	109	105,9	22	18	92	30
P295	0,9	32,8	NA	0,63	0,19	0,45	123,0	NA	0	488,9	19	20	54	40
P297	0,91	26,3	NA	2,02	1,39	0,63	63,7	3	40	104,8	37	40	114	182
P298	1,6	44,9	NA	1,88	0,89	0,99	104,2	18	65	103,5	33	34	109	216
P299	0,78	26,6	NA	0,59	0,33	0,26	97,5	15	37	284,8	43	39	97	81
P300	0,85	NA	3,8	1,41	0,45	0,96	132,4	38	79	78,1	53	44	73	48
P301	0,84	NA	6,8	0,5	0,1	0,4	117,4	9	80	160,5	32	31	69	53
P302	1,06	NA	7,2	0,9	0,33	0,57	173,2	15	123	176,3	18	19	109	120
P303	0,67	NA	3,6	1,11	0,33	0,78	100,3	13	67	99,3	18	18	73	31
P304	1,2	NA	6,6	0,67	0,19	0,48	167,8	45	103	100,7	31	25	84	68
P305	0,82	NA	4,6	1,57	0,55	1,02	82,1	15	46	167,4	25	24	78	25
P306	1,1	NA	5,8	1,73	1	0,74	107,3	10	77	98,1	31	23	70	73
P307	0,56	NA	5,1	0,42	0,13	0,29	147,7	25	106	85,4	47	40	84	109
P308	1,08	NA	6,6	2,93	0,66	2,27	101,8	10	66	131	23	17	103	48
P309	1,16	NA	5	0,84	0,37	0,47	115,1	9	72	174,3	25	29	93	117
P310	0,95	NA	5,4	0,34	0,11	0,23	106,9	18	72	84,7	17	12	55	13
P311	1,01	NA	4,8	0,46	0,16	0,3	152,1	27	107	93,3	18	17	83	13
P312	1,02	NA	5,7	2	0,62	1,38	111,3	3	49	294,2	26	21	69	57
P313	1,1	NA	4,7	0,82	0,13	0,69	63,1	4	38	107,7	40	15	72	14
P314	1,38	NA	8,6	0,8	0,37	0,44	168,8	18	0	606,8	95	68	129	410
P315	0,78	NA	4,7	0,83	0,31	0,52	73,4	15	37	156,6	21	16	64	15
P316	0,96	NA	5,3	0,97	0,34	0,63	116,6	12	52	262,2	37	35	60	127
P317	1,01	NA	4,5	0,92	0,29	0,64	64,8	11	31	113	21	13	57	11
P318	0,84	NA	4,5	1,07	0,39	0,67	67,3	9	23	179,5	20	11	87	15
P319	1,06	NA	6,3	1,43	0,45	0,98	112,8	13	50	300,5	25	14	69	31
P320	1,12	NA	5,9	NA	NA	NA	67,4	15	26	169,7	23	15	97	18
P321	0,69	NA	4,8	0,3	0,12	0,18	131,6	15	53	314	19	17	49	19
P322	1,02	NA	4,8	0,35	0,12	0,23	148,8	36	91	108,2	17	21	84	50
P323	1,22	NA	7,1	0,65	0,15	0,5	104,9	46	57	157,1	27	23	56	17
P325	1,1	NA	6,5	1,52	0,45	1,07	105,6	17	58	153,2	22	30	74	101
P326	1,11	NA	5,7	0,81	0,3	0,52	92,9	25	46	106,4	24	26	55	24
P327	0,81	NA	6,3	0,73	0,22	0,51	193,5	27	140	133,4	30	24	97	28
P328	0,93	NA	2,8	0,92	0,33	0,59	134,6	44	79	58,4	19	21	78	32
P329	0,62	NA	4,7	0,38	0,12	0,26	151,9	29	88	172,6	18	17	85	23
P330	0,73	NA	NA	0,46	0,18	0,29	127,3	12	56	297	31	65	NA	139
P331	1,08	NA	NA	0,33	0,19	0,14	110,2	44	33	169,9	29	18	NA	87
P332	0,9	NA	NA	1,49	0,55	0,94	120,4	18	63	196,7	23	15	95	NA
P333	0,84	NA	NA	0,37	0,13	0,24	140,5	20	94	130,9	22	27	79	NA
P334	1,15	NA	NA	2,62	0,83	1,79	132,5	15	49	342,7	104	115	100	NA
P339	0,93	NA	NA	0,75	0,24	0,51	180,7	32	125	116,2	20	28	NA	NA
P340	0,71	NA	NA	1,7	0,5	1,2	264,3	17	0	856,7	57	101	88	NA
P341	1,09	NA	NA	1,33	0,38	0,95	215,5	40	137	193	39	38	100	NA
P342	0,96	NA	NA	0,52	0,19	0,33	87	14	40	161,8	19	20	82	NA
P343	0,77	NA	NA	1,51	0,46	1,05	137,9	15	90	166,4	15	15	93	NA
<b>Média</b>	<b>1,1</b>	<b>33,5</b>	<b>5,5</b>	<b>1,1</b>	<b>0,4</b>	<b>0,7</b>	<b>126,7</b>	<b>20,2</b>	<b>64,5</b>	<b>200,8</b>	<b>29,7</b>	<b>28,8</b>	<b>81,8</b>	<b>72,2</b>

(1) Creatinina (Cr); (2) Ureia (U); (3) Bilirrubina total (BT); (4) Bilirrubina direta (BD); (5) Bilirrubina indireta (BI); (6) Fosfatase alcalina (FAL); (7) Gama GT (GGT); (8) Não avaliado (NA).

## **5.2 Plasmodium vivax altera a transcrição de genes nucleares envolvidos no metabolismo mitocondrial**

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que os subtipos de monócitos possuem capacidade fagocítica diversa bem como produzem ROS diferentemente [52], diante desse achado surgiu a indagação se essas diferenças observadas entre as subpopulações são provenientes da infecção pelo *P. vivax* ou se são características intrínsecas das mesmas. A fim de solucionar essa questão, nosso primeiro passo foi avaliar a transcrição de genes envolvidos no metabolismo mitocondrial (**Tabela 4**), visando estabelecer um perfil de alterações de maneira mais abrangente e específica. Para isso, foi avaliado o número de cópias de mRNA dos genes selecionados nas subpopulações de monócitos de cinco pacientes (*Pv*) durante a fase aguda da doença e três indivíduos saudáveis (HD – *Healthy Donors*) por *nanosttring nCounter*. Foram utilizados genes envolvidos no processo de fissão e fusão mitocondrial (1), apoptose (2), transporte de diversos metabólitos (3), atividade de chaperonas (4), processamento de proteínas (5), montagem do complexo IV da CTE (6) e de enzimas com atividade antioxidantes (7). Os dados obtidos foram utilizados em duas análises distintas: análise do perfil de transcrição por meio da análise de componente principal (*Principal Component Analysis* – PCA) (**Figura 7A**) e da construção de um *heatmap* (**Figura 7B**). Os genes mostrados são os que apresentam diferenças significativas quando pelo menos uma subpopulação de monócitos foi comparada entre pacientes infectados pelo *P. vivax* e HD. Através da PCA observamos uma segregação importante entre pacientes com malária e HD e, em menor grau, entre subpopulações de monócitos. No *heatmap*, observamos uma diminuição na contagem de mRNA da maioria dos genes de monócitos de pacientes com malária associados à fusão e fissão, apoptose, transporte de metabólitos, atividade de chaperona, processamento de proteínas e montagem do Complexo IV da CTE. O único parâmetro aumentado durante a infecção foi SOD2, envolvido na atividade antioxidante. A redução generalizada na expressão gênica sugere uma alteração no metabolismo mitocondrial de monócitos de pacientes com malária.

Adicionalmente, realizamos um outro *nanosttring nCounter* incluindo um novo painel no qual o foco era genes envolvidos em diferentes processos do CAC, CTE, metabolismo da glicose e de lipídeos, e ao juntar com os dados adquiridos anteriormente, construímos gráficos de radar (**Figura 7C**), com o objetivo de revelar

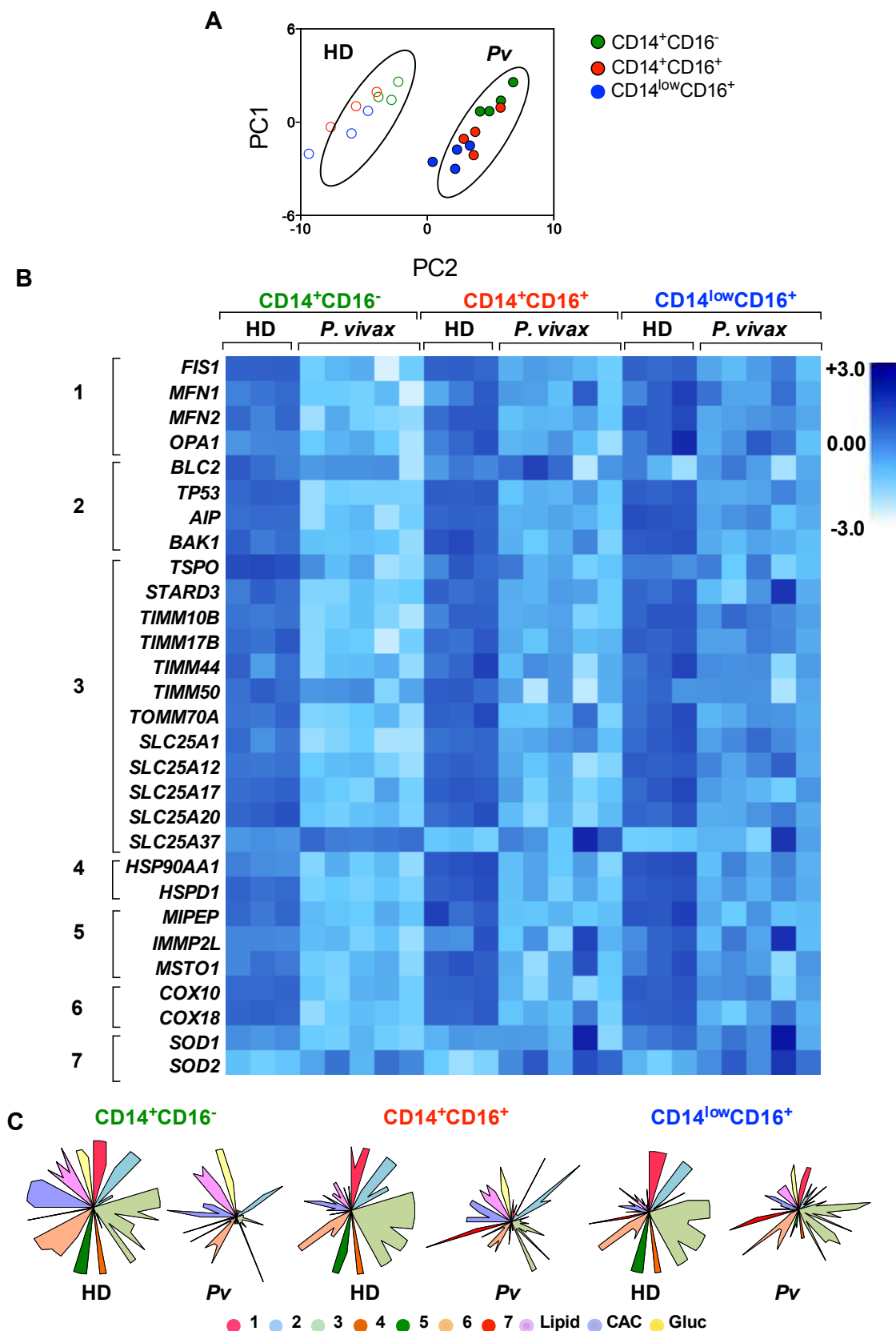
diferenças mais substanciais entre os subtipos de monócitos de pacientes e de indivíduos saudáveis. No geral, não foi observada quase nenhuma diferença em genes associados com metabolismo de lipídeos. Em relação aos genes envolvidos na CTE e no CAC observamos uma diminuição nos níveis de mRNA. Por outro lado, foi demonstrado um aumento na contagem de mRNA da PKM, enzima responsável pelo último passo da glicólise. As análises efetuadas relataram diferenças significativas entre ambos grupos, demonstrando que de fato a malária causada pelo *P. vivax* altera o metabolismo mitocondrial das subpopulações de monócitos.

**Tabela 4.** Diferenças estatísticas entre a contagem do número de cópias de mRNA nas subpopulações de monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax* e indivíduos saudáveis

Grupo	Nome oficial completo	Gene ID	valor de p		
			CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup>	CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	CD14 <sup>low</sup> CD16 <sup>+</sup>
1	Fission, mitochondrial 1	FIS1	0.03	0.03	0.03
	Mitofusin 1	MFN1	0.03	0.22	0.14
	Mitofusin 2	MFN2	0.03	0.03	0.03
	OPA1 mitochondrial dynamin like GTPase	OPA-1	0.03	0.03	0.25
2	BCL2 apoptosis regulator	BCL2	0.03	0.25	0.25
	BCL2-like protein 1	BCL2L1	0.11	0.11	0.85
	BCL2 interacting protein 3	BNIP3	0.57	1.00	0.11
	Tumor protein p56	TP53	0.03	0.03	0.03
	Apoptosis inducing factor mitochondria associated 2	AIFM2	0.40	0.85	0.11
BCL2 antagonist/killer 1	BAK1	0.03	0.03	0.03	
3	Aryl hydrocarbon receptor interacting protein	AIP	0.03	0.03	0.03
	Translocator protein	TSPO	0.03	0.07	0.39
	STAR related lipid transfer domains containing 3	STARD3	0.03	0.03	0.05
	Solute carrier family 25 member 1	SLC25A1	0.03	0.03	0.03
	Solute carrier family 25 member 12	SLC25A12	0.03	0.03	0.05
	Solute carrier family 25 member 13	SLC25A13	0.39	1.00	1.00
	Solute carrier family 25 member 17	SLC25A17	0.03	0.03	0.03
	Solute carrier family 25 member 20	SLC25A20	0.03	0.03	0.03
	Solute carrier family 25 member 25	SLC25A25	1.00	0.07	0.25
	Solute carrier family 25 member 37	SLC25A37	0.03	0.07	0.25
	Translocase of outer mitochondrial membrane 34	TOMM34	1.00	0.14	0.07
	Translocase of outer mitochondrial membrane 35	TOMM40	0.25	0.14	0.14
	Translocase of outer mitochondrial membrane 70	TOMM70A	0.03	0.03	0.03
	Translocase of inner mitochondrial membrane 10B	TIMM10B	0.03	0.03	0.03
	Translocase of inner mitochondrial membrane 17B	TIMM17B	0.03	0.03	0.03
	Translocase of inner mitochondrial membrane 44	TIMM44	0.03	0.07	0.07
	Translocase of inner mitochondrial membrane 50	TIMM50	0.03	0.03	0.78
4	Heat shock protein 90 alpha family class A member 2	HSP90AA1	0.03	0.03	0.03
	Heat shock protein family D (Hsp60) member 1	HSPD1	0.03	0.03	0.03
5	Inner mitochondrial membrane peptidase subunit 3	IMMP2L	0.03	0.11	0.11
	Mitochondrial intermediate peptidase	MIPEP	0.03	0.03	0.03
	Misato mitochondrial distribution and morphology regulator 1	MSTO1	0.03	0.05	0.07
6	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A13	ComplexI	0.30	0.57	0.93
	Succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A	ComplexII	0.01	0.06	0.15
	Coenzyme Q - cytochrome c reductase	ComplexIII	0.09	0.73	0.69
	Cytochrome c oxidase	COX	0.43	0.85	0.38
	Cytochrome c oxidase assembly factor COX18	COX18	0.03	0.03	0.03
	Cytochrome c oxidase assembly factor COX10	COX10	0.03	0.03	0.03
7	ATP synthase F0 subunit 6	ATP syn	0.67	0.61	0.15
	Superoxide dismutase 1	SOD1	0.03	1.00	0.57
8	Superoxide dismutase 2	SOD2	0.03	0.03	0.03
	Alpha-ketoglutarate dehydrogenase	Cetoglutarato	0.01	0.01	0.46
9	Citrate synthase	Citrate	0.04	0.87	0.50
	Aconitase 1	Isocitrate	0.02	0.79	0.44
	Hydroxyacyl CoA dehydrogenase	HydroAcylCoA	0.01	0.17	0.37
	Pyruvate dehydrogenase E1 subunit alpha	PDHA1	0.01	0.54	0.98
	Thiolase	Thiolase	0.17	0.27	0.41
	Carnitine palmitoyltransferase 1	Carnil I	0.09	0.45	0.26
	Carnitine palmitoyltransferase 2	Carnil II	0.08	0.78	0.67
	Enoyl-CoA hydratase, short chain 1	EnoylCoA	0.42	0.44	0.61
	Acyl-CoA dehydrogenase very long chain	AcylCoAdes	0.09	0.44	0.62
	Acyl-CoA synthetase medium chain family member 3	AcylCoA	0.01	0.77	0.47
10	Hexokinase 1	Hexokinase	0.47	0.61	0.38
	Phosphofruktokinase	Phosphofructo	0.06	0.49	0.23
	Pyruvate kinase M1/2	PKM	0.01	0.01	0.01

Genes foram divididos em 10 grupos: (rosa escuro) fusão e fissão; (azul) apoptose; (verde claro) transporte de metabólitos; (laranja escuro) atividade de chaperona; (verde escuro) processamento de proteínas; (laranja) CTE; (vermelho) controle antioxidante; (roxo) Ciclo de Krebs; (rosa claro) metabolismo de lipídeos; e (amarelo) metabolismo da glicose. (HD n= 11) (Pv n=13).





**Figura 7. A** infecção pelo *P. vivax* altera o perfil de transcrição de genes envolvidos no metabolismo mitocondrial das subpopulações de monócitos. (A) PCA dos subtipos de monócitos de 3 HDs (símbolos abertos) e 4 pacientes com malária causada pelo *P. vivax* (símbolos fechados). (B) Análise de *nanosttring* nCounter de subpopulações de monócitos de 3 indivíduos saudáveis (HDs) e 5 pacientes infectados pelo *P. vivax*. *Heatmap* representando o número de cópias de mRNA de 29

genes envolvidos no processo de fissão e fusão mitocondrial (1), apoptose (2), transporte de diversos metabólitos (3), atividade de chaperonas (4), processamentos de proteínas (5), montagem do complexo IV da CTE (6) e de atividade antioxidante (7). (C) Os gráficos de radar foram construídos utilizando a proporção de indivíduos que exibem cada parâmetro acima do valor da mediana global. Os genes foram divididos em 10 grupos: fusão e fissão mitocondrial (rosa escuro), apoptose (azul), transporte de diversos metabólitos (verde claro), atividade de chaperona (laranja escuro), processamento de proteínas (verde escuro), CTE (laranja claro), atividade antioxidante (vermelho), CAC (roxo), metabolismo lipídico (rosa) e metabolismo de glicose (amarelo). (HD – n=11; Pv – n=13).

### **5.3 Subtipos de monócitos apresentam expressão de genes envolvidos no metabolismo mitocondrial distinta que é intensificada durante a malária causada pelo *P. vivax***

Com o propósito de avaliar mais detalhadamente as diferenças na expressão gênica entre as subpopulações de monócitos entre si no mesmo contexto, doença ou homeostase, e entre o mesmo subtipo em pacientes e doadores saudáveis, construímos a assinatura ascendente desses genes (**Figura 8**) e comparamos os genes utilizando diagramas de Venn (**Figura 9**). Ambas as análises foram feitas considerando os parâmetros observados em 50% ou mais dos indivíduos em relação ao valor da mediana global.

A assinatura ascendente nos permite observar que os três subtipos de monócitos analisados têm expressão diminuída da maioria dos genes analisados em pacientes infectados (*Pv*) (**Figura 8B**) em relação aos doadores saudáveis (HD) (**Figura 8A**). Os diagramas de Venn possibilitam investigar as semelhanças e diferenças entre os subtipos de monócitos dentro de um mesmo contexto, no caso malária e homeostase. Observamos claramente que em indivíduos saudáveis (HD), as subpopulações de monócitos são mais parecidas entre si, apresentando a expressão de 27 genes em comum, enquanto que durante a malária esse número cai para 4 genes (**Figura 9A**), sugerindo que a infecção pelo *P. vivax* estimula uma ativação diferenciada por essas células. Ao compararmos o mesmo subtipo de monócito de pacientes e HDs, observamos que apesar de possuírem um número considerável de genes em comum, a grande maioria dos genes analisados é expressa somente no paciente ou no doador saudável (**Figura 9B**), corroborando com a ideia de que a infecção pelo *P. vivax*, de fato, causa mudanças substanciais no metabolismo mitocondrial das subpopulações de monócitos.



global. Os parâmetros observados em 50% ou mais dos indivíduos estão destacados para cada subtipo de monócitos de doadores saudáveis (HD) (A) e pacientes infectados pelo *P. vivax* (Pv) (B). Monócitos clássicos estão representados em verde, inflamatórios ou intermediários em vermelho, e os patrulhadores em azul. Os genes em negrito representam os parâmetros observados em 50% ou mais dos indivíduos na mesma subpopulação de monócitos de pacientes e doadores saudáveis.

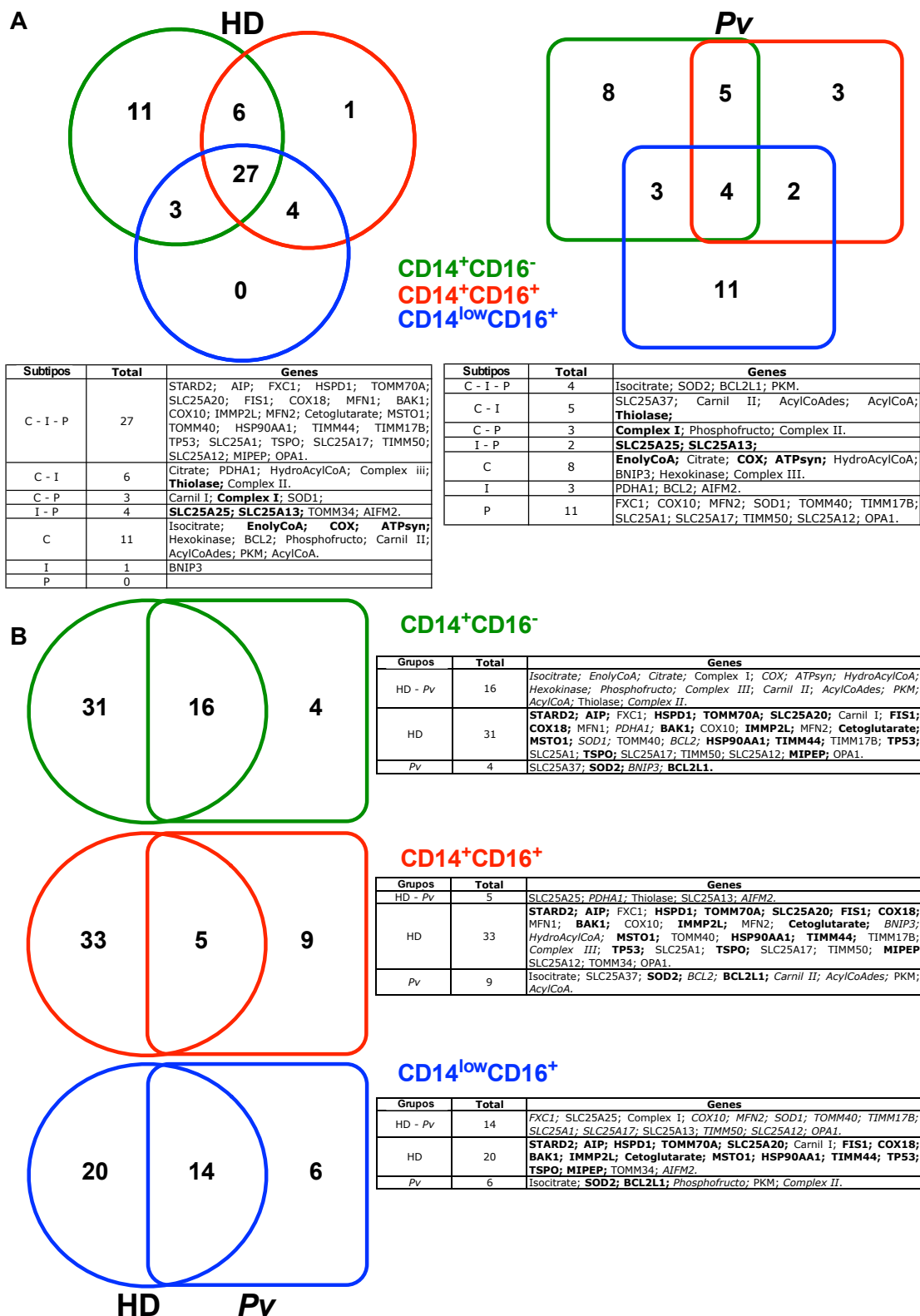


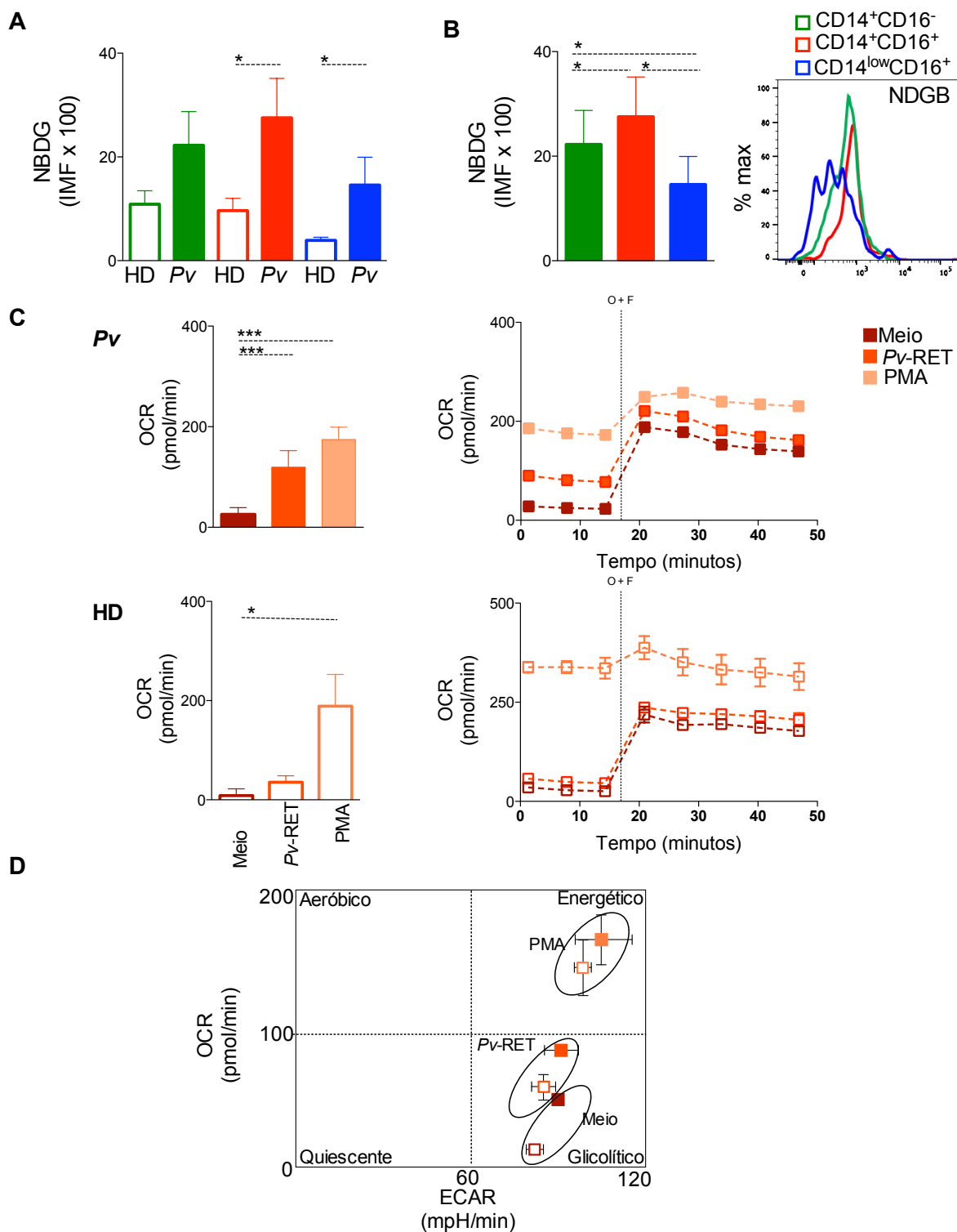
Figura 9. Padrão da expressão gênica mitocondrial nos subtipos de monócitos de doadores saudáveis e indivíduos infectados pelo *P. vivax*. Os diagramas de Venn foram construídos a fim de identificar a expressão gênica comum entre os diferentes grupos. Apenas genes expressos em

50% ou mais dos indivíduos foram incluídos na análise. (A) Comparação da expressão gênica entre subtipos de monócitos de doadores saudáveis (HD) (painel esquerdo) e pacientes (*Pv*) (painel direito). Os genes em negrito foram comumente expressos pelos *Pv* e HD na mesma análise de conjuntos. (B) Comparação da expressão gênica em cada subtipo de monócito entre HD (círculo) e *Pv* (quadrado). Genes em negrito foram comumente expressos por pacientes e doadores saudáveis ou grupo de interseção. Genes em itálico foram expressos exclusivamente em um subtipo específico de monócitos por *Pv* e HD ou grupo de interseção.

#### **5.4 A infecção pelo *Plasmodium vivax* altera características metabólicas de monócitos**

Os dados de expressão gênica demonstraram que a infecção pelo *P. vivax* causa alterações no metabolismo das subpopulações de monócitos. Considerando que a glicose é uma importante fonte de ATP durante a ativação das células do sistema imune [235], avaliamos a captação de glicose, utilizando um análogo da glicose fluorescente, 2-NBDG (2- (N- (7-Nitrobenz-2-oxa- 1,3-diazol-4-il) Amino-2-desoxiglicose). Monócitos inflamatórios e patrulhadores de pacientes apresentam um aumento na captação de glicose em comparação aos mesmos subtipos de doadores saudáveis (**Figura 10A**). Além disso, foi observado que monócitos inflamatórios captam mais glicose do que os outros subtipos (**Figura 10B**).

Afim de explorar ainda mais as características metabólicas dos monócitos, também utilizamos a análise de fluxo extracelular. Alterações na taxa de acidificação extracelular (ECAR) e na taxa de consumo de oxigênio (OCR) em resposta às injeções simultâneas de oligomicina e FCCP foram usadas para calcular o fenótipo de energia celular. Monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax* (*Pv*) cultivados com reticulócitos infectados pelo *P. vivax* (*Pv*-RET) e PMA exibiram um aumento no OCR basal (**Figura 10C, painel superior**) enquanto monócitos de HD mostraram um aumento no OCR basal após estimulação com PMA (**Figura 10C, painel inferior**). Como mostrado no fenograma, monócitos de ambos, pacientes e HD, tendem a ser mais glicolíticos, mesmo na ausência de estímulos. Os monócitos cultivados com *Pv*-RET aumentam significativamente a OCR basal, no entanto, ainda exibem um fenótipo glicolítico que só é alterado para energético quando estimulado com PMA (**Figura 10D**).

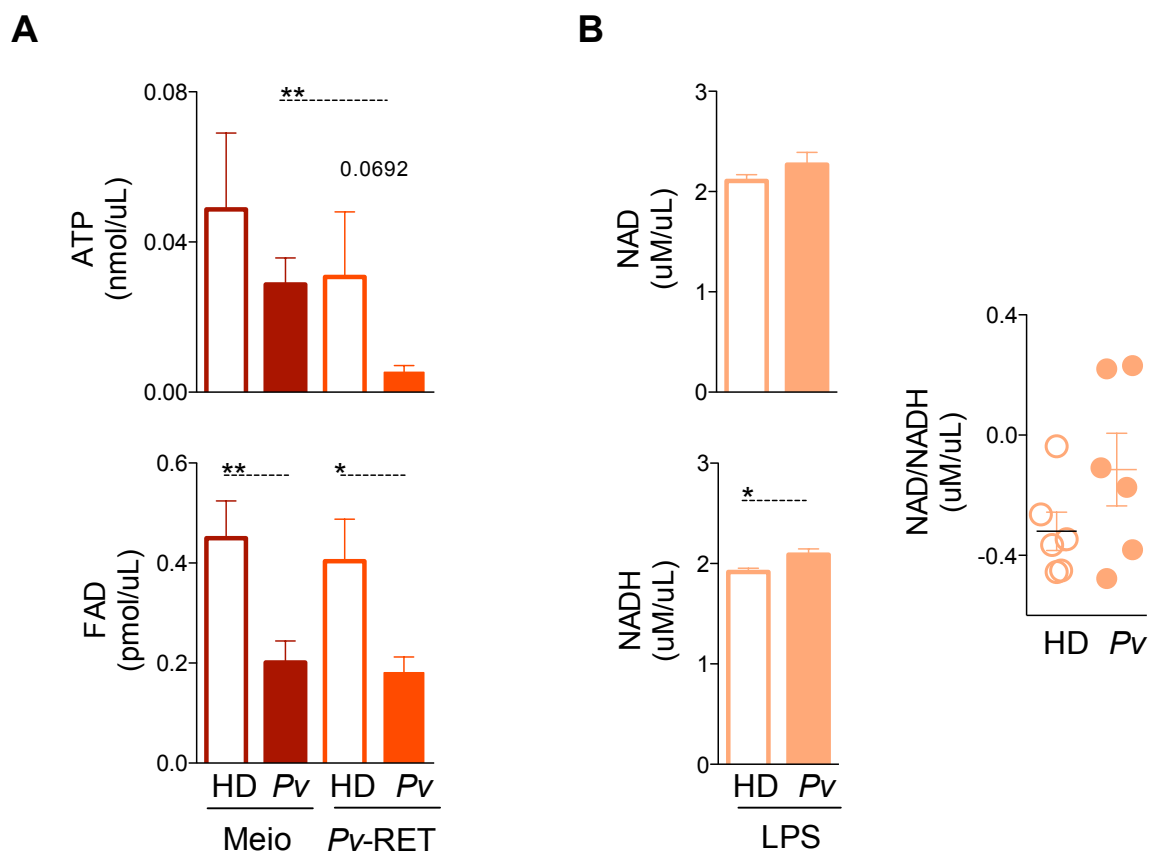


**Figura 10. Monócitos aumentam a captação de glicose durante a infecção pelo *P. vivax*.** (A) A captação de glicose foi medida *ex vivo* nas subpopulações de monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax* (barras cheias, n=10) e de doadores saudáveis (barras abertas, n=5). (B) Captação de glicose pelos subtipos de monócitos de pacientes experimentado a fase aguda da malária ocasionada pelo *P. vivax*. (C, painel esquerdo) OCR basal de monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax* (*Pv*) e de doadores saudáveis (*HD*) estimulados com meio (vermelho escuro), *Pv*-RET (vermelho) ou PMA (laranja). OCR basal e alterações em tempo real na OCR em resposta ao tratamento com oligomicina e FCCP (painel esquerdo) e (D) fenograma correspondente aos níveis basais de monócitos de pacientes (quadrados cheios) e *HD* (quadrados vazios). (*Pv* n=13; *HD* n=7). \* p<0,05 \*\* p<0,01 \*\*\*p<0,001.

### **5.5 Monócitos de pacientes com malária causada pelo *P. vivax* estão programados para balancear a produção de ATP com a de mROS**

Dadas as alterações observadas na expressão gênica mitocondrial na malária e considerando que as mitocôndrias são as principais responsáveis pela geração de energia metabólica em praticamente todas as células eucarióticas, avaliamos os níveis de ATP produzidos durante a malária causada pelo *P. vivax* usando um kit comercial (ATP Assay Kit - Abcam). Resumidamente, cultivamos 200 µl de sangue na presença ou ausência de *Pv*-RET por 10 minutos (**Figura 11A, painel superior**) e coletamos o sobrenadante da cultura para a dosagem de ATP.

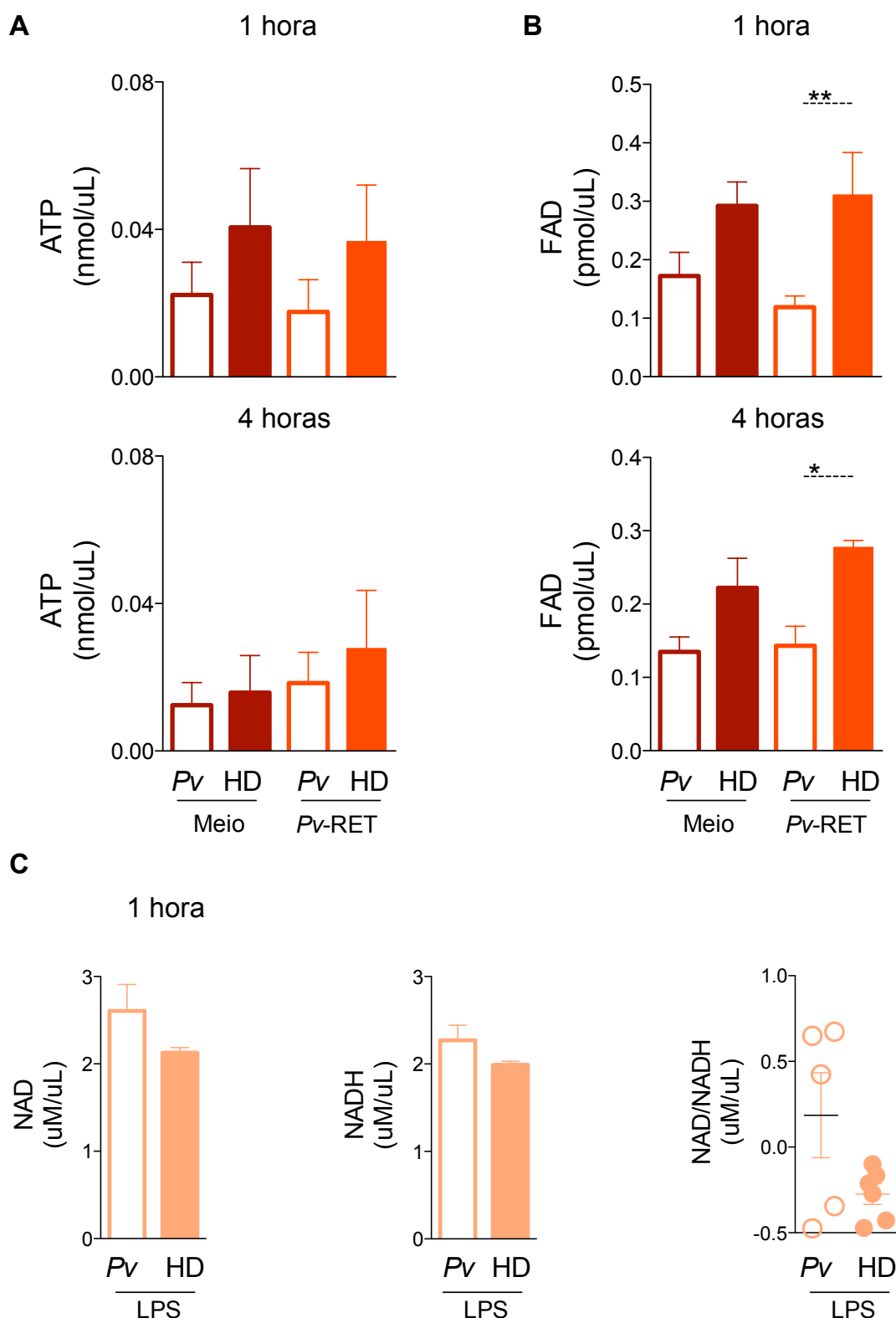
A adição de *Pv*-RET diminuiu a concentração de ATP produzida por pacientes com malária, sem alterar a dos doadores saudáveis (**Figura 11A, painel superior**). Os níveis de FAD e NAD/NADH também foram avaliados (**Figuras 11A e 12B**). Os níveis de FAD foram mais baixos nas culturas de células de pacientes com malária ocasionada pelo *P. vivax* quando comparados aos HD na presença ou na ausência de estímulo (**Figura 11A, painel inferior**). Não houve alteração na concentração de NAD (forma oxidada) ao comparar pacientes e HD (**Figura 11B, painel superior**). Foi observado um aumento de NADH (forma reduzida) em pacientes infectados pelo *P. vivax* (**Figura 11B, painel inferior**). No entanto, esse aumento não resultou em diferenças na proporção de NAD/NADH nos indivíduos analisados (**Figura 11B, painel direito**). Assim, esses resultados indicam que as mitocôndrias não estão programadas para produzir altos níveis de ATP durante a infecção pelo *P. vivax*.



**Figura 11. Pacientes infectados pelo *P. vivax* apresentam níveis de ATP e FAD diminuídos.** (A) Dosagem de ATP (painel superior) e FAD (painel inferior) realizada por kits comerciais (Abcam) no sangue total de pacientes infectados pelo *P. vivax* (*Pv*-barra cheia) e doadores saudáveis (HD -barra aberta) na presença (vermelho) ou ausência (vermelho escuro) de *Pv*-RET após 10 minutos de cultura. (B) Concentração de NAD, NADH e proporção entre ambos foi dosada no PBMC de *Pv* (símbolos cheios) e HD (símbolos abertos) após 10 minutos de cultura com LPS (laranja). (*Pv* n=9; HDs = 5) \*  $p \leq 0,05$  \*\*  $p \leq 0,01$ .

As mesmas análises também foram realizadas no tempo de 1 hora e 4 horas de cultura, nos quais obtivemos resultados semelhantes para FAD (**Figura 12B**) e NAD/NADH (**Figura 12C**), a diminuição de ATP não foi observada nesses períodos (**Figura 12A**), provavelmente devido à sua rápida hidrólise, mesmo na presença de suramina.



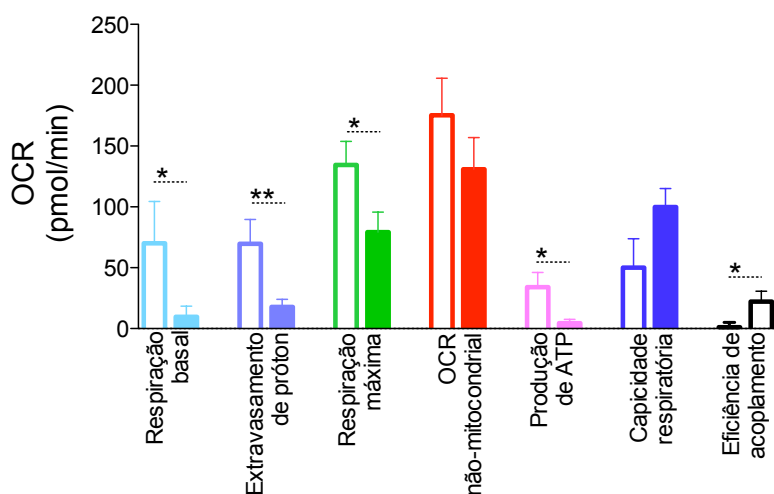


**Figura 12. Níveis de ATP, FAD e NAD/NADH.** (A) Dosagem de ATP (painel superior) e FAD (painel inferior) realizadas por kits comerciais (Abcam) no sangue total de pacientes infectados pelo *P. vivax* (*Pv* -barra cheia) e doadores saudáveis (HD -barra aberta) na presença (vermelho) ou ausência (vermelho escuro) de *Pv*-RET após 1 hora (painel superior) e 4 horas (painel inferior) de cultura. (B) Concentração de NAD, NADH e proporção entre ambos dosadas no PBMC de *Pv* (barra e símbolos cheios) e HD (barra e símbolos abertos) após 1 hora de cultura com LPS (laranja) (*Pv* n=9; HDs = 5) \*  $p \leq 0,05$  \*\*  $p \leq 0,01$ .

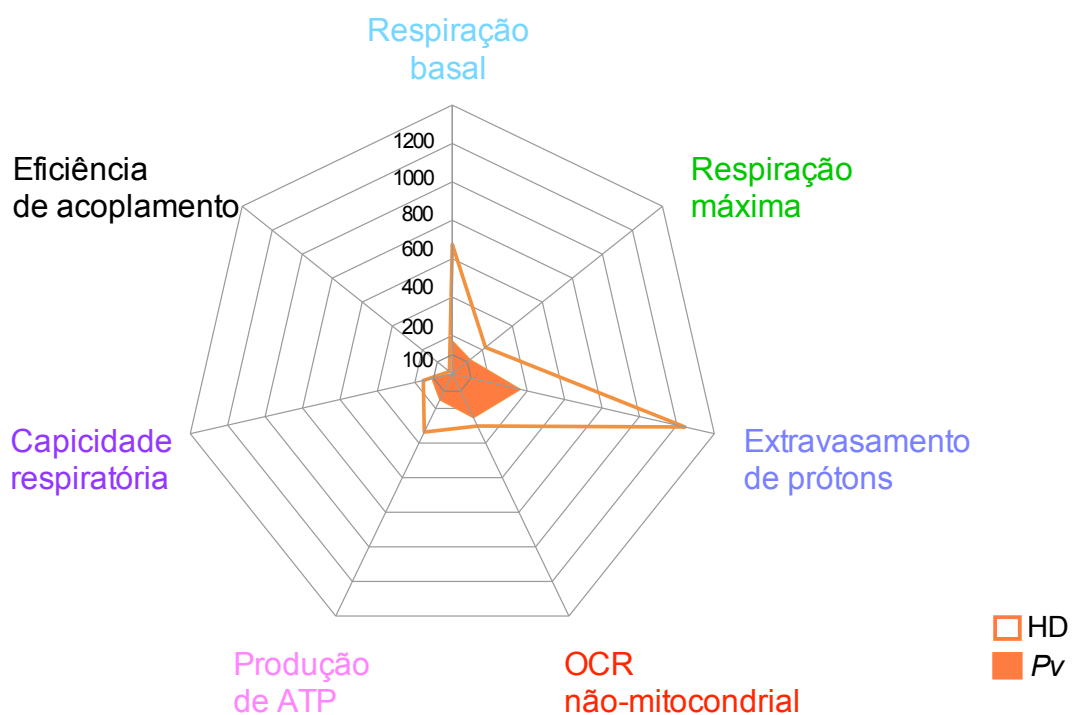
O *Cell Mito Stress Test* (CMST) foi utilizado com o intuito de explorar mais profundamente o metabolismo mitocondrial. A OCR basal e alterações nas medições de OCR em resposta ao tratamento com oligomicina, FCCP e rotenona + antimicina A foram utilizadas para avaliar os parâmetros bioenergéticos. A análise de fluxo extracelular foi realizada em monócitos circulantes purificados de pacientes infectados pelo *P. vivax* (símbolos cheios) e HD (símbolos abertos) estimulados com PMA (**Figura 13**) e as alterações na OCR foram usadas para avaliar a taxa respiratória basal (azul), extravasamento de prótons (roxo), taxa respiratória máxima (verde), consumo de oxigênio não-mitocondrial (vermelho), produção de ATP (rosa), capacidade respiratória (laranja) e eficiência de acoplamento (preto).

Altos níveis de respiração basal, produção de ATP e eficiência de acoplamento são observados em monócitos de doadores saudáveis (**Figura 13A, barras abertas**), indicando que o consumo de oxigênio está sendo usado para produzir níveis mais altos de ATP em doadores saudáveis de maneira eficiente. Por outro lado, os monócitos dos pacientes apresentaram uma diminuição em todos os parâmetros avaliados, exceto no consumo de oxigênio não mitocondrial (**Figura 13A, barras cheias**), indicando que a infecção pelo *P. vivax* causa alterações significativas no metabolismo mitocondrial dos monócitos, favorecendo um aumento do potencial de membrana mitocondrial em detrimento da produção de ATP. Esses dados foram confirmados como mostrado no gráfico de radar de pacientes (*Pv* – laranja cheio) e HD (laranja vazio) construído utilizando os parâmetros do CMST (**Figura 13B**), calculados com base na média global das células não estimuladas.

A



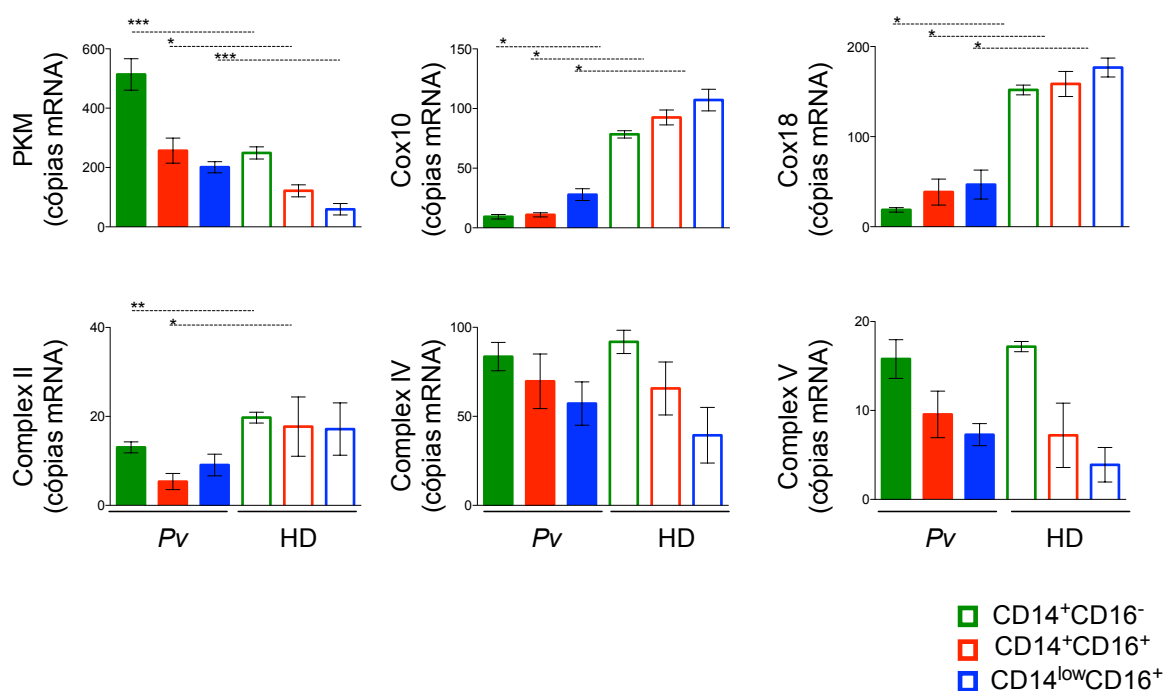
B



**Figura 13. A infecção pelo *P. vivax* altera características metabólicas de monócitos.** (A) Perfil do *Cell Mito Stress Test* (CMST) gerado durante análise de fluxo extracelular. Medições em tempo real da OCR em resposta a injeções de oligomicina, FCCP e antimicina A + rotenona realizada em monócitos circulantes de pacientes (símbolos cheios, n = 11) e HD (símbolos vazios, n = 7) estimulados com PMA, (E) com parâmetros bioenergéticos associados. (B) Gráfico de radar dos parâmetros de CMST calculados com base na média do não estimulado. \*  $p \leq 0,05$  \*\*  $p \leq 0,01$  \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

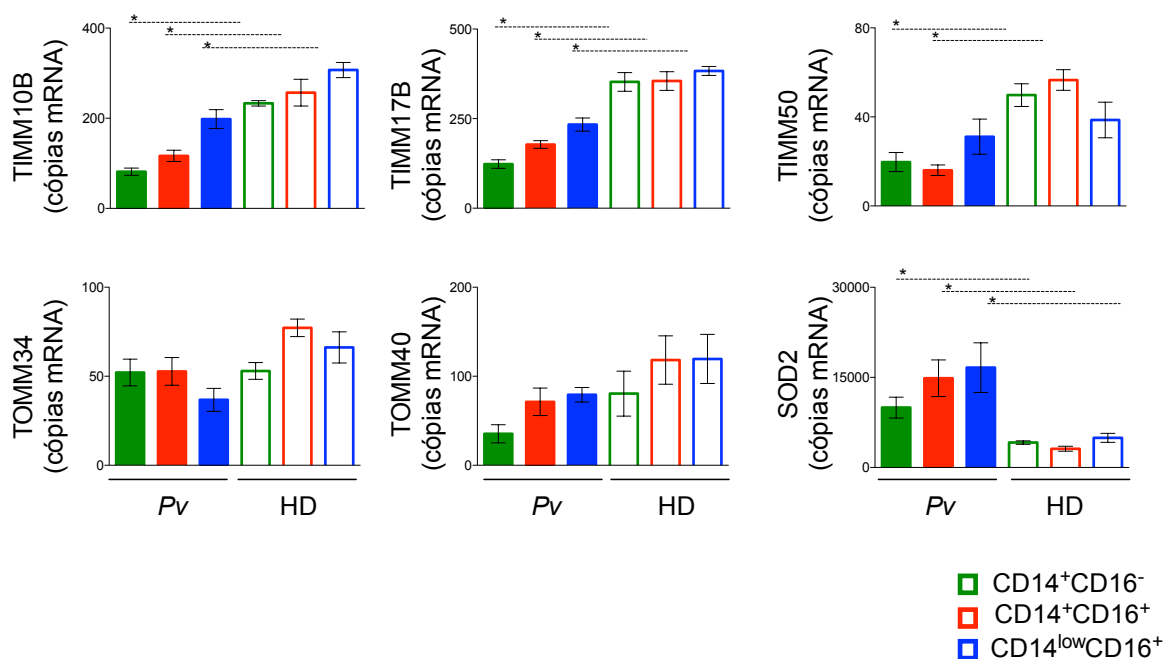
### **5.6 A transcrição de PKM e SOD2 são induzidas em monócitos de pacientes durante a malária ocasionada pelo *P. vivax***

Ainda com o intuito de desvendar as alterações do metabolismo de monócitos ocasionada pela infecção pelo *P. vivax*, o próximo passo foi avaliar o nível de transcrição de genes, em subpopulações de monócitos de pacientes com malária e HD, envolvidos na respiração celular, que engloba a glicólise, CAC e ETC. Foram mensurados os níveis de mRNA da enzima piruvato quinase (PKM), responsável pela última etapa da glicólise que consiste na transferência irreversível de um grupo fosfato do fosfoenolpiruvato para o ADP, gerando uma molécula de piruvato e uma de ATP [241]. Os complexos II, IV e V da CTE também foram avaliados e é importante destacar que o complexo II, também conhecido como succinato desidrogenase, é um componente tanto do CAC quanto da CTE. Foi observado um aumento nos níveis de PKM nos subpopulações de monócitos de pacientes em comparação aos dos HDs. Por outro lado, os níveis do complexo II estão diminuídos nos monócitos de pacientes, mas não observamos diferenças para os complexos IV e V. Apesar de não observarmos diferença nos níveis do complexo IV entre pacientes e HD, foi revelada uma diminuição significativa nos níveis de Cox10 e Cox18 em monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax* (**Figura 14**), ambas proteínas sendo essenciais para a inserção do complexo IV na membrana mitocondrial interna [253]. Portanto, esses resultados indicam que há um aumento na glicólise em monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax*, com algumas deficiências sendo observadas nos processos do CAC e da ETC.



**Figura 14. Genes envolvidos no CAC e CTE possuem transcrição diminuída durante a infecção pelo *P. vivax*.** Número de cópias de mRNA de PKM, dos complexos II, IV e V e de *cox10* e *cox18*. (pacientes n=8, controles n=8). Monócitos clássicos estão representados em verde, os inflamatórios ou intermediários em vermelho e os patrulhadores em azul \* p≤0,05 \*\* p≤0,01 \*\*\*p≤0,001.

A maioria dos genes envolvidos no transporte de vários metabólitos teve sua expressão diminuída durante a malária causada pelo *P. vivax*, especialmente aqueles envolvidos na montagem do complexo TIM, responsável pelo transporte do espaço intermembranar para a matriz mitocondrial. O mesmo não foi observado para o complexo TOM, que realiza o transporte do citoplasma para o espaço intermembranar. Além disso, observou-se que a enzima antioxidante mitocondrial SOD2 é altamente expressa em monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax*, o que é consistente com a análise de assinatura que mostra que a maioria dos pacientes infectados pelo *P. vivax* produz níveis de SOD2 acima da mediana global da população analisada (**Figura 15, Figura 8B**).



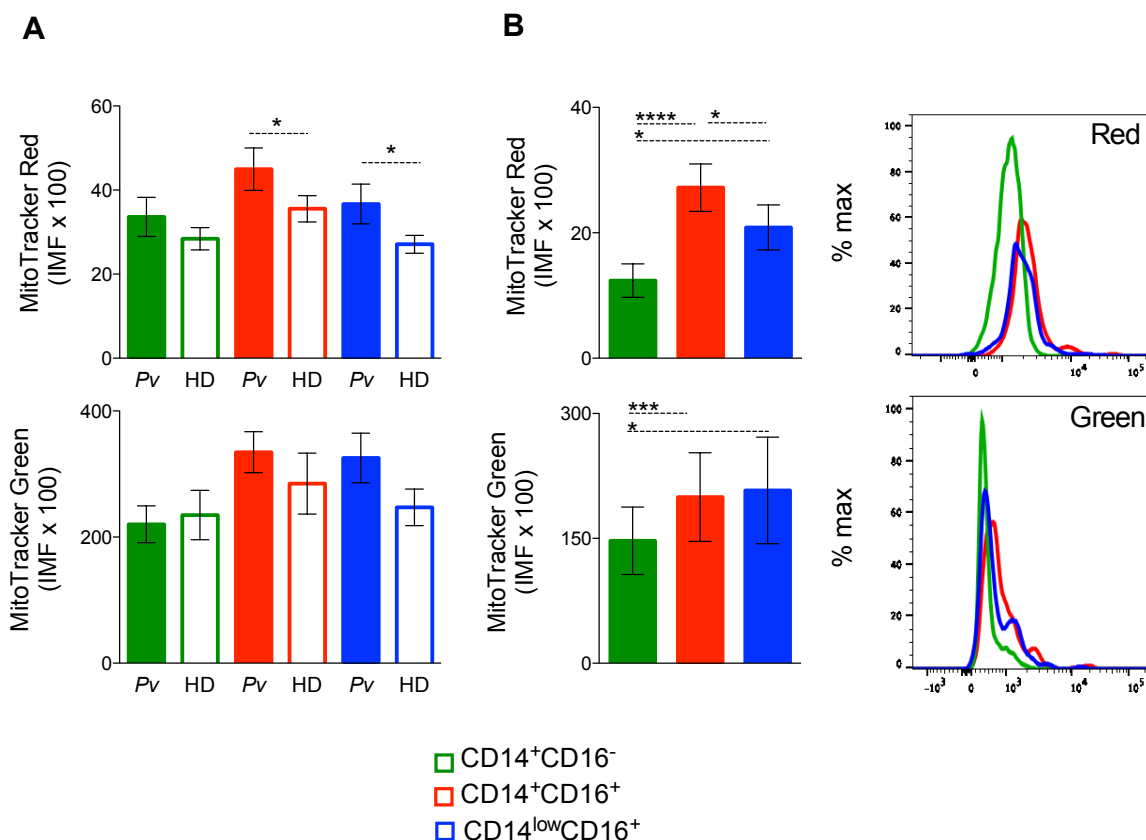
**Figura 15. Genes envolvidos no controle antioxidante da mitocôndria e na montagem do complexo TIM, mas não TOM, possuem transcrição diminuída durante a malária causada pelo *P. vivax*.** Número de cópias de mRNA dos genes envolvidos na montagem do complexo TIM, do complexo TOM e no controle antioxidante mitocondrial nas subpopulações de monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax* (Pv n=5 – barras cheias) e de doadores saudáveis (HD n=4 – barras vazias). Monócitos clássicos estão representados em verde, os inflamatórios ou intermediários em vermelho e os patrulhadores em azul. \* p ≤ 0,05 \*\* p ≤ 0,01 \*\*\* p ≤ 0,001. (C)

### 5.7 A infecção pelo *Plasmodium vivax* altera o conteúdo mitocondrial das subpopulações de monócitos

Visto as diferenças observadas na expressão gênica mitocondrial e considerando o papel central das mitocôndrias na manutenção do metabolismo celular e na produção de superóxido intracelular [281], nosso próximo passo foi avaliar o conteúdo mitocondrial das subpopulações de monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax*. Para tal propósito, foram utilizadas as sondas *MitoTracker Green* e *MitoTracker Red CMX-Ros*, a primeira é utilizada para marcação total de mitocôndrias, enquanto o acúmulo da segunda na mitocôndria é dependente do potencial de membrana da mesma. A fim de desvendar possíveis alterações causadas pela infecção pelo *P. vivax* no metabolismo mitocondrial desses monócitos, nós comparamos a reatividade dos mesmos às sondas supracitadas em pacientes na fase aguda da doença (Pv) e em indivíduos saudáveis (HD). Foi observada a mesma reatividade para *MitoTracker Green* nos monócitos de pacientes e HDs (Figura 16A, painel inferior), sugerindo que a infecção não altera

o número de mitocôndrias dentro da célula. No entanto, monócitos inflamatórios e patrulhadores de indivíduos infectados apresentaram uma maior reatividade ao *MitoTracker Red CMX-Ros* em comparação aos mesmos subtipos dos doadores saudáveis (**Figura 16A, painel superior**). Esses dados indicam que as mitocôndrias dos pacientes se encontram mais ativadas que as dos HDs, devido ao aumento no potencial de membrana mitocondrial indicado pelo *MitoTracker Red CMX-Ros*, sugerindo que a malária aumenta a atividade mitocondrial nesses monócitos.

A intensidade média de fluorescência (IMF) das sondas foi também analisada *ex vivo* nas subpopulações de monócitos por citometria de fluxo. Foi observado que monócitos inflamatórios e patrulhadores apresentam maior reatividade com a sonda *MitoTracker Green* que os monócitos clássicos, indicando um maior conteúdo mitocondrial nos mesmos (**Figura 16B, painel inferior**), em relação ao *MitoTracker Red CMX-Ros*, os monócitos inflamatórios apresentaram mais reatividade em comparação as demais subpopulações, inferindo-se uma maior atividade mitocondrial nessas células (**Figura 16B, painel superior**).



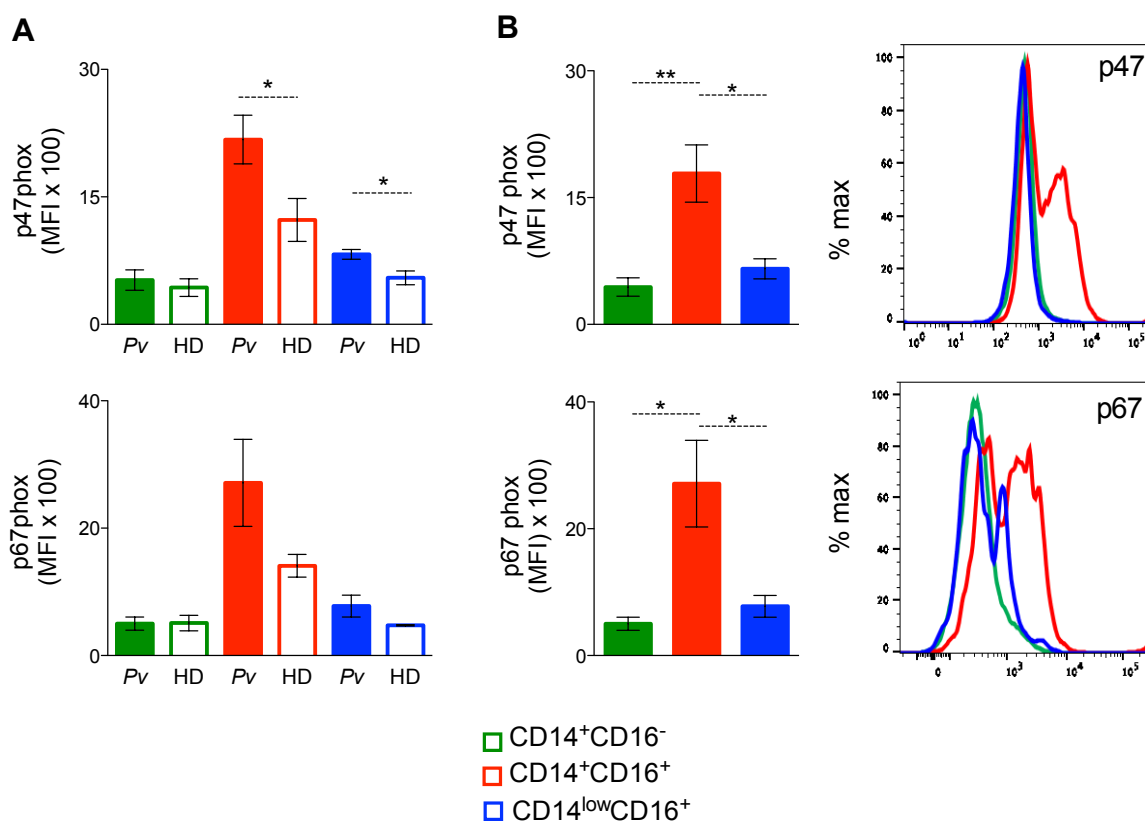
**Figura 16. *Plasmodium vivax* altera o conteúdo mitocondrial nos subtipos de monócitos.** (A) IMF *ex vivo* das sondas *MitoTracker Green* (painel inferior) e *MitoTracker Red CMX-Ros* (painel superior) nos subtipos de monócitos de pacientes (*Pv* n=10, barra cheia) e indivíduos saudáveis (HD n=5, barra aberta). (B) Gráficos de barra (esquerda) e histogramas representativos (direita)

demonstrando a massa e o conteúdo mitocondrial baseado na intensidade média de fluorescência (IMF) do *MitoTracker Green* (painel inferior) e *MitoTracker Red CMX-Ros* (painel superior) respectivamente, nas subpopulações de monócitos de pacientes (n=25). Monócitos clássicos estão representados em verde, os inflamatórios ou intermediários em vermelho e os patrulhadores em azul. \*  $p \leq 0,05$  \*\*  $p \leq 0,01$  \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

### **5.8 A infecção pelo *Plasmodium vivax* aumenta a atividade de NADPH oxidase nas subpopulações de monócitos**

O complexo enzimático NADPH oxidase também constitui uma importante fonte de ROS intracelular sendo responsável pela explosão oxidativa, importante estratégia utilizada por fagócitos na morte de parasitos [278]. Sendo assim, avaliamos a ativação do complexo NADPH oxidase nas subpopulações de monócitos de pacientes durante a fase aguda da doença. Para tal, a expressão *ex vivo* de pphox 47 e pphox 67, componentes citosólicos do complexo NADPH oxidase, foi avaliada por citometria de fluxo. Com intuito de avaliar possíveis alterações causadas pela infecção pelo *P. vivax* na ativação do complexo NADPH oxidase nas subpopulações de monócitos, nós comparamos a expressão das subunidades supracitadas em subtipos de monócitos de pacientes (*Pv*) e de doadores saudáveis (HD). Todos os subtipos de monócitos de pacientes e doadores saudáveis apresentaram a mesma expressão de pphox 67 (**Figura 17A, painel inferior**). No entanto, monócitos  $CD14^+CD16^+$  e  $CD14^{low}CD16^+$  de indivíduos infectados apresentaram IMF aumentada de pphox 47 em comparação aos mesmos monócitos de doadores saudáveis (**Figura 17A, painel superior**). Esses resultados sugerem que a malária induz um aumento na atividade do complexo NADPH oxidase nas subpopulações de monócitos. Além disso, foi observado que os monócitos inflamatórios apresentaram expressão de pphox 47 (**Figura 17B, painel superior**) e pphox 67 (**Figura 17B, painel inferior**) aumentadas em relação aos demais subtipos, o que é compatível com o perfil mais pró-inflamatório desse tipo celular.





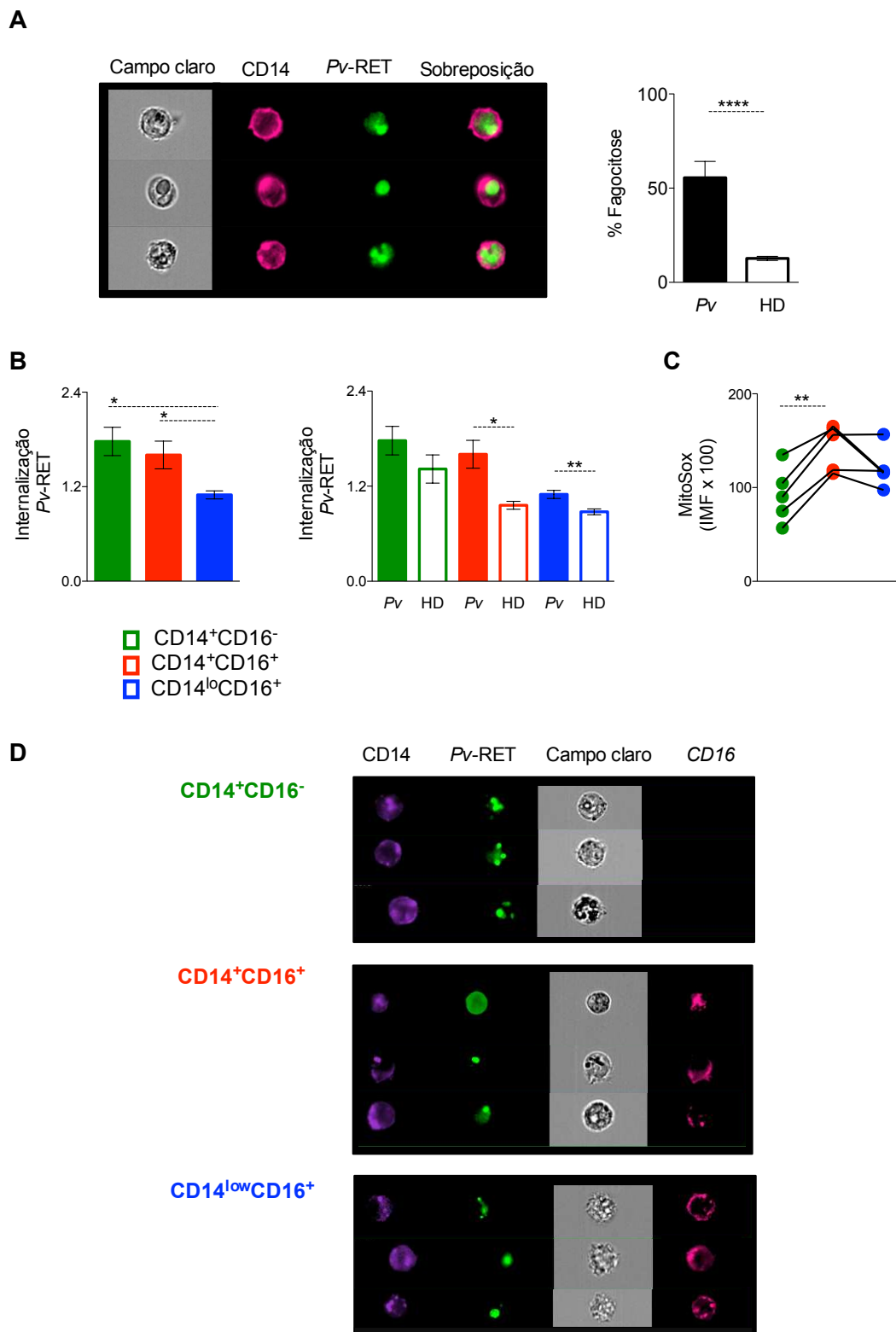
**Figura 17. *Plasmodium vivax* altera atividade de NADPH oxidase nos subtipos de monócitos.** (A) IMF *ex vivo* de p47phox (painel superior) e p67phox (painel inferior) nos subtipos de monócitos de pacientes (Pv n=10, barra cheia) e indivíduos saudáveis (HD n=5, barra aberta). (B) Gráficos de barra (esquerda) e histogramas representativos (direita) demonstrando a IMF *ex vivo* de p47phox (painel superior) e p67phox (painel inferior), respectivamente nas subpopulações de monócitos de pacientes (n=10). Monócitos clássicos estão representados em verde, os inflamatórios ou intermediários em vermelho e os patrulhadores em azul. \* p≤0,05 \*\* p≤0,01 \*\*\*p≤0,001.

### 5.9 Monócitos de pacientes fagocitam mais Pv-RET que os de HDs

Nosso grupo demonstrou anteriormente que os monócitos inflamatórios controlam melhor o parasito em comparação aos demais subtipos [52]. Curiosamente, essa subpopulação também produz mais mROS que as outras. Estudos demonstraram o papel de mROS no controle de diferentes parasitos [277,288]. Diante disso e visto que a infecção pelo *P. vivax* alterou significativamente o metabolismo e a atividade mitocondrial em monócitos, nos perguntamos se o mROS produzidos pelos monócitos poderia estar envolvido no controle do *P. vivax*.

A fim de entender melhor o que acontece durante a fagocitose do Pv-RET por monócitos, nós utilizamos citometria de fluxo com imagem (*ImageStream Mark II*, *Merck-Millipore*). De maneira geral, células CD14<sup>+</sup> foram purificadas de pacientes e indivíduos saudáveis por FACS e as cultivamos com Pv-RET marcado com FITC

durante 3 horas. Inicialmente, foi comparada a capacidade fagocitária entre monócitos de pacientes e de HDs. Foi observado que monócitos de pacientes apresentam maior fagocitose do que de HDs (**Figura 18A**). Ao analisarmos a capacidade de internalização do *Pv*-RET pelas subpopulações de monócitos, notamos que os monócitos clássicos e inflamatórios de pacientes internalizam mais que os patrulhadores (**Figura 18B painel esquerdo e 18D**). Além disso, os monócitos inflamatórios e patrulhadores de pacientes apresentam maior internalização que as mesmas subpopulações de indivíduos saudáveis, mas para os monócitos clássicos não foi observada nenhuma diferença (**Figura 18B, painel direito**). Também foi demonstrado que monócitos inflamatórios produzem mais mROS que os monócitos clássicos (**Figura 18C**).

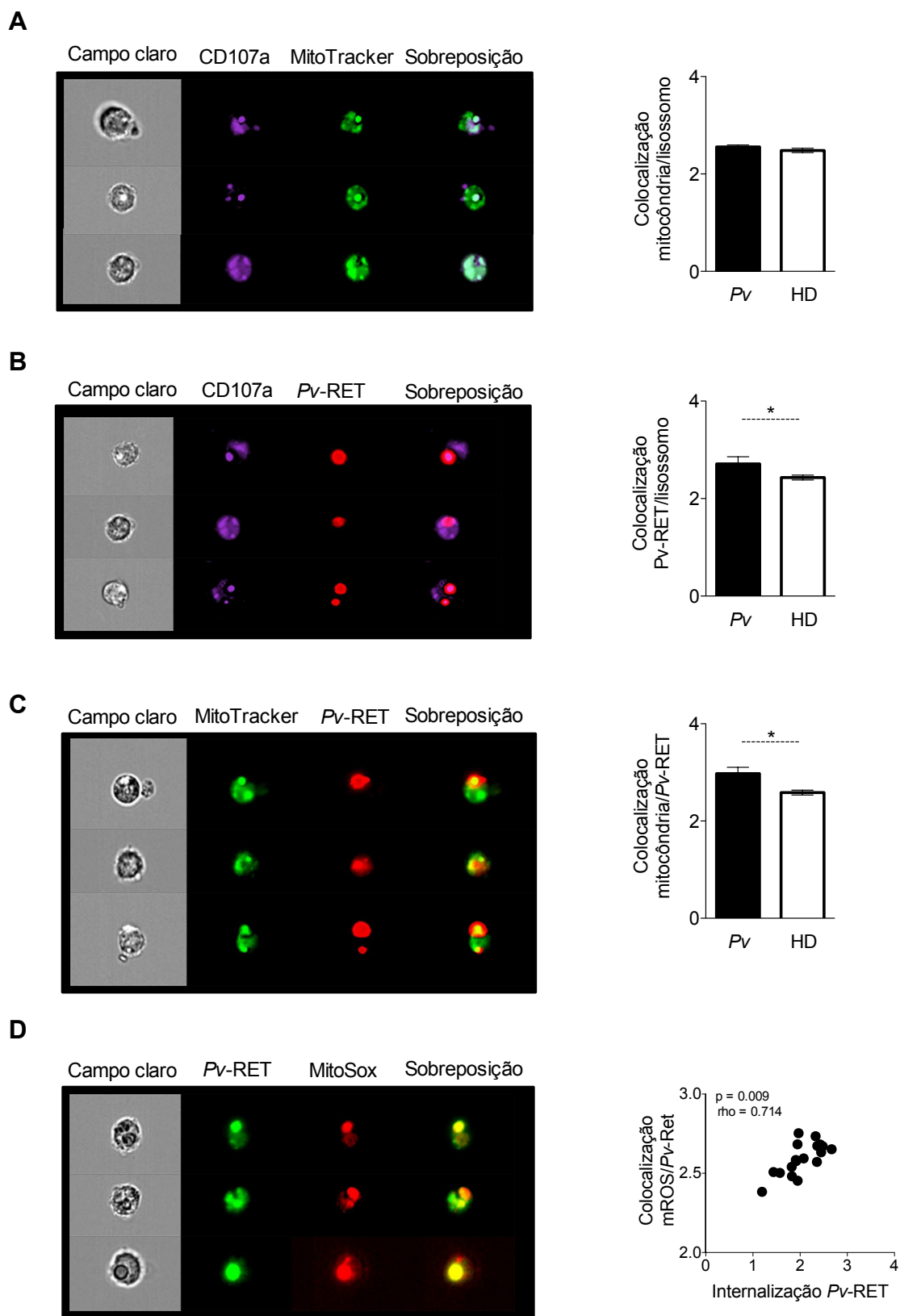


**Figura 18. Monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax* apresentam maior taxa de fagocitose do que os de HDs.** (A) Imagens representativas da internalização de *Pv*-RET (FITC - verde) por monócitos (CD14 - rosa) (painel esquerdo) e taxa de fagocitose em monócitos de pacientes com malária (*Pv* n=10) e doadores saudáveis (HD n=8) (painel direito). (B) Índice de internalização do *Pv*-RET por subpopulações de monócitos de *Pv* (n=6) (painel esquerdo) e entre monócitos de *Pv* e HD (n=5) (painel direito). (C) Produção de mROS pelas subpopulações de monócitos. (D) Imagens representativas demonstrando a internalização do *Pv*-RET por cada subpopulação de monócitos. \*  $p \leq 0,05$  \*\*  $p \leq 0,01$  \*\*\*  $p \leq 0,001$  \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

### **5.10 Mitocôndrias migram para o fagolisossomo contendo Pv-RET e produzem mROS**

Sabendo que mROS são moléculas com meia-vida relativamente curta, acredita-se que a colocalização entre o seu sítio de produção e seu alvo aumentaria sua eficiência funcional [287]. Sendo assim, nós avaliamos a colocalização entre mitocôndrias e lisossomos. Para isso, purificamos células CD14<sup>+</sup> de pacientes (*Pv*) e de HDs por FACS e cultivamos com reticulócitos infectados pelo *P. vivax* corados com Alexa 647 durante 3 horas. Após esse tempo, utilizamos a sonda *MitoTracker Green* para corar as mitocôndrias e anticorpo  $\alpha$ -CD107a conjugado com BV-450 para marcar os lisossomos e analisamos a colocalização por citometria de fluxo de imagem.

Os monócitos de pacientes e HD apresentaram o mesmo grau de colocalização, indicando que independentemente da infecção, as mitocôndrias são igualmente capazes de migrar para o fagolisossomo (**Figura 19A**). No entanto, os monócitos dos pacientes apresentam níveis mais altos de colocalização entre fagolisossomos e *Pv*-RET (**Figura 19B**), bem como entre mitocôndrias e *Pv*-RET (**Figura 19C**). Esses dados sugerem que a colocalização semelhante observada entre mitocôndrias e fagolisossomos de pacientes e HD é alterada quando o fagolisossomo contém o *Pv*-RET. Nesse caso, observa-se maior colocalização em monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax* do que em monócitos de indivíduos saudáveis. Perguntamos ainda se a migração das mitocôndrias para o fagolisossomo contendo *Pv*-RET favoreceria a produção de mROS. Assim, avaliamos a colocalização de *Pv*-RET e MitoSox que apresentou forte correlação positiva com a internalização de *Pv*-RET (**Figura 19D**).



**Figura 19. Mitocôndrias migram para o lisossomo contendo o Pv-RET.** (A) Imagens representativas da colocalização entre lisossomos (aCD107-a - roxo) e mitocôndrias (*MitoTracker* - verde) em monócitos (painel esquerdo) e gráfico de dispersão comparando os níveis de colocalização entre monócitos de pacientes (Pv) e doadores saudáveis (HD) (painel direito). (B) Imagens representativas da colocalização entre lisossomos e mitocôndrias (*MitoTracker* - verde) em monócitos (painel esquerdo) e gráfico de dispersão comparando os níveis de colocalização entre monócitos de

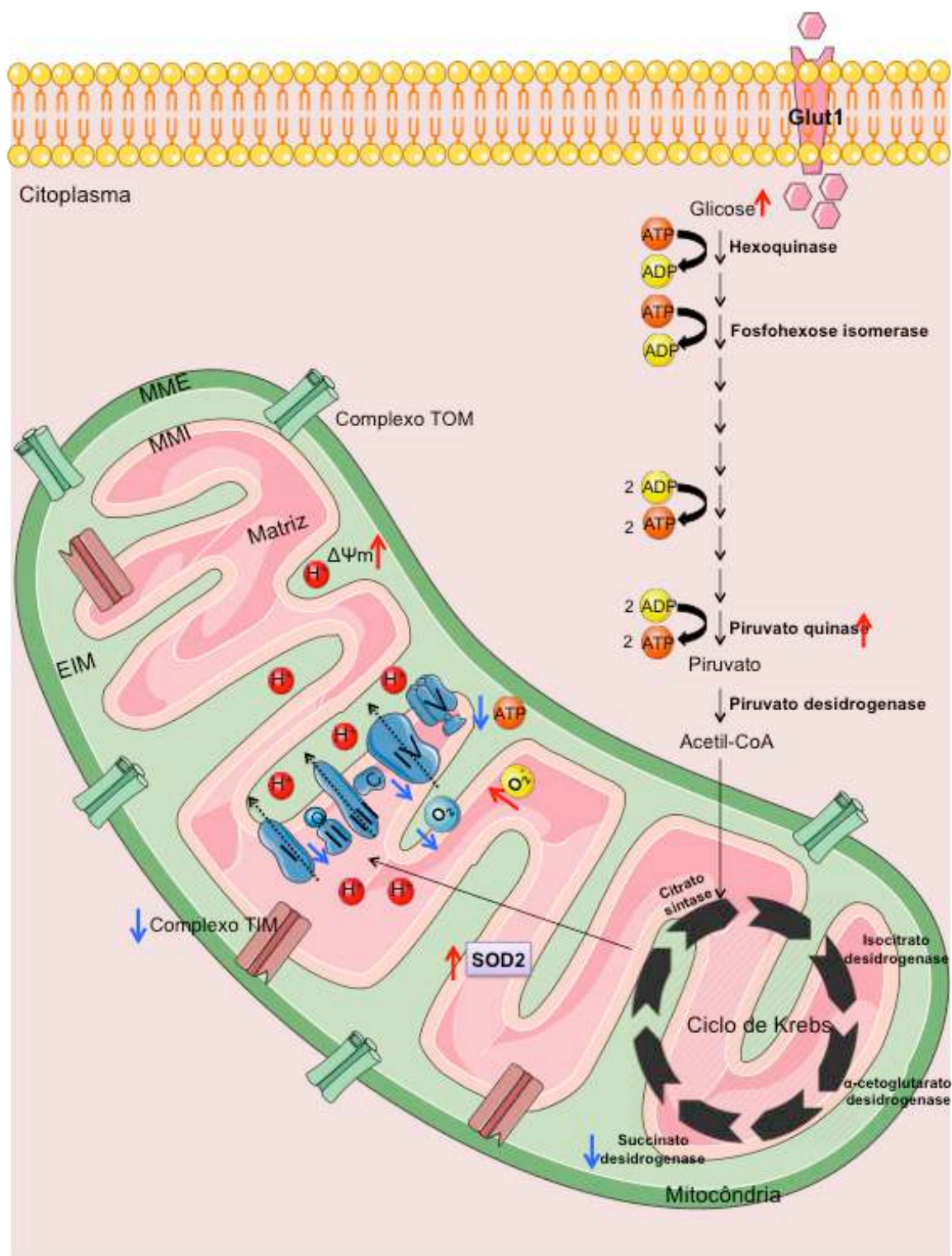
*Pv* e HDs (painel direito). (C) Imagens representativas da colocalização entre mitocôndrias e *Pv*-RET em monócitos (painel esquerdo) e gráfico de dispersão comparando os níveis de colocalização entre monócitos de *Pv* e HDs (painel direito). (D) Imagens representativas da colocalização entre *Pv*-RET (verde) e mROS (*MitoSox* – vermelho) e correlação entre internalização de *Pv*-RET e a colocalização de *Pv*-RET e *mitoSox*. \* $p \leq 0,05$ .

### **5.11 Resumo esquemático dos resultados**

Em conjunto, nossos resultados demonstram que a infecção pelo *P. vivax* ocasiona alterações substanciais no metabolismo de monócitos. A malária causa um aumento na captação de glicose e na expressão da enzima piruvato quinase em monócitos de pacientes, indicando aumento da glicólise nessas células. Apesar de não produzir níveis altos de ATP como a fosforilação oxidativa, essa via é capaz de produzir ATP a nível do substrato, podendo, portanto, suprir as necessidades energéticas dos monócitos no contexto de ativação celular.

Encontramos também uma diminuição da enzima succinato desidrogenase, que atua tanto no CAC quanto na CTE, indicando que esses dois processos podem ter sua atividade diminuída durante a infecção malárica. Condizente com esse contexto, demonstramos que há uma diminuição na expressão gênica de proteínas responsáveis pela inserção do Complexo IV na membrana mitocondrial interna, bem como diminuição do consumo de oxigênio e da produção de ATP, e consequente aumento do potencial de membrana mitocondrial. Sendo essa diferença de potencial de membrana importante para a produção de espécies reativas de oxigênio pela mitocôndria [285,298].

Além disso, houve diminuição na expressão gênica de importantes componentes do complexo TOM nas mitocôndrias de pacientes, corroborando que a malária causa diminuição da atividade do CAC e da CTE, uma vez que esse complexo é responsável pelo transporte de proteínas para a matriz mitocondrial, local onde esses processos ocorrem.



**Figura 20. Esquema geral das alterações causadas pelo *P. vivax* em monócitos.** A infecção pelo *P. vivax* estimula o aumento da captação de glicose bem como a expressão de PKM por monócitos. Além disso, há uma diminuição na transcrição de genes importantes que atuam no CAC e na CTE que indicam uma possível diminuição na atividade dessas vias, o que é reforçado pela diminuição no consumo de oxigênio e produção de ATP via fosforilação oxidativa, o que ocasiona o aumento do potencial de membrana mitocondrial e conseqüentemente estimula a produção de mROS por essas células. As setas pretas indicam o caminho das reações e o bombeamento de prótons na CTE.





### **5.12 População de estudo**

Um total de 54 pacientes com malária não complicada causada pelo *Plasmodium vivax* ou pelo *P. falciparum* foram incluídos nesse estudo no Centro de Pesquisa de Medicina Tropical de Rondônia (CEPEM) em Porto Velho, Rondônia, área endêmica na região Amazônica do Brasil. A população de estudo foi constituída por nove mulheres (16.7%) e 45 homens (83.3%), com faixa etária de 18 a 69 anos ( $35.5 \pm 11,13$ ). As manifestações clínicas observadas foram: febre, calafrio, náusea, vômito, diarreia, mialgia, cefaleia, artralgia e icterícia (**Tabela 5**). Adicionalmente, foram realizados exames complementares como hemograma (**Tabela 6**) e avaliação de parâmetros bioquímicos (**Tabela 7**).

**Tabela 5.** Resumo da anamnese e exame clínico realizados em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* participantes do presente trabalho

ID	Sexo	Idade	# Casos			Parasitemia	Sintomas								
			1 <sup>st</sup>	<	≥		Febre	Calafrio	Náusea	Vômito	Diarreia	Mialgia	Cefaleia	Artralgia	Icterícia
P 68	M <sup>1</sup>	24			X	+	S <sup>4</sup>	S	N <sup>5</sup>	N	N	S	S	N	N
P 70	M	33	X			+	S	S	N	N	N	S	S	S	N
P 75	M	24		NI <sup>3</sup>		NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
P 78	M	18		X		NI	S	S	N	N	N	S	S	S	N
P 122	M	32	X			++	S	S	N	N	N	N	S	S	N
P 124	F <sup>2</sup>	26	X			+	S	N	N	N	N	S	N	S	N
P 125	M	41		X		+	S	N	N	N	N	S	S	S	N
P 127	M	27	X			++	S	N	N	N	N	S	S	S	N
P 128	F	33	X			+	S	N	S	N	N	S	S	N	N
P 129	M	40		X		++	N	N	S	N	N	S	S	N	N
P 130	M	30		X		++	S	S	S	N	N	S	S	S	N
P 131	M	39		X		+++	N	N	S	N	N	S	N	N	N
P 133	M	25		X		++	S	S	N	N	N	S	S	S	N
P 134	M	41	X			++	S	N	S	S	N	S	S	S	N
P 135	M	27		X		++	N	N	N	N	N	S	N	N	N
P 137	M	22		X		++	N	S	N	N	N	S	S	S	N
P 138	M	27		X		++	S	N	N	N	N	S	N	N	N
P 139	M	25		NI		++	N	N	N	N	N	S	N	N	N
P 140	M	29	X	X		NI	S	S	S	S	N	S	S	S	N
P 141	M	37	X			+++	N	S	S	N	S	N	S	S	N
P 142	M	63		X		++	S	S	N	N	N	S	N	S	N
P 143	M	24		X		NI	S	S	N	N	N	S	S	S	N
P 144	M	45		X		++	N	N	S	N	N	S	S	S	N
P 145	M	56		X		++	S	S	S	S	N	S	S	S	N
P 146	F	20	X			+	S	S	N	N	N	S	S	N	N
P 147	F	27		X		++	S	S	S	S	N	S	S	S	N
P 148	M	18	X			++	S	S	S	S	S	S	S	S	N
P 149	M	37	X			++	S	S	S	N	N	S	S	S	N
P 150	M	42	X			++	S	S	N	N	N	S	S	S	N
P 151	M	51		NI		++	S	S	N	N	N	S	S	S	N
P 152	M	33		X		++	S	S	S	N	N	S	S	S	N
P 153	F	24	X			++	S	S	S	N	N	S	S	S	N
P 154	F	37		X		++	S	S	S	N	N	S	S	S	N
P 155	M	56		NI		++	S	S	N	N	N	S	S	S	N
P 156	M	50		X		+	S	S	S	N	N	S	S	S	N
P 157	M	28		X		++	S	S	S	N	S	S	S	S	N
P 158	M	36		X		++	S	S	S	N	N	S	S	S	N
P 160	F	42		X		++	S	S	N	N	N	S	S	N	N
P 161	M	48		X		+++	S	S	N	N	N	S	S	S	N
P 162	M	38	X			+	S	S	N	N	N	S	S	S	N
P 163	F	42		X		++	S	S	N	N	N	S	S	S	N
P 164	M	36		X		++	S	S	N	N	N	S	S	N	N
P 165	M	38	X			NI	N	N	N	N	N	N	S	N	N
P 166	M	38		X		++	S	S	N	N	N	S	S	S	N
P 167	M	33		X		++	S	S	S	N	N	S	S	N	N
P 168	M	39		X		+++	S	S	S	S	N	S	S	S	N
P 169	F	37		X		++	S	S	S	N	N	S	S	S	N
P 170	M	69		X		++	S	S	S	S	N	S	N	S	N
Pf1	M	26		X		++	S	S	S	N	N	S	S	S	N
Pf2	M	56		NI		++	S	S	S	N	N	S	S	S	N
Pf3	M	32	X			+	S	S	N	N	N	S	S	S	N
Pf4	M	31		X		++	S	S	S	N	S	S	S	N	N
Pf5	M	NI		X		++	S	S	N	N	N	S	N	N	N
Pf6	M	31	X			+	S	S	S	N	S	S	S	S	N

(1) Masculino (M); (2) Feminino (F); (3) Não informado (NI); (4) Não (N); (5) Sim (S). + (≤500 parasitas/μl); ++ (500-10000 parasitas/μl); +++ (>10000 parasitas/μl). A designação dos pacientes iniciada com P é relativa ao *P. vivax* e Pf ao *P. falciparum*.

**Tabela 6.** Dados do hemograma realizado em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* participantes do presente trabalho

ID	Hemograma									
	Hct <sup>1</sup> %	Hb <sup>2</sup> g/dL	Hemáceas 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	VCM <sup>3</sup> fL	HCM <sup>4</sup> pg	CHCM <sup>5</sup> %	Leucócito s %	Monócito os %	Monócito s/mm <sup>3</sup>	Plaqa <sup>6</sup> 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>
P 68	40,0	13,0	4,50	88,0	28,0	32,0	11,8	4	472	194
P 70	48,0	17,0	5,68	84,0	29,0	35,0	3,0	4	120	21
P 75	38,0	12,4	4,60	82,0	26,0	32,0	8,5	4	340	153
P 78	NA <sup>7</sup>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P 122	43,6	14,3	4,98	87,5	28,7	32,8	9,7	5	458	185
P 124	37,4	12,0	4,88	76,6	24,6	32,1	3,2	6	192	223
P 125	43,9	14,3	5,35	82,0	26,7	32,5	9,8	3	294	207
P 127	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P 128	39,1	13,3	4,65	84,1	28,6	34,0	4,5	2	90	84
P 129	48,9	16,1	6,09	80,3	26,4	32,9	5,9	1	59	93
P 130	48,8	15,7	6,06	80,5	25,9	32,2	8,3	3	249	262
P 131	40,5	13,6	NA	NA	NA	NA	5,2	NA	NA	157
P 133	44,0	14,5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	187
P 134	35,4	12,1	4,05	87,4	29,9	34,2	5,8	12	696	71
P 135	41,8	14,4	4,76	87,8	30,2	34,4	4,3	8	344	148
P 136	40,0	14,1	4,69	85,3	30,1	35,2	5,6	1	56	234
P 137	41,3	14,1	4,86	85,0	29,0	34,1	3,9	8	312	78
P 138	43,9	15,8	5,17	84,9	30,6	36,0	8,3	4	332	134
P 139	45,8	15,3	5,30	86,4	28,9	33,4	6,0	5	300	97
P 140	38,7	13,1	4,48	86,4	29,2	33,8	4,8	7	336	NA
P 141	42,8	14,0	5,19	82,5	27,0	32,7	7,7	2	154	99
P 142	46,0	15,7	5,14	89,5	30,5	34,1	5,4	3	162	94
P 143	45,0	14,4	5,56	80,9	25,9	32,0	6,1	1	61	225
P 144	37,7	12,2	4,53	83,2	26,9	32,4	3,7	13	481	126
P 145	43,0	14,7	4,87	88,3	30,2	34,2	5,0	3	150	210
P 146	43,2	14,5	4,89	89,2	30,0	33,6	4,1	1	41	110
P 147	36,2	11,6	4,44	81,5	26,1	32,0	5,0	4	200	185
P 148	37,7	13,2	4,40	85,7	30,0	35,0	7,5	1	75	121
P 149	41,3	13,8	4,37	94,5	31,6	33,4	2,9	15	435	70
P 150	39,8	13,6	4,61	86,3	29,5	34,2	2,1	2	42	34
P 151	43,5	15,9	4,87	89,3	32,6	36,5	5,1	13	663	110
P 152	34,8	11,0	3,69	94,3	29,8	31,6	10,0	24	2424	185
P 153	27,8	8,5	3,43	81,0	24,6	30,4	15,4	3	462	516
P 154	46,6	16,2	5,50	84,7	29,5	34,8	4,9	6	298	89
P 155	43,0	14,7	4,91	87,6	29,9	34,2	3,4	4	137	91
P 156	44,0	14,3	5,01	87,8	28,5	32,5	3,9	9	352	142
P 157	42,8	14,0	5,37	79,7	26,1	32,7	7,5	3	225	235
P 158	45,4	14,9	5,47	83,0	27,2	32,8	3,7	5	185	90
P 160	38,4	11,9	4,73	81,2	25,1	31,0	6,6	20	1330	150
P 161	38,2	12,2	4,26	89,7	28,6	32,9	7,7	8	616	85
P 162	47,3	15,5	5,19	91,1	29,8	32,8	3,6	7	252	107
P 163	39,3	13,1	4,82	81,5	27,2	33,3	7,1	5	358	134
P 164	44,2	14,0	5,36	82,5	26,1	31,7	3,7	4	147	55
P 165	44,9	14,7	4,84	92,8	30,4	32,7	7,0	8	563	195
P 166	43,9	14,3	4,73	92,8	30,2	35,6	5,8	4	230	127
P 167	43,3	14,2	4,91	88,2	29,0	32,8	3,2	4	126	131
P 168	40,4	12,4	4,42	91,4	28,0	30,7	4,4	5	220	69
P 169	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P 170	39,8	12,0	4,61	86,3	26,0	30,1	7,5	5	375	90
Pf1	48,3	15,3	5,58	86,5	27,4	31,7	3,5	9	319	70
Pf2	47,8	15,2	5,58	85,6	27,2	31,8	7,7	8	617	277
Pf3	37,1	12,6	4,49	82,6	28,1	34,0	3,7	5	187	115
Pf4	49,6	15,8	5,32	93,2	29,7	31,9	3,7	8	296	142
Pf5	42,9	13,5	4,80	89,4	28,1	34,5	8,2	6	489	207
Pf6	40,6	12,9	4,91	82,7	26,3	31,8	5,7	1	57	82
Média	42,0	13,9	4,90	85,9	28,3	33,1	5,9	6	348	141

(1) Hematócrito (Hct); (2) Hemoglobina (Hb); (3) Volume corpuscular médio (VCM); (4) Hemoglobina corpuscular média (HCM); (5) Concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM); (6) Plaquetas (Plaqa); (7) Não avaliado (NA). A designação dos pacientes iniciada com P é relativa ao *P. vivax* e Pf ao *P. falciparum*.

**Tabela 7.** Dados dos exames bioquímicos realizados em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* participantes do presente trabalho

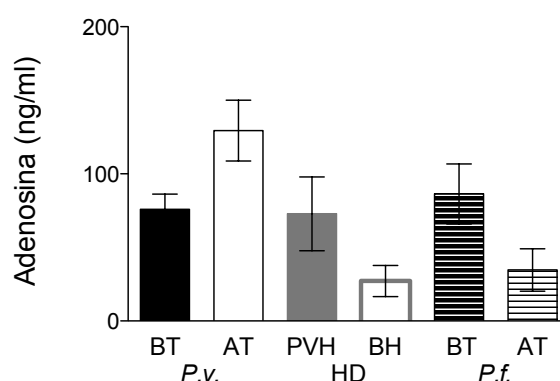
ID	Parâmetros bioquímicos									
	CR <sup>1</sup> mg/dL	Ureia mg/dL	BT <sup>2</sup> mg/Dl	BD <sup>3</sup> g/dL	BI <sup>4</sup> g/dL	Colesterol total <sup>6</sup> u/dL	Triglicéridos <sup>7</sup> ma/dL	TGO U/L	TGP U/L	FAL <sup>5</sup> U/L
P 68	1,20	40,0	1,00	0,70	0,30			20	34	NA
P 70	0,85	29,0	0,89	0,36	0,53	NA	NA	100	120	228
P 75	1,20	30,0	0,80	0,50	0,30	NA	NA	31	43	147
P 78	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P 122	1,00	29,0	1,31	NA	NA	NA	NA	21	13	62
P 124	0,60	12,0	0,40	0,20	0,20	123	69	52	38	86
P 125	0,81	27,0	0,60	0,30	0,30	184	255	20	29	85
P 127	0,90	25,3	0,95	0,49	0,46	NA	NA	82	43	152
P 128	0,50	19,0	0,60	0,25	0,35	115	179	247	147	112
P 129	0,80	33,0	0,90	0,45	0,45	160	252	34	41	104
P 130	0,90	31,1	0,24	NA	NA	289	524	18	23	93
P 131	0,80	17,0	0,58	0,34	0,24	NA	NA	23	16	69
P 133	0,80	25,5	0,42	0,14	0,28	NA	NA	27	34	70
P 134	1,00	49,0	2,05	0,57	1,48	NA	NA	18	11	56
P 135	1,00	34,0	1,40	0,40	1,00	98	NA	32	34	87
P 136	0,80	18,5	0,61	0,23	0,38	218	146	22	28	NA
P 137	NA	19,0	NA	NA	NA	98	151	20	15	53
P 138	0,80	18,7	1,96	0,58	1,38	110	61	18	16	NA
P 139	0,90	28,3	0,70	0,24	0,46	157	144	14	15	50
P 140	0,80	32,3	2,07	0,86	1,20	121	223	41	100	67
P 141	1,20	53,6	1,16	0,44	0,72	128	377	16	18	63
P 142	0,80	37,1	1,98	0,66	1,32	126	418	16	13	84
P 143	0,80	23,6	0,53	0,14	0,39	207	165	21	28	104
P 144	0,80	15,5	0,76	NA	NA	119	77	16	10	44
P 145	0,50	30,4	1,00	0,56	0,44	164	122	26	15	80
P 146	0,60	15,0	0,46	0,26	0,20	111	78	61	58	86
P 147	0,60	19,0	0,53	0,33	0,20	125	276	26	22	64
P 148	1,00	32,0	1,94	0,94	1,00	88	59	49	26	75
P 149	0,90	37,5	1,00	NA	NA	102	96	22	9	60
P 150	0,80	26,5	0,75	NA	NA	121	214	48	43	52
P 151	0,70	23,0	0,40	0,10	0,30	195	99	30	61	164
P 152	1,00	40,0	NA	NA	NA	143	119	37	29	279
P 153	0,60	25,0	0,30	0,10	0,20	189	176	11	24	239
P 154	0,60	13,0	0,60	0,30	0,30	134	129	82	232	262
P 155	0,70	41,0	2,20	1,50	0,70	119	107	24	18	78
P 156	0,60	40,0	0,80	0,20	0,60	152	96	18	17	256
P 157	0,70	40,0	1,30	0,30	1,00	144	124	27	28	164
P 158	0,60	40,0	2,20	1,00	1,20	117	165	34	68	415
P 160	0,70	35,0	1,00	0,60	0,40	136	120	75	19	232
P 161	1,30	40,0	2,90	0,60	2,30	151	130	27	28	177
P 162	0,90	42,0	1,40	0,30	1,10	154	73	53	121	234
P 163	0,90	24,0	1,30	0,40	0,90	175	68	5	6	138
P 164	1,20	28,0	1,20	0,70	0,50	199	198	51	55	NA
P 165	1,50	46,0	0,50	0,30	0,20	218	326	38	41	186
P 166	1,10	18,0	NA	NA	NA	130	93	29	25	205
P 167	1,00	18,0	1,30	0,50	0,80	124	67	NA	NA	178
P 168	0,80	27,0	NA	NA	NA	98	183	NA	NA	193
P 169	0,50	31,0	0,60	0,30	0,30	121	206	37	52	186
P 170	1,30	58,0	1,10	0,30	0,80	115	157	20	15	NA
Pf1	0,89	30,0	0,80	0,20	0,60	124	95	45	74	NA
Pf2	0,60	38,0	0,80	0,20	0,60	124	204	60	88	359
Pf3	0,90	32,0	NA	NA	NA	NA	NA	96	73	NA
Pf4	1,10	30,0	1,30	0,30	1,00	120	125	21	30	128
Pf5	0,90	37,0	1,20	0,40	0,80	192	132	52	56	231
Pf6	0,90	38,0	4,30	2,60	1,70	118	313	58	70	241
M é dia	0,86	30,41	1,12	0,48	0,68	143,47	167,98	39,83	43,69	144,21

(1) Creatinina (Cr); (2) Bilirrubina total (BT); (3) Bilirrubina direta (BD); (4) Bilirrubina indireta (BI); (5) Fosfatase alcalina (FAL); (7) Não avaliado (NA). A designação dos pacientes iniciada com P é relativa ao *P. vivax* e Pf ao *P. falciparum*.

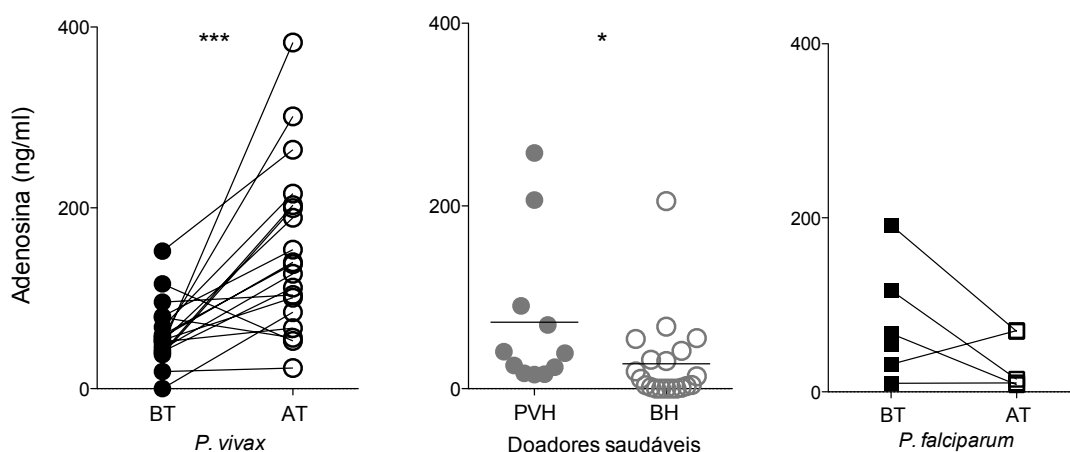
### 5.13 Os níveis de adenosina no plasma aumenta em pacientes infectados pelo *P. vivax* após o tratamento

A fim de determinar se a adenosina possui um papel relevante na malária, primeiramente foi mensurado os níveis plasmáticos de adenosina em pacientes infectados pelo *P. vivax* (*P.v.*) e *P. falciparum* (*P.f.*), antes (BT) e após o tratamento (AT), bem como em doadores saudáveis (HD) de área endêmica (PVH) e não endêmica (BH) (**Figura 21A**). Foi demonstrado um aumento nos níveis plasmáticos de adenosina em pacientes com malária causada pelo *P. vivax* após o tratamento (**Figura 21B, painel esquerdo**). O mesmo não foi observado na malária *falciparum*, cujos níveis não foram alterados (**Figura 21B, painel direito**). Curiosamente, indivíduos saudáveis de área endêmica apresentaram níveis mais altos de adenosina circulante do que doadores saudáveis de uma área não endêmica (**Figura 21B, painel central**).

**A**



**B**



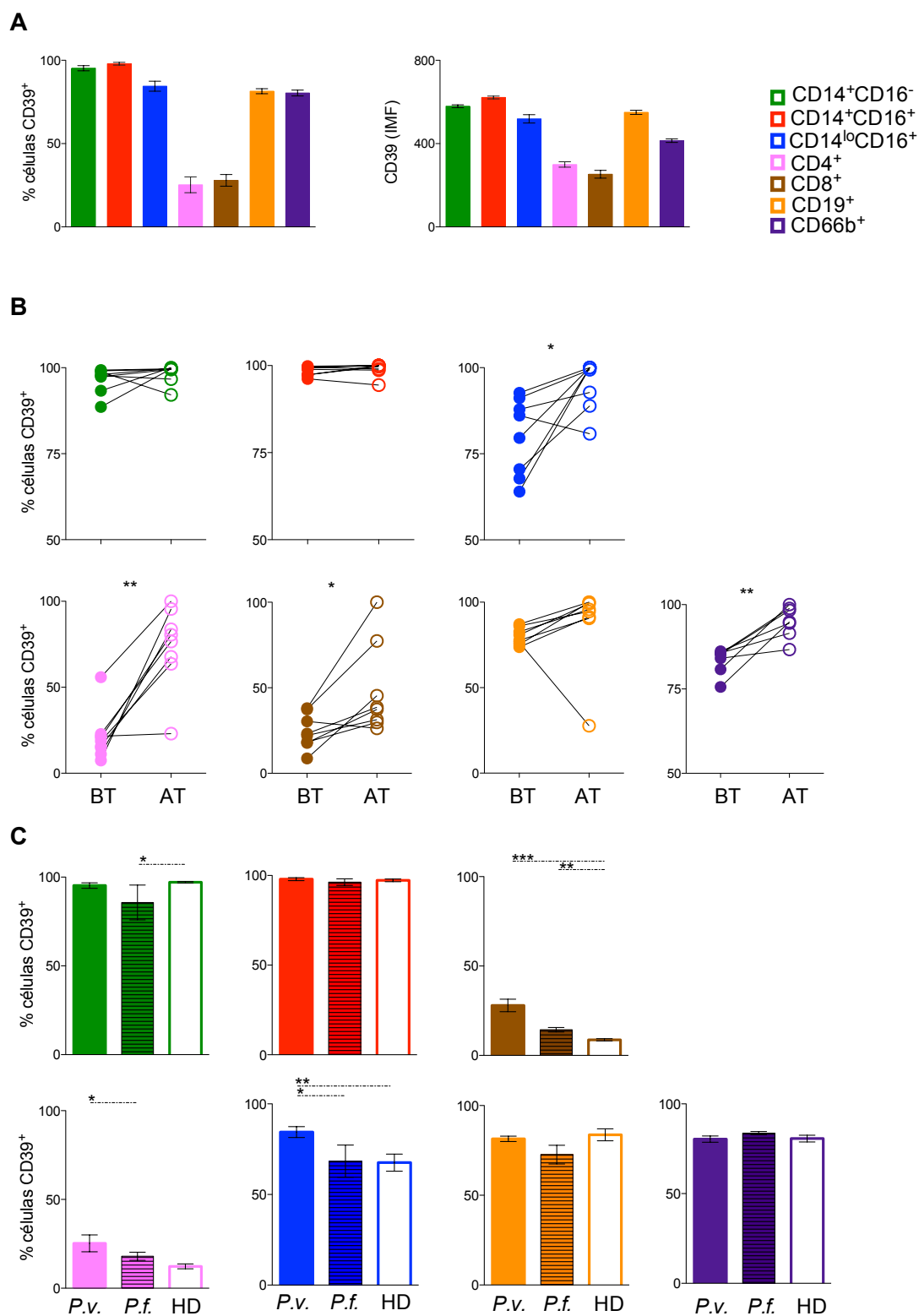
**Figura 21. Adenosina no plasma está aumentada em pacientes infectados pelo *P. vivax* após o tratamento.** (A) Os níveis de adenosina foram medidos no plasma de 37 indivíduos durante a fase

aguda da infecção pelo *P. vivax* (*P.v.* BT) e após o tratamento (*P.v.* AT), 11 doadores saudáveis de área endêmica (HD PVH) e 20 doadores saudáveis de um grupo não endêmica (HD BH) e de 8 pacientes com malária *falciparum* antes (*P.f.* BT) e após tratamento (*P.f.* AT) por HPLC. (B) Comparação dos níveis de adenosina entre o mesmo indivíduo durante a fase aguda (painel esquerdo) da malária causada pelo *P. vivax* (*P.v.* BT) e após o tratamento (*P.v.* AT); (painel direito); fase aguda da infecção pelo *P. falciparum* (*P.f.* BT) e após a cura da doença (*P.f.* AT); (painel do meio) Comparação entre doadores saudáveis de área endêmica (HD PVH) e não endêmica (HD BH). \*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

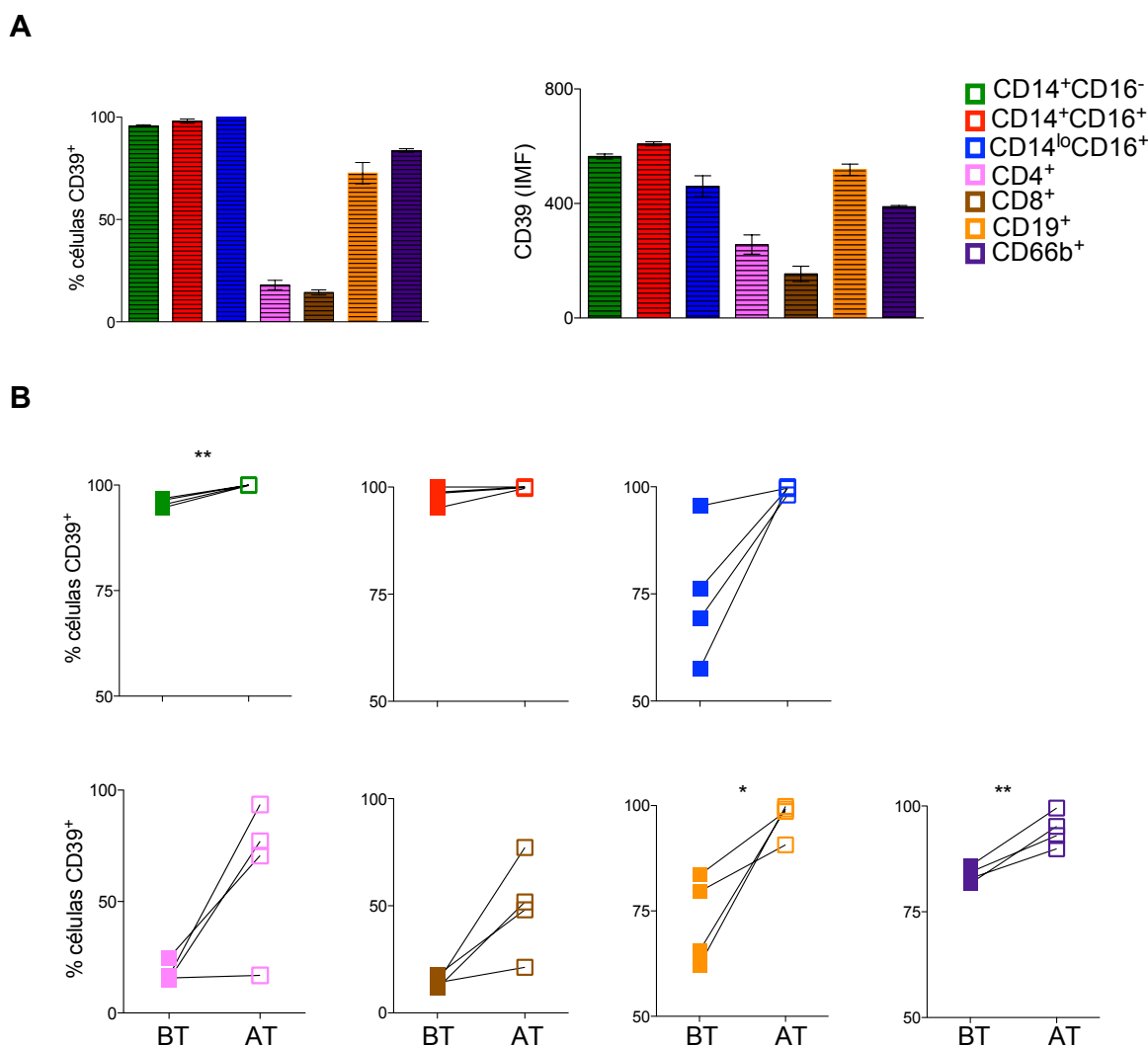
#### **5.14 Leucócitos de pacientes expressam diferentemente a ectonucleotidase CD39 durante a malária causada pelo *P. vivax***

A adenosina é um produto da hidrólise do ATP extracelular. As ectonucleotidasas CD39 e CD73 são as enzimas responsáveis por essas reações. O primeiro passo envolve a hidrólise de ATP em ADP ou AMP por CD39. Dado esse papel na geração de adenosina, a expressão *ex vivo* de CD39 foi avaliada em leucócitos circulantes de pacientes com malária aguda causada pelo *P. vivax* por meio da citometria de fluxo.

Foi demonstrado que CD39 é mais expressa nas subpopulações de monócitos, principalmente os clássicos e inflamatórios. Seguido das células B e neutrófilos, e por último nas células T, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (**Figura 22A**). Resultados semelhantes foram observados para a malária *falciparum* (**Figura 23A**). Monócitos patrulhadores, linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e neutrófilos apresentaram um aumento nos níveis de CD39 após o tratamento da doença. Por sua vez, monócitos clássicos e inflamatórios não alteraram a expressão de CD39, permanecendo com quase 100% das células expressando a enzima (**Figura 22B**). Em contraste, na infecção pelo *P. falciparum* foi encontrado um aumento da expressão de CD39 nos monócitos clássicos, células B e neutrófilos (**Figura 23B**). Quando comparamos a malária causada pelo *P. vivax* com a ocasionada pelo *P. falciparum*, observamos a mesma expressão de CD39 em todos os leucócitos analisados, exceto em monócitos patrulhadores, que apresentaram níveis mais altos nos pacientes infectados por *P. vivax* (**Figura 22C**).



**Figura 22. Expressão ex vivo de CD39 em leucócitos circulantes de pacientes infectados pelo *P. vivax*.** (A) A expressão da ectonucleotidase CD39 foi medida em leucócitos circulantes de 13 pacientes infectados pelo *P. vivax* usando citometria de fluxo. Os monócitos clássicos estão representados em verde, os inflamatórios em vermelho, os patrulhadores em azul, as células T CD4<sup>+</sup> em rosa, as T CD8<sup>+</sup> em marrom, as células B em laranja e os neutrófilos em roxo. (B) Comparação na expressão de CD39 entre leucócitos de pacientes na fase aguda da malária causada pelo *P. vivax* (BT) e o mesmo indivíduo após o tratamento (AT). (C) Os níveis de CD39 foram comparados entre pacientes infectados pelo *P. vivax* (*P.v.*) e pelo *P. falciparum* (*P.f.* n=4) e doadores saudáveis (HD n=9). \* p<0,05 \*\* p<0,01 \*\*\* p<0,001.



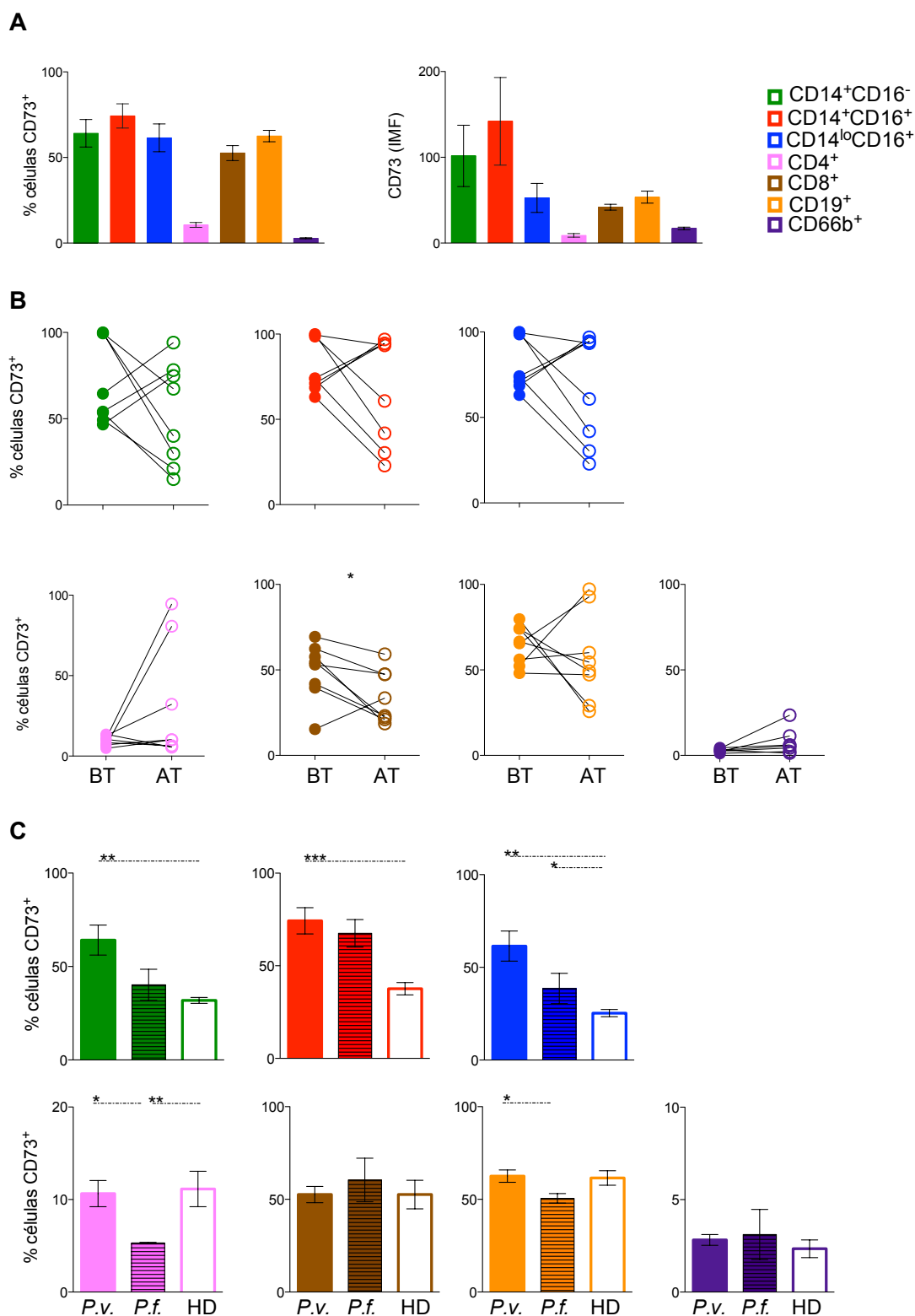
**Figura 23. Expressão *ex vivo* de CD39 em leucócitos circulantes de pacientes infectados pelo *P. falciparum*.** (A) A expressão da ectonucleotidase CD39 foi medida em leucócitos circulantes de 4 pacientes infectados pelo *P. falciparum* usando citometria de fluxo. Os monócitos clássicos foram representados em verde, os inflamatórios em vermelho, os patrulhadores em azul, as células T CD4<sup>+</sup> em rosa, as células T CD8<sup>+</sup> em marrom, as células B em laranja e os neutrófilos em roxo. (B) Comparação na expressão de CD39 entre leucócitos de pacientes na fase aguda da malária *falciparum* (BT) e o mesmo indivíduo após o tratamento (AT). \*  $p \leq 0,05$  \*\*  $p \leq 0,01$  \*\*\*  $p \leq 0,001$

### 5.15 Leucócitos de pacientes possuem distinto padrão de expressão da ectonucleotidase CD73 durante a malária causada pelo *P. vivax*

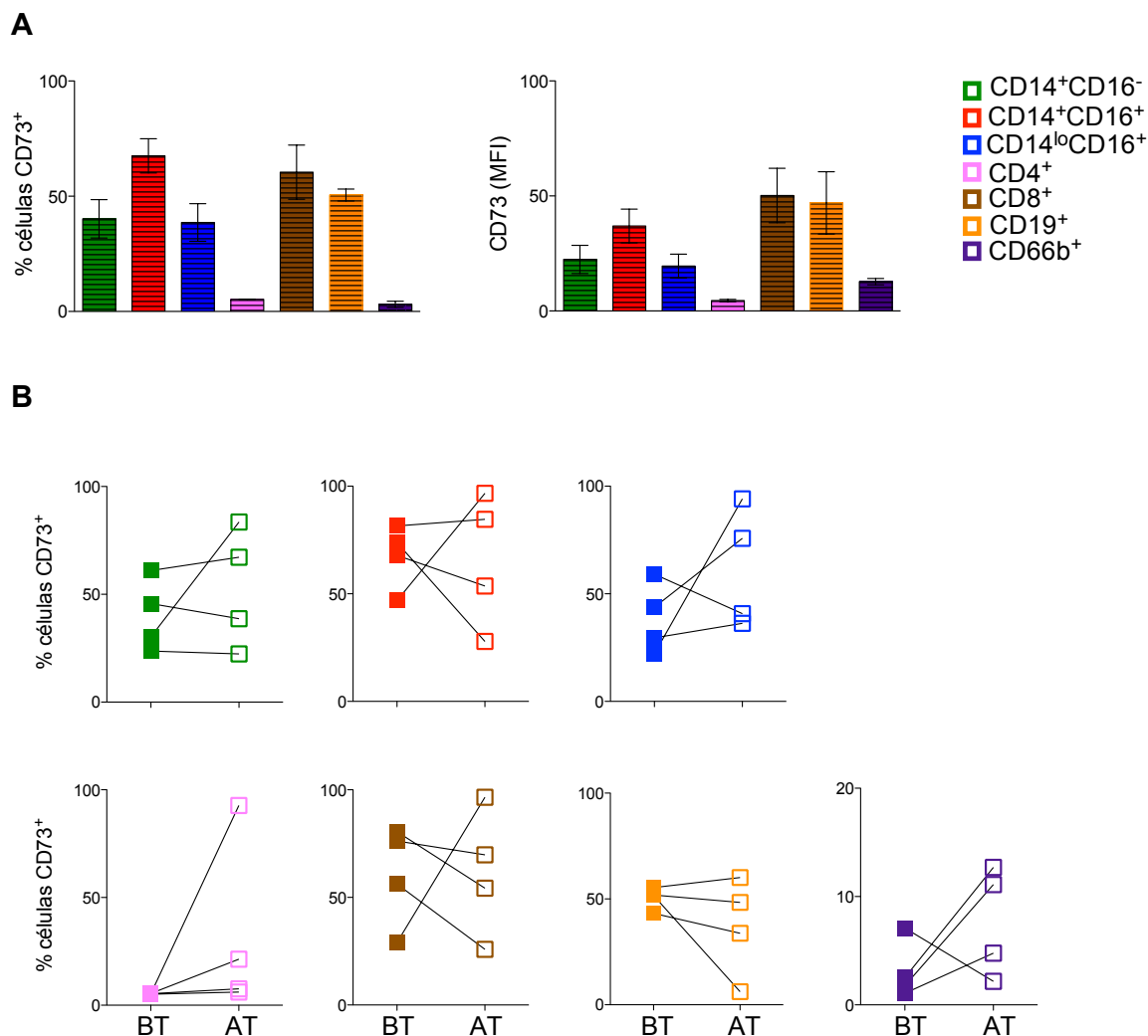
A última etapa da reação para a produção de adenosina consiste na conversão de AMP em adenosina por CD73. Considerando essa participação essencial na geração de adenosina, a expressão *ex vivo* de CD73 foi mensurada em leucócitos circulantes de pacientes com malária aguda causada pelo *P. vivax* por meio da citometria de fluxo.



Assim como para CD39, o CD73 também foi mais expresso nas subpopulações de monócitos, seguido pelas células B e T CD8<sup>+</sup>. Os níveis de CD73 em células T CD4<sup>+</sup> e neutrófilos foram consideravelmente mais baixos (**Figura 24A**). O mesmo perfil foi observado para os pacientes com malária *falciparum* (**Figura 25A**). Todos os leucócitos analisados expressaram os mesmos níveis de CD73 antes e após o tratamento, tanto na malária causada pelo *P. vivax* (**Figura 24B**) quanto pelo *P. falciparum* (**Figura 25B**), exceto as células T CD8<sup>+</sup> na infecção pelo *P. vivax*. Quando comparamos as infecções pelos diferentes plasmódios, foi observado que a expressão de CD73 foi semelhante em ambos, exceto para as células B que apresentaram maiores níveis desta ectonucleotidase nos pacientes infectados pelo *P. vivax* (**Figura 24C**).

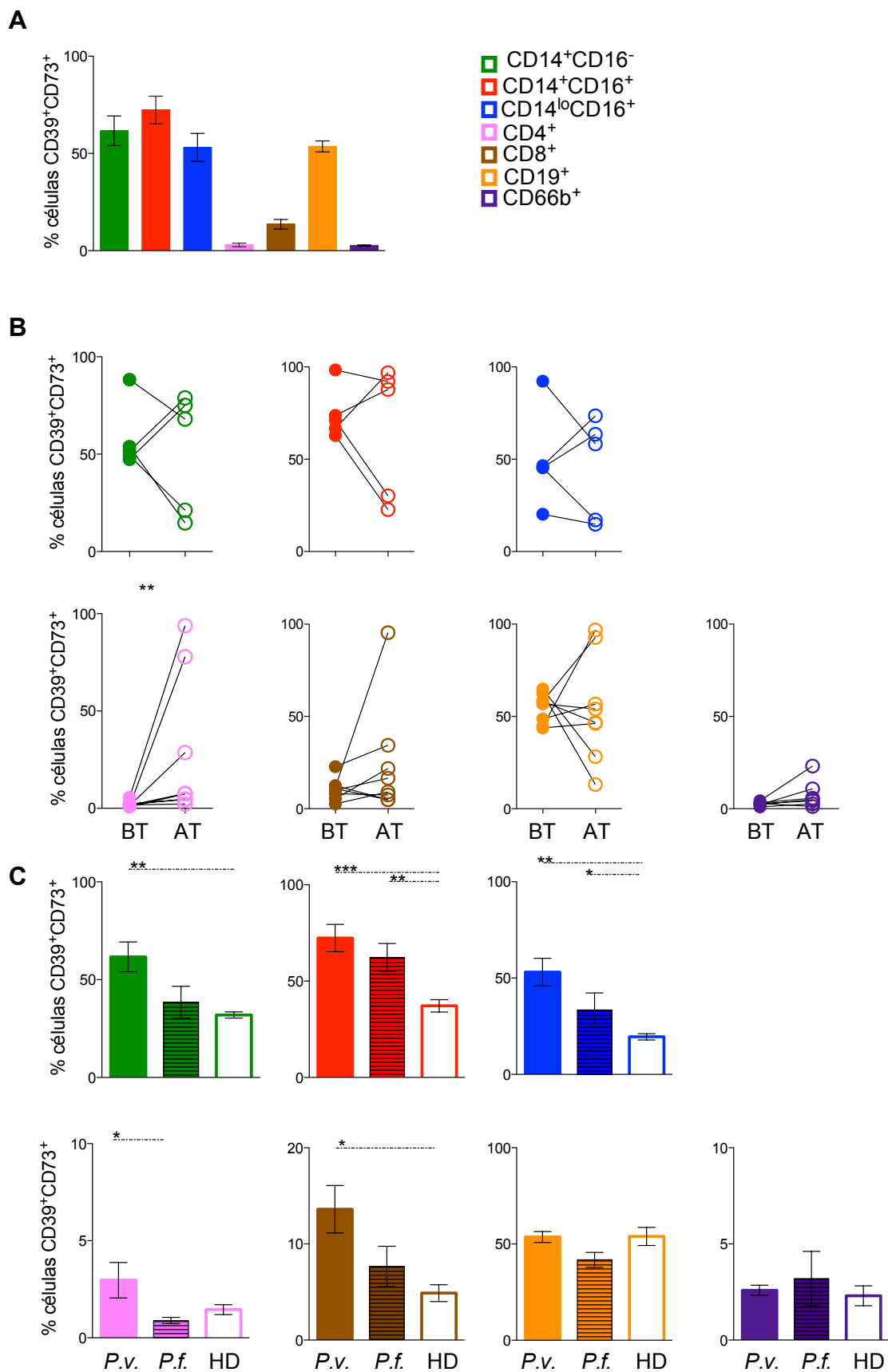


**Figura 24. Expressão ex vivo de CD73 em leucócitos circulantes de pacientes infectados pelo *P. vivax*.** (A) A expressão da ectonucleotidase CD73 foi medida em leucócitos circulantes de 13 pacientes infectados pelo *P. vivax* usando citometria de fluxo. Os monócitos clássicos estão representados em verde, os inflamatórios em vermelho, os patrulhadores em azul, as células T CD4<sup>+</sup> em rosa, as células T CD8<sup>+</sup> em marrom, as células B em laranja e os neutrófilos em roxo. (B) Comparação na expressão de CD73 entre leucócitos de pacientes na fase aguda da malária causada pelo *P. vivax* (BT) e o mesmo indivíduo após o tratamento (AT). (C) Os níveis de CD73 foram comparados entre pacientes infectados pelo *P. vivax* (*P.v.*) e pacientes infectados pelo *P. falciparum* (*P.f.* n=4) e doadores saudáveis (HD n=9). \* p<0,05 \*\* p<0,01 \*\*\* p<0,001.



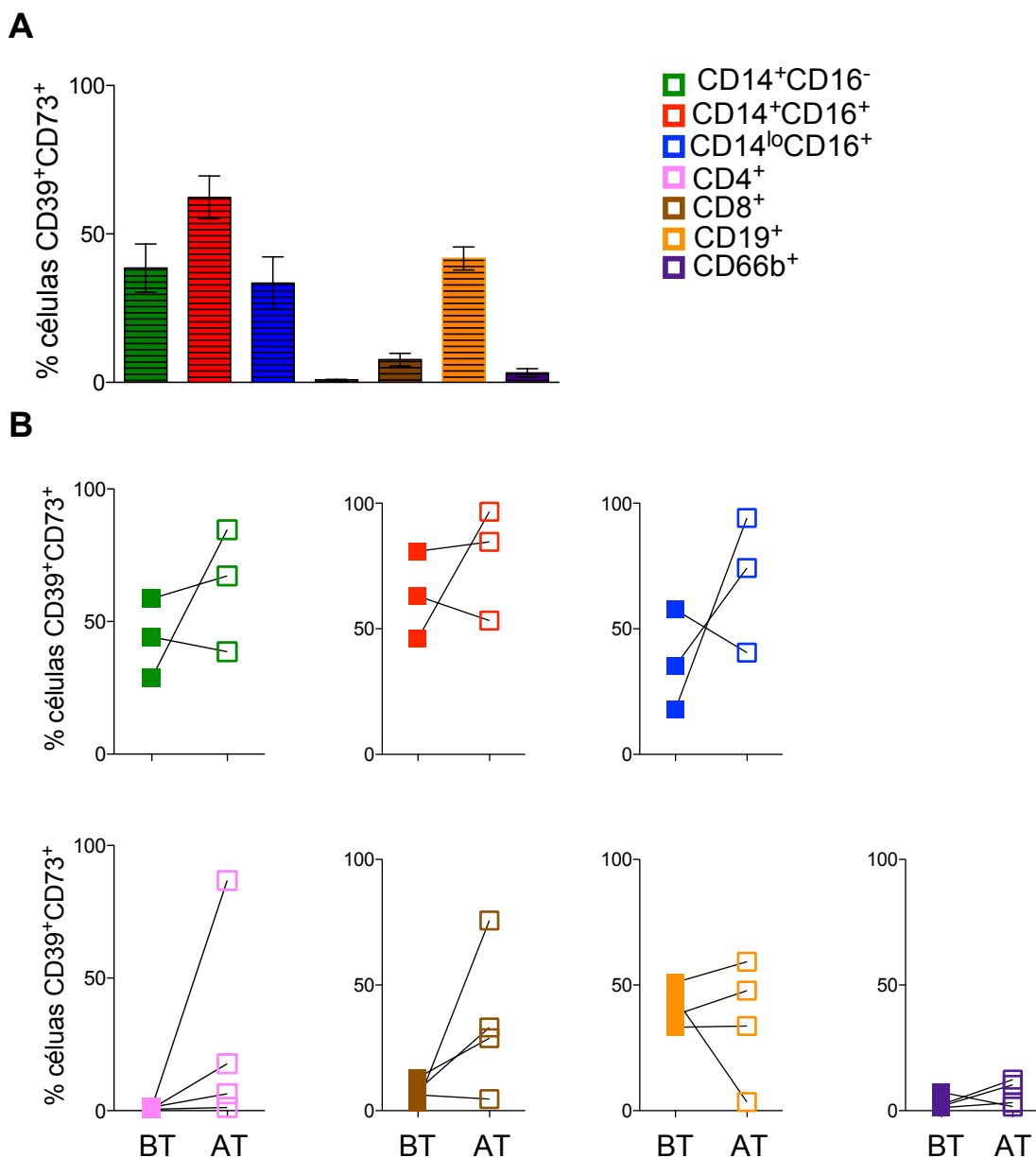
**Figura 25. Expressão *ex vivo* de CD73 em leucócitos circulantes de pacientes infectados pelo *P. falciparum*.** (A) A expressão da ectonucleotidase CD73 foi medida em leucócitos circulantes de 4 pacientes infectados pelo *P. falciparum* usando citometria de fluxo. Os monócitos clássicos estão representados em verde, os inflamatórios em vermelho, os patrulhadores em azul, as células T CD4<sup>+</sup> em rosa, as células T CD8<sup>+</sup> em marrom, as células B em laranja e os neutrófilos em roxo. (B) Comparação na expressão de CD73 entre leucócitos de pacientes na fase aguda da malária *falciparum* (BT) e o mesmo indivíduo após o tratamento (AT). \*  $p \leq 0,05$  \*\*  $p \leq 0,01$  \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Além disso, analisamos a co-expressão das ectonucleotidasas CD39 e CD73, que seguiram os achados de CD73 para infecções pelo *P. vivax* (Figura 26) e *P. falciparum* (Figura 27).



**Figura 26. Co-expressão de CD39 e CD73 em leucócitos circulantes de pacientes infectados pelo *P. vivax*.** (A) A co-expressão das ectonucleotidasas CD39 e CD73 foi medida em leucócitos circulantes de 13 pacientes infectados pelo *P. vivax* usando citometria de fluxo. Os monócitos

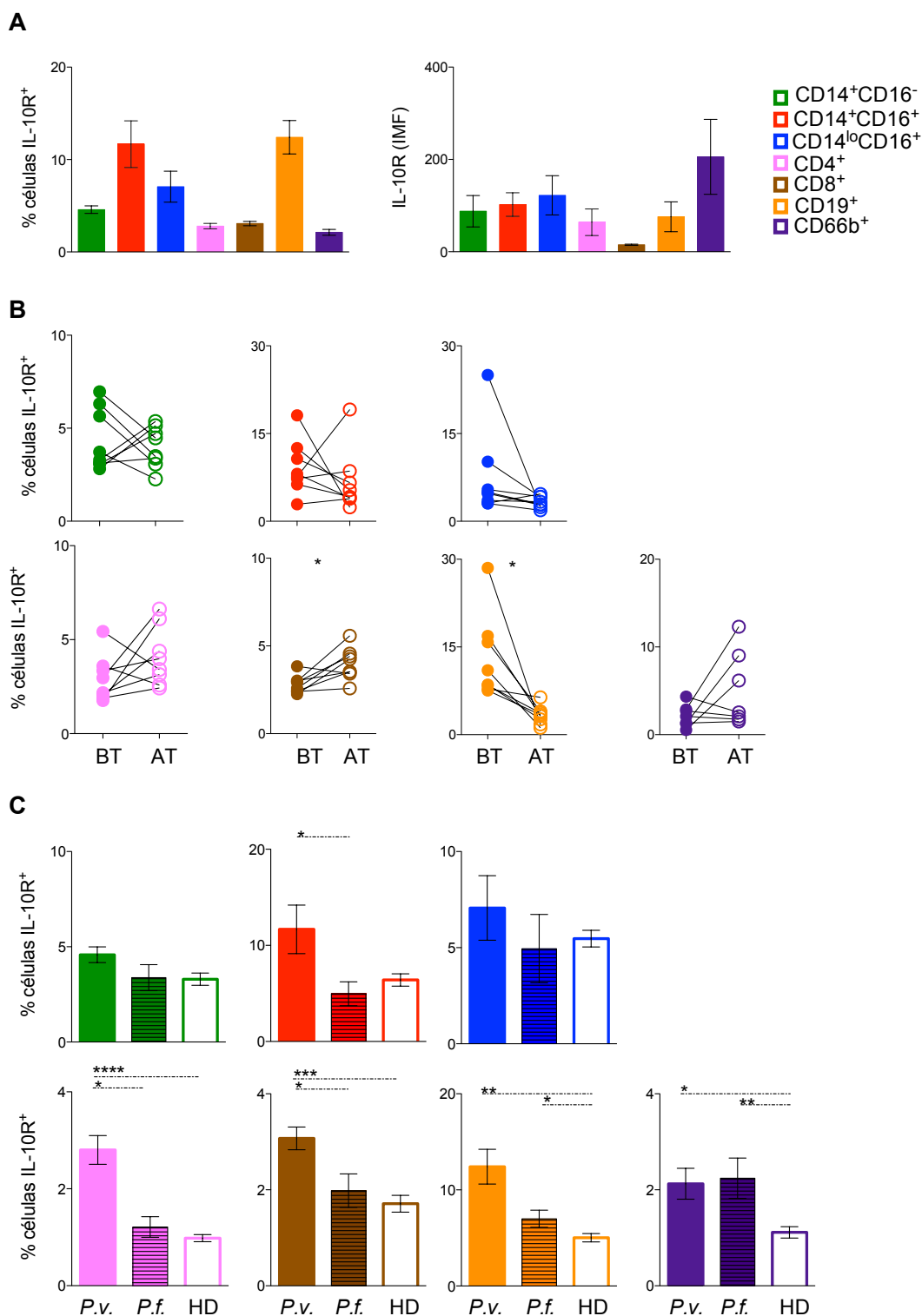
clássicos estão representados em verde, os inflamatórios em vermelho, os patrulhadores em azul, as células T CD4<sup>+</sup> em rosa, as células T CD8<sup>+</sup> em marrom, as células B em laranja e os neutrófilos em roxo. (B) Comparação da co-expressão de CD39 e CD73 entre leucócitos de pacientes na fase aguda da malária causada pelo *P. vivax* (BT) e o mesmo indivíduo após o tratamento (AT). (C) Os níveis de CD39 e CD73 foram comparados entre pacientes infectados pelo *P. vivax* (*P.v.*) e pacientes infectados pelo *P. falciparum* (*P.f.* n=4) e doadores saudáveis (HD n=9). \* p≤0,05 \*\* p≤0,01 \*\*\* p≤0,001 \* p≤0,05 \*\* p≤0,01 \*\*\* p≤0,001.



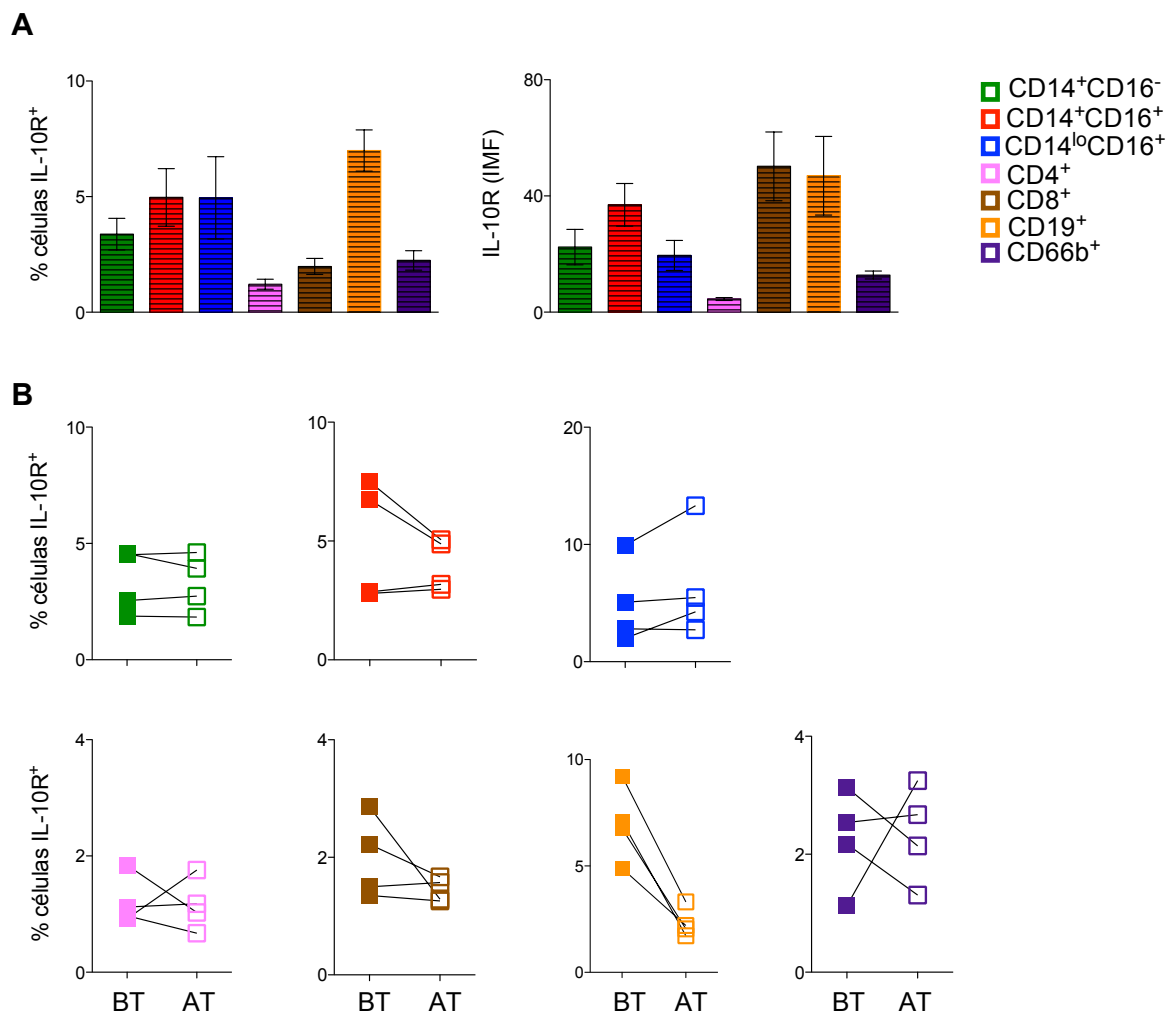
**Figura 27. Co-expressão de CD39 e CD73 em leucócitos circulantes de pacientes infectados pelo *P. falciparum*.** (A) A co-expressão das ectonucleotidases CD39 e CD73 foi medida em leucócitos circulantes de 4 pacientes infectados pelo *P. falciparum* usando citometria de fluxo. Os monócitos clássicos estão representados em verde, os inflamatórios em vermelho, os patrulhadores em azul, as células T CD4<sup>+</sup> em rosa, as células T CD8<sup>+</sup> em marrom, as células B em laranja e os neutrófilos em roxo. (B) Comparação na co-expressão de CD39 e CD73 entre leucócitos de pacientes na fase aguda da malária *falciparum* (BT) e o mesmo indivíduo após o tratamento (AT). \* p≤0,05 \*\* p≤0,01 \*\*\* p≤0,001.

### **5.16 Linfócitos circulantes de pacientes infectados pelo *P. vivax* expressam níveis aumentados do receptor de IL-10 em comparação aos indivíduos infectados pelo *P. falciparum***

Muitos estudos têm demonstrado o papel da adenosina na produção de IL-10, e de maneira interessante foi demonstrado que pacientes durante a fase aguda da malária ocasionada pelo *P. vivax* exibiram níveis aumentados de IL-10. Com base nesses achados, a expressão do receptor de IL-10, também conhecido como CD210, foi avaliada em leucócitos de pacientes com malária. Foi demonstrado que as células B, monócitos inflamatórios e patrulhadores exibem níveis mais altos de CD210 do que os outros leucócitos (**Figura 28A**). O mesmo foi observado na malária *falciparum* (**Figura 29A**). Após o tratamento, a expressão de CD210 diminuiu nas células B e aumentou nas células T CD8<sup>+</sup> (**Figura 28B**). Não houve diferenças para a infecção por *P. falciparum* (**Figura 29B**). Curiosamente, monócitos inflamatórios e células T de pacientes infectados com o *P. vivax* apresentaram maiores níveis do receptor de IL-10 em comparação a mesma população celular em indivíduos com malária *falciparum* (**Figura 28C**).



**Figura 28. A expressão de CD210 em leucócitos circulantes de pacientes infectados pelo *P. vivax*.** (A) A expressão do receptor de IL-10 (CD210) foi medida em leucócitos circulantes de 13 pacientes infectados pelo *P. vivax* usando citometria de fluxo. Os monócitos clássicos estão representados em verde, os inflamatórios em vermelho, os patrulhadores em azul, as células T CD4<sup>+</sup> em rosa, as células T CD8<sup>+</sup> em marrom, as células B em laranja e os neutrófilos em roxo. (B) Comparação da expressão de CD210 entre leucócitos de pacientes na fase aguda da malária ocasionada pelo *P. vivax* (BT) e o mesmo indivíduo após o tratamento (AT). (C) Os níveis de CD210 foram comparados entre pacientes infectados pelo *P. vivax* (*P.v.*) e pacientes infectados pelo *P. falciparum* (*P.f.* n=4) e doadores saudáveis (HD n=9). \* p≤0,05 \*\* p≤0,01 \*\*\* p≤0,001 \* p≤0,05 \*\* p≤0,01 \*\*\* p≤0,001.



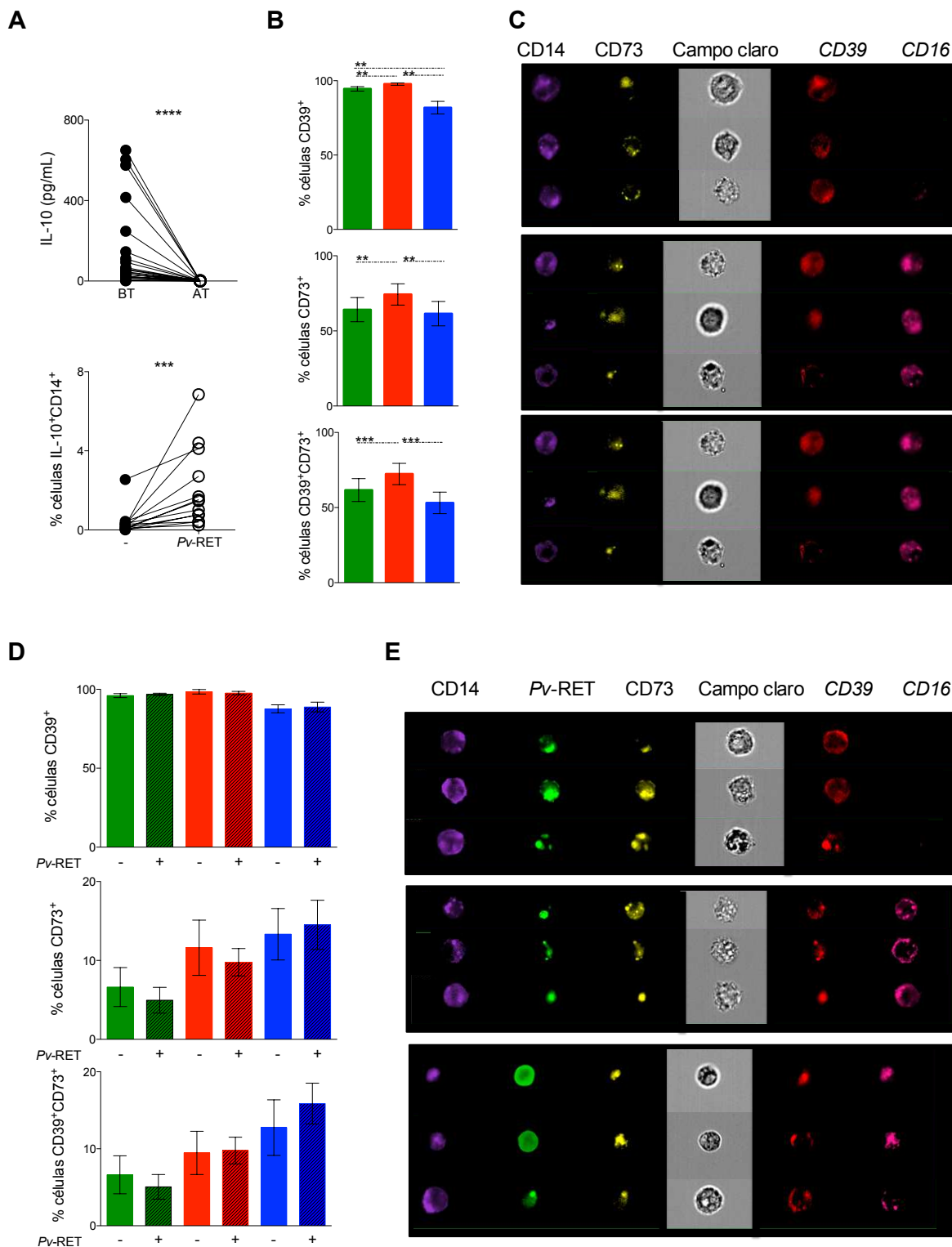
**Figura 29. A expressão de CD210 em leucócitos circulantes de pacientes infectados pelo *P. falciparum*.** (A) A expressão do receptor de IL-10 (CD210) foi medida em leucócitos circulantes de 4 pacientes infectados pelo *P. falciparum* usando citometria de fluxo. Os monócitos clássicos estão representados em verde, os inflamatórios em vermelho, os patrulhadores em azul, as células T CD4<sup>+</sup> em rosa, as células T CD8<sup>+</sup> em marrom, as células B em laranja e os neutrófilos em roxo. (B) Comparação da expressão de CD210 entre leucócitos de pacientes na fase aguda da malária *falciparum* (BT) e o mesmo indivíduo após o tratamento (AT). \*  $p \leq 0,05$  \*\*  $p \leq 0,01$  \*\*\*  $p \leq 0,001$  \*  $p \leq 0,05$  \*\*  $p \leq 0,01$  \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

### 5.17 Monócitos são importantes fontes de IL-10 durante a malária causada pelo *P. vivax*

Em conjunto, os resultados relatados no presente estudo sugerem o papel das subpopulações de monócitos na produção de adenosina, uma vez que expressaram altos níveis de ambas ectonucleotidases, além de apresentarem níveis aumentados do receptor de IL-10. Demonstramos também que os pacientes na fase aguda da infecção pelo *P. vivax* exibiram níveis plasmáticos altos de IL-10, que diminuíram significativamente após o tratamento da doença (**Figura 30A, painel superior**). Importante destacar que também foi demonstrado que o *Pv*-RET desencadeia a



produção de IL-10 por monócitos (Figura 30A, painel inferior), confirmando que essas células participam da produção de IL-10 durante a malária causada pelo *P. vivax*.



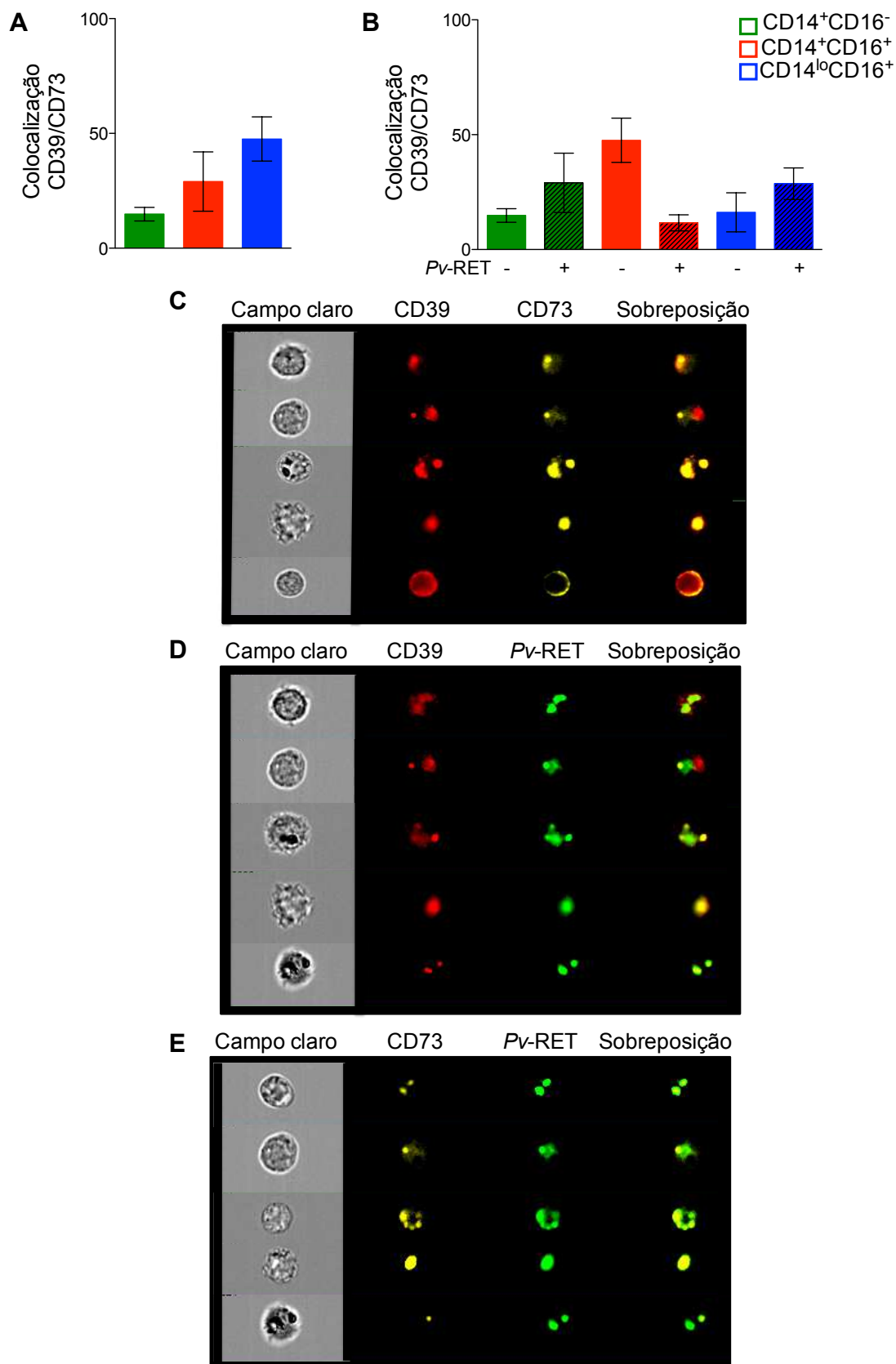
**Figura 30. Pv-Ret induz a produção de IL-10 por monócitos que expressam altos níveis das ectonucleotidases CD39 e CD73.** (A) O nível plasmático de IL-10 foi medido em pacientes infectados pelo *P. vivax* durante a fase aguda da doença (BT) e após o tratamento (AT) (painel

superior) (n=23) usando o kit CBA Th1/Th2/Th17. A produção intracelular de IL-10 por monócitos cultivados com *Pv*-RET e sem estímulo foi avaliada por citometria de fluxo (painel inferior) (n=14). (B e C) As expressões de CD39 e CD73 em monócitos clássico (verde - painel superior), inflamatórios (painel vermelho - meio) e patrulhadores (azul - painel inferior) (n=5) foram determinadas utilizando citometria de fluxo de imagem. (D e E) As expressões de ectonucleotidases foram avaliadas antes (-) e após (+) cultura das subpopulações de monócitos com reticulócitos infectados pelo *P. vivax* (n=5). \*  $p \leq 0,05$  \*\*  $p \leq 0,01$  \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

### **5.18 Monócitos inflamatórios expressam níveis aumentados de ectonucleotidases que não são alterados pela infecção pelo *P. vivax***

Considerando o papel dos monócitos na produção de adenosina e IL-10, utilizamos a citometria de fluxo de imagem, uma abordagem mais sensível, a fim de definir a expressão e localização *ex vivo* das ectonucleotidases nos subtipos de monócitos. Foi demonstrado que todos os subtipos expressaram altos níveis de ambas ectonucleotidases (**Figura 30 B e C**), como mostrado anteriormente por meio da citometria de fluxo convencional. Os monócitos inflamatórios exibiram níveis mais altos de CD39 e CD73 do que as outras subpopulações (**Figura 30B**). Com o objetivo de definir se a infecção pelo *P. vivax* altera a expressão de ectonucleotidases nas subpopulações de monócitos, sua expressão foi mensurada antes e depois da cultura com *Pv*-RET. Foi observado que todos os subtipos foram capazes de fagocitar os reticulócitos infectados pelo *P. vivax* (**Figura 30E**), no entanto, esse fenômeno não alterou a expressão de CD39 e CD73 nos mesmos (**Figura 30D**).

Sabendo que CD39 e CD73 correspondem a etapas seqüenciais de hidrólise de ATP à adenosina, acredita-se que sua colocalização aumenta sua eficiência. Portanto, foi avaliada a colocalização entre as ectonucleotidases em subtipos de monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax* utilizando citometria de fluxo de imagem. Todas as subpopulações de monócitos exibiram colocalização entre as ectonucleotidases (**Figura 31C**), não sendo observadas diferenças entre as mesmas (**Figura 31A**). Apesar de CD39 (**Figura 31D**) e CD73 (**Figura 31E**) colocalizarem com *Pv*-RET, a fagocitose do último não alterou os níveis de colocalização entre as ectonucleotidases nos subtipos de monócitos (**Figura 31B**).



**Figura 31. As ectonucleotidasas CD39 e CD73 exibem colocalização nos subtipos de monócitos.** (A e C) A localização de CD39 e CD73 em subtipos de monócitos de pacientes com malária causada pelo *P. vivax* foi avaliada por citometria de fluxo de imagem. (B) Níveis de localização de CD39 e CD73 antes (-) e após (+) cultura com *Pv*-RET. Imagens representativas mostrando a colocalização entre reticulócitos infectados pelo *P. vivax* e CD39 (D) ou CD73 (E) (n=5).

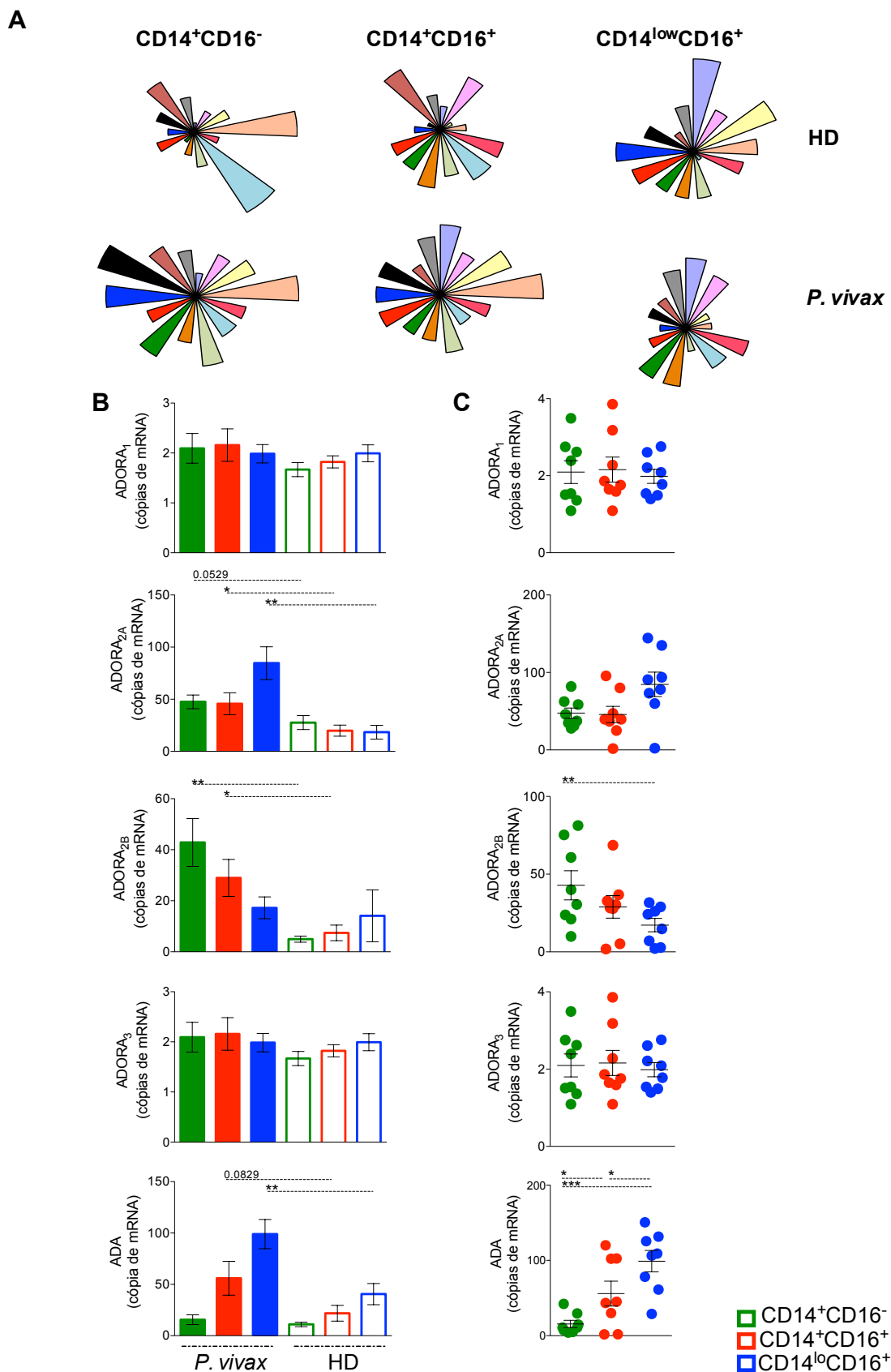
### **5.19 Plasmodium vivax altera a transcrição de genes de receptores purinérgicos P1 nas subpopulações de monócitos**

O ATP extracelular e a adenosina atuam principalmente através dos receptores purinérgicos P2 e P1, respectivamente. Para determinar se a infecção pelo *P. vivax* altera a expressão de receptores purinérgicos nas subpopulações de monócitos, foi analisado o número de cópias de mRNA de genes selecionados nos subtipos de monócitos de oito pacientes infectados pelo *P. vivax* (*P.v.*) e oito doadores saudáveis (HD) usando nCounter Nanostring. Foram avaliados 14 genes: adenosina desaminase (ADA) (roxo), ADORA<sub>1</sub> (rosa), ADORA<sub>2A</sub> (amarelo), ADORA<sub>2B</sub> (laranja), ADORA<sub>3</sub> (rosa escuro), receptor de IL-10 (CD210) (azul), P2X<sub>1</sub> (verde) , P2X<sub>3</sub> (laranja escuro), P2X<sub>4</sub> (verde escuro), P2X<sub>7</sub> (vermelho), P2Y<sub>1</sub> (azul escuro), P2Y<sub>11</sub> (preto), P2Y<sub>2</sub> (marrom) e P<sub>2</sub>Y<sub>4</sub> (cinza) (**Tabela 8**).

Gráficos de radar foram construídos com os dados obtidos e indicaram que a malária ocasionada pelo *P. vivax* altera a expressão de receptores purinérgicos nas subpopulações de monócitos (**Figura 32A**). Análises mais detalhadas demonstraram que a expressão de ADORA<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> é maior nos subtipos de monócitos dos pacientes em comparação com os doadores saudáveis (**Figura 32B**). Não foram observadas diferenças quando comparamos as subpopulações de pacientes entre si, exceto para ADA que está aumentada em monócitos patrulhadores, e o ADORA<sub>2B</sub>, que é mais expresso em monócitos clássicos (**Figura 32C**). Em conjunto, esses resultados demonstram que apesar da infecção pelo *P. vivax* não alterar a expressão das ectonucleotidases nas subpopulações de monócitos, ela aumentou a expressão dos receptores de adenosina A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub>, sugerindo que a adenosina desempenha um papel durante a malária. Não foram encontradas diferenças significativas em relação a expressão de receptores purinérgicos P2 (**Figura 33**).

**Tabela 8.** Diferenças estatísticas entre a contagem do número de cópias de mRNA nas subpopulações de monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax* e indivíduos saudáveis

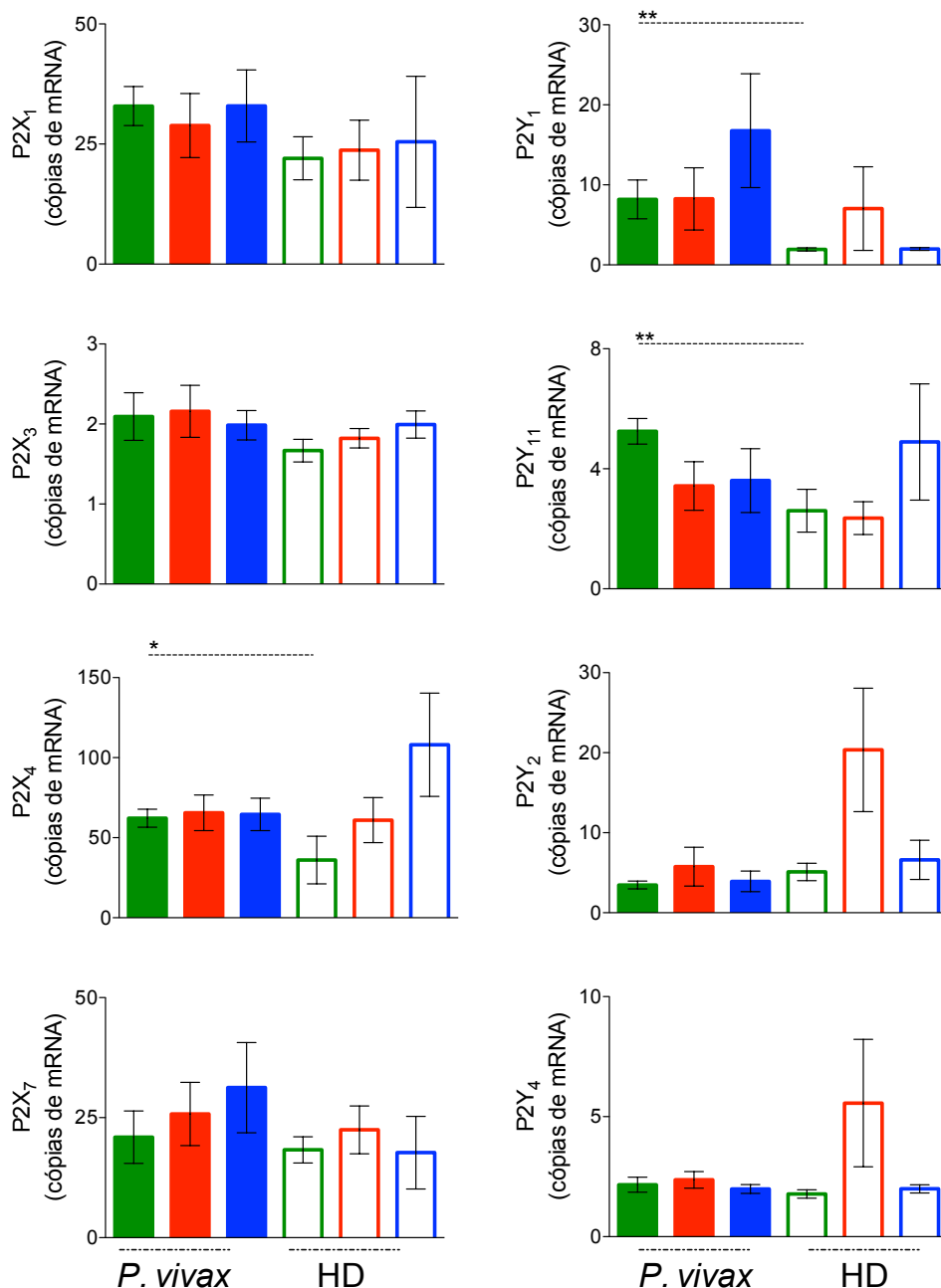
Nome Oficial Completo	Gene ID	valor de p		
		CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup>	CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	CD14 <sup>low</sup> CD16 <sup>+</sup>
Adenosine deaminase	ADA	0.396	0.082	0,005
Adenosine A1 receptor	ADORA1	0.215	0.349	0.972
Adenosine A2a receptor	ADORA2A	0.052	0.044	0.001
Adenosine A2b receptor	ADORA2B	0.003	0.016	0,78
Adenosine A3 receptor	ADORA3	0.215	0.349	0.972
Interleukin 10 receptor subunit alpha	CD210	0.003	0.062	0.393
Purinergic receptor P2X1	P2X1	0.093	0.584	0.639
Purinergic receptor P2X3	P2X3	0.215	0.349	0.972
Purinergic receptor P2X4	P2X4	0.123	0.802	0.220
Purinergic receptor P2X7	P2X7	0.670	0.694	0.280
Purinergic receptor P2Y1	P2Y1	0.022	0.854	0.056
Purinergic receptor P2Y11	P2Y11	0.006	0,291	0,569
Purinergic receptor P2Y2	P2Y2	0.194	0,092	0,347
Purinergic receptor P2Y4	P2Y4	0.300	0.252	0.972



**Figura 32. A infecção pelo *P. vivax* altera a expressão dos receptores de adenosina nos subtipos de monócitos.** Análise de nanostring dos subtipos de monócitos de 8 doadores saudáveis e 8 pacientes infectados pelo *P. vivax*. (A) A proporção de indivíduos que exibem cada parâmetro foi avaliada utilizando a mediana global e os gráficos de radar foram construídos. Os genes avaliados

foram: ADA (roxo); (rosa) ADORA<sub>1</sub>; (amarelo) ADORA<sub>2A</sub>; (laranja) ADORA<sub>2B</sub>; (rosa escuro) ADORA<sub>3</sub>; CD210 (azul); (verde) P2X<sub>1</sub>; (laranja escuro) P2X<sub>3</sub>; (verde escuro) P2X<sub>4</sub>; (vermelho) P2X<sub>7</sub>; (azul escuro) P2Y<sub>1</sub>; (preto) P2Y<sub>11</sub>; (marrom) P2Y<sub>2</sub>; e P2Y<sub>4</sub> (cinza). (B) Comparação entre o número de cópias de mRNA dos receptores de adenosina entre os subtipos de monócitos de pacientes (*P. vivax*) e de doadores saudáveis (HD) e (C) entre subpopulações de monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax*. \* p≤0,05 \*\* p≤0,01 \*\*\* p≤0,001.

**A**



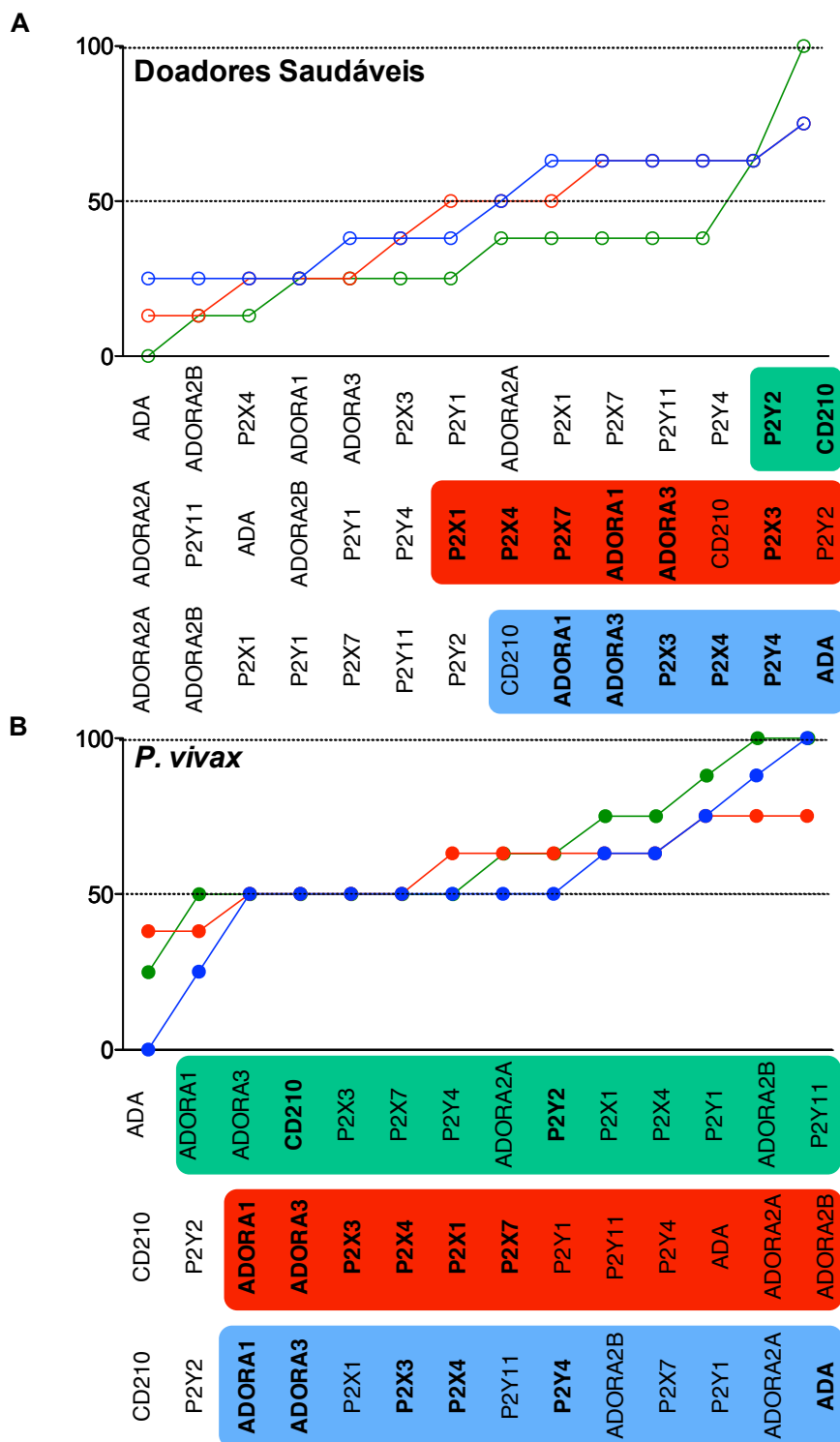
**Figura 33. A infecção pelo *P. vivax* não altera a expressão de receptores purinérgicos P2 nas subpopulações de monócitos.** Análise do nanostring de subpopulações de monócitos de 8 doadores saudáveis e 8 pacientes infectados pelo *P. vivax*. (A) Comparação do número de cópias de mRNA dos receptores purinérgicos P2 dos subtipos de monócitos de pacientes (*P. vivax*) e doadores saudáveis (HD). \* p≤0,05 \*\* p≤0,01 \*\*\* p≤0,001

## **5.20 Subpopulações de monócitos apresentam expressão gênica de receptores purinérgicos distinta que é intensificada durante a malária causada pelo *P. vivax***

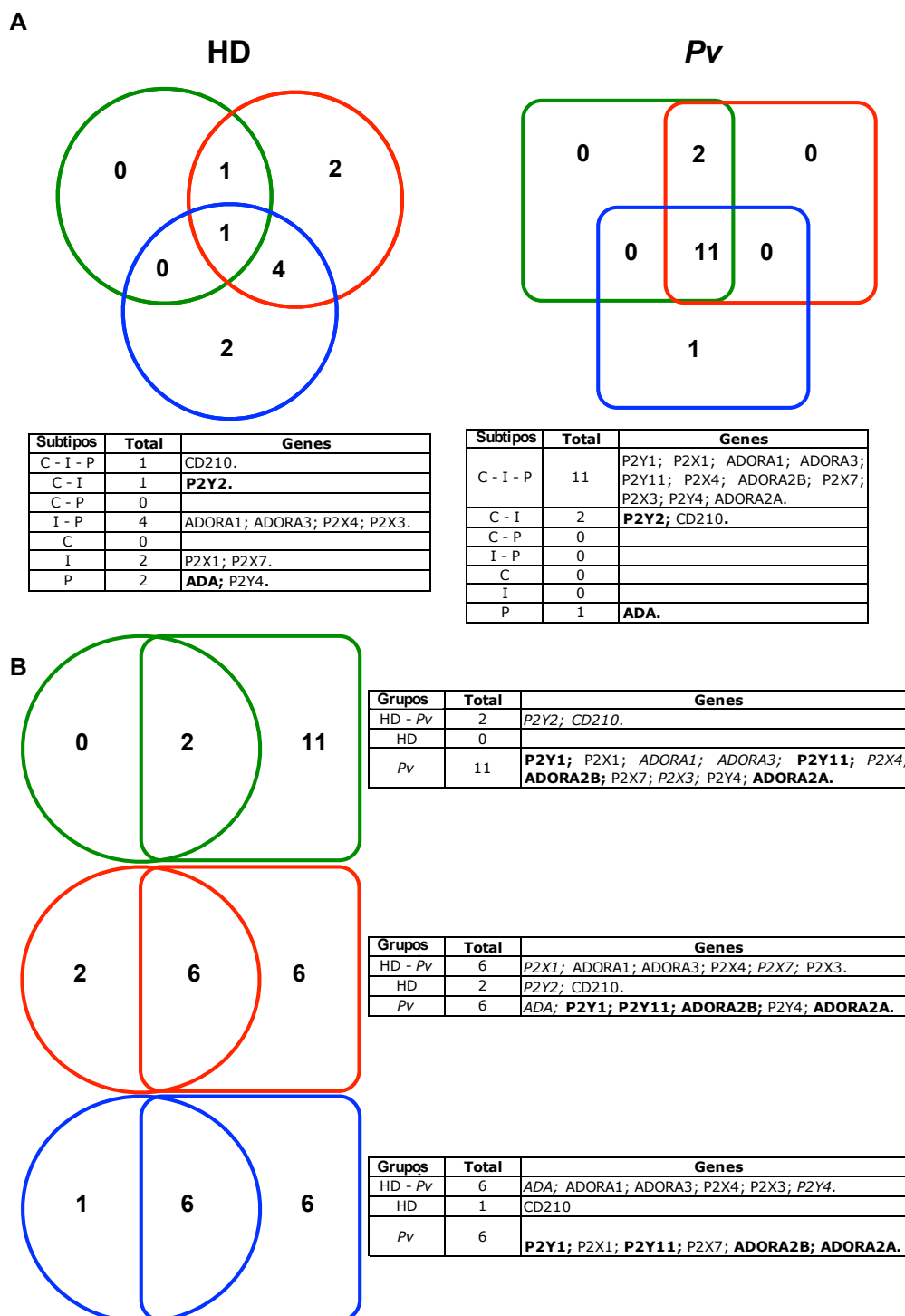
Com o intuito de melhor identificar diferenças na expressão dos receptores purinérgicos, comparamos a mesma subpopulação de monócitos de pacientes com a de doadores saudáveis construindo a assinatura ascendente dos mesmos. A proporção de indivíduos que exibem cada parâmetro foi avaliada utilizando a mediana global. Os parâmetros observados em 50% ou mais dos indivíduos expressando um determinado gene acima da mediana global foram destacados para cada subpopulação. Foi demonstrado que os três subtipos de monócitos analisados têm a expressão da maioria dos genes analisados aumentada em pacientes infectados (*P. vivax*) (**Figura 34B**) em relação a doadores saudáveis (HD) (**Figura 34A**). Curiosamente, quase todos os genes analisados foram expressos nas subpopulações de monócitos de pacientes, exceto ADA em monócitos clássicos; e CD210 e P2Y<sub>2</sub> em monócitos inflamatórios e patrulhadores.

Os diagramas de Venn foram construídos com o intuito de investigar as semelhanças e diferenças entre subpopulações de monócitos em um mesmo contexto. Foi observado que em indivíduos saudáveis (HD), as subpopulações de monócitos expressavam apenas 10 genes em 50% ou mais dos indivíduos, e apenas CD210 foi expresso em todas as subpopulações (**Figura 35A, painel esquerdo**). Vale ressaltar que em pacientes infectados com *P. vivax*, 11 genes foram expressos pelas três subpopulações, indicando que eram mais semelhantes durante a doença (**Figura 35A, painel direito**). Ao comparar as subpopulações de monócitos de pacientes e HD, foi demonstrado que, apesar de possuir um número considerável de genes em comum, a grande maioria dos genes analisados é expressa apenas nos monócitos de pacientes (**Figura 35B**), corroborando com a ideia de que a malária causada pelo *P. vivax*, de fato, causa mudanças substanciais na expressão de receptores purinérgicos pelas subpopulações de monócitos.





**Figura 34.** As subpopulações de monócitos exibem expressão gênica de receptores purinérgicos P1 e P2 distinta que é intensificada durante a malária ocasionada pelo *P. vivax*. A proporção de indivíduos que exibem cada parâmetro foi avaliada usando o valor da mediana global e as assinaturas ascendentes foram construídas. Os parâmetros observados contendo o número de mRNA acima da mediana global em 50% ou mais dos indivíduos foram destacados para cada subpopulação de monócitos de doadores saudáveis (A) e pacientes infectados pelo *P. vivax* (B). Os monócitos clássicos estão representados em verde, inflamatórios ou intermediários em vermelho e os patrulhadores em azul. Os genes destacados em negrito representam os parâmetros observados em 50% ou mais dos indivíduos na mesma subpopulação de monócitos de pacientes e doadores saudáveis.

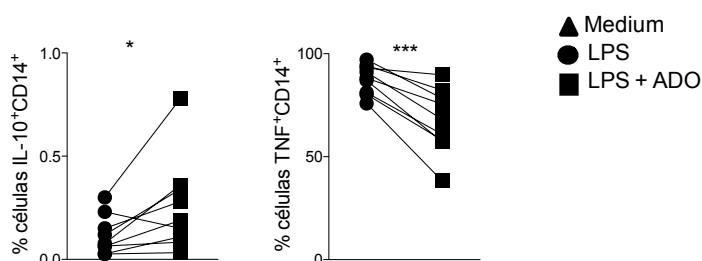


**Figura 35. Padrão da expressão gênica dos receptores adenosina e purinérgicos em subtipos de monócitos de doadores saudáveis e pacientes infectados pelo *P. vivax*.** Os diagramas de Venn foram construídos para identificar a expressão gênica comum entre cada grupo. Somente genes expressos em 50% ou mais dos indivíduos foram incluídos. (A) Comparação da expressão gênica entre subpopulações de monócitos de doadores saudáveis (painel esquerdo) e pacientes infectados pelo *P. vivax* (painel direito). Os genes destacados em negrito foram comumente expressos pelos pacientes e por HD na mesma análise de subconjuntos. (B) Comparação da expressão gênica em cada subpopulação de monócitos entre doadores saudáveis (círculo) e pacientes com malária causada pelo *P. vivax* (quadrado). Os genes destacados em negrito foram comumente expressos pelos pacientes e HD ou grupo de interseção entre as subpopulações de monócitos analisados. Os genes em itálico foram expressos exclusivamente em um subtipo específico de monócitos pelos pacientes e HD ou grupo de interseção.

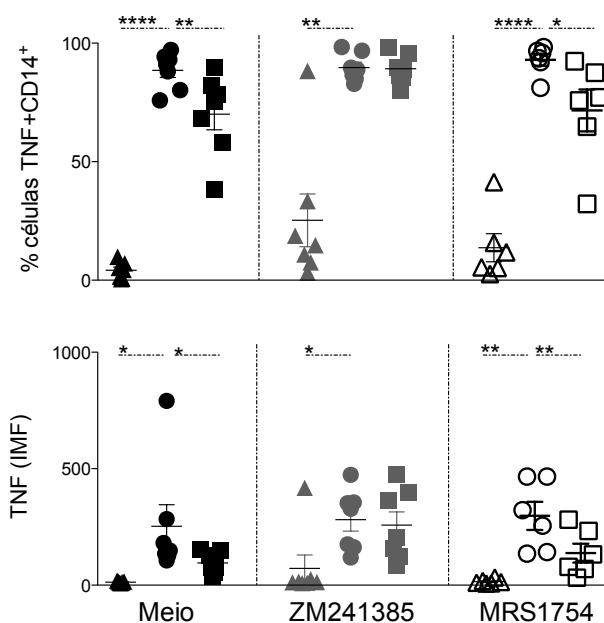
### 5.21 Adenosina aumenta a produção de IL-10 e diminui a de TNF por monócitos de maneira dependente de ADORA<sub>2A</sub>

O papel da adenosina como mediador anti-inflamatório tem sido amplamente demonstrado. A adição de adenosina é capaz de estimular a produção de IL-10 e diminuir os níveis de TNF em monócitos estimulados com LPS (**Figura 36A**). Além disso, também observamos que o efeito nos níveis de TNF foi revertido com o uso do ZM241385, um bloqueador do ADORA<sub>2A</sub>. O mesmo não foi observado com o uso do MRS1754, um antagonista do ADORA<sub>2B</sub> (**Figura 36B**). Estes resultados indicam que a adenosina atua através do ADORA<sub>2A</sub>, diminuindo a produção de TNF pelos monócitos.

**A**



**B**



**Figura 36. A adenosina aumenta a produção de IL-10 e diminui a de TNF pelos monócitos de maneira dependente do receptor da adenosina<sub>2A</sub>.** (A) A expressão intracelular de IL-10 (painel esquerdo) e TNF (painel direito) foi avaliada em monócitos na ausência (círculo) ou presença (quadrado) de adenosina (n=9). (B) A expressão de TNF foi avaliada em monócitos na ausência (círculo) ou presença (quadrado) de adenosina após cultura anterior com bloqueador de receptores ADORA<sub>2A</sub> (ZM241385-cinza) ou bloqueador do receptor de ADORA<sub>2B</sub> (MRS1754) (n=7). \* p<0,05 \*\* p<0,01 \*\*\* p<0,001.

## 6 DISCUSSÃO

Considerando o papel essencial desempenhado pelos monócitos durante a malária causada pelo *P. vivax* [52,60], nós procuramos compreender o papel dessas células tanto no contexto inflamatório, refletido pelo papel do metabolismo no desenvolvimento da resposta imune protetiva, quanto regulador, representado pela produção e ação da adenosina por essas células.

Na década passada, esforços a fim de compreender os princípios que controlam e impulsionam o metabolismo celular foram extensivamente realizados. Dessa maneira, o imunometabolismo tem sido explorado como um novo campo de pesquisa que fornece conhecimento sobre como alterações metabólicas afetam as células do sistema imune [299]. Estudos recentes demonstraram que células imunes com funções diferentes utilizam vias metabólicas distintas com o intuito de equilibrar a produção de energia química com a geração de metabólitos intermediários, essenciais para a ativação, crescimento e proliferação celular [233,234,235,300]. No presente estudo, foi examinada a assinatura de imunometabolismo de subpopulações de monócitos de pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax* e doadores saudáveis. Em resumo, foi demonstrado que a malária causada pelo *P. vivax* diminui a fosforilação oxidativa e conseqüentemente a produção de ATP nessas células, ocasionando um aumento na produção de ROS mitocondrial de maneira dependente do potencial de membrana mitocondrial. Além disso, a produção de mROS parece estar associada ao controle do parasito, destacando o papel do metabolismo no desenvolvimento da imunidade protetora.

A resposta imune inata desempenha um papel central no controle e na patogênese da malária, sendo necessária para desencadear a imunidade adquirida protetora, mas também sendo responsável pelos sintomas observados durante a fase aguda da doença [24,49,50]. Nesse contexto, o papel das subpopulações de monócitos durante a infecção pelo *P. vivax* já foi demonstrado anteriormente [52,60] e levou ao entendimento de que os monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> controlam melhor o parasita e exibem mitocôndrias maiores, além de produzirem mais mROS que os outros subtipos [52]. Historicamente, as mitocôndrias são consideradas as principais responsáveis pela geração de energia metabólica em praticamente todas as células eucarióticas. No entanto, a noção de que as mitocôndrias são apenas “casas de força” das células se mostrou muito restritiva, levando-se em consideração o fato de

que essas organelas são capazes de orquestrar a imunidade, modulando estados metabólicos e fisiológicos em diferentes tipos celulares [234,273,274,275,276].

Considerando o observado nas funções efetoras e no conteúdo mitocondrial das subpopulações de monócitos, foi investigado se essas diferenças ocorriam em função da infecção pelo *P. vivax* ou se eram características intrínsecas das subpopulações de monócitos. Sabendo que a ativação de células imunes geralmente envolve alterações na expressão de vários genes [233], foi analisada a transcrição de genes nucleares envolvidos no metabolismo mitocondrial em subtipos de monócitos de doadores saudáveis e de pacientes com malária ocasionada pelo *P. vivax*. Além das subpopulações de monócitos serem diferenciados pela expressão distinta de marcadores de superfície, muitos estudos demonstraram que eles também possuem um perfil de expressão gênica único [85,301,302]. As descobertas aqui relatadas demonstraram claramente a infecção pelo *P. vivax* induz alterações significativas na expressão gênica dos monócitos. Além disso, observamos que as subpopulações de monócitos exibem expressão gênica mitocondrial distinta mesmo na ausência da infecção; expressão esta ainda maior após a infecção pelo *P. vivax*.

Evidências adquiridas a partir da estimulação *in vitro* de macrófagos com LPS indicam um aumento na glicólise [303,304] e uma diminuição na OXPHOS como característico de células pró-inflamatórias ativadas [250,305]. O presente estudo recapitulou esses achados em subpopulações de monócitos, demonstrando que a malária causada pelo *P. vivax* aumenta a captação de glicose, principalmente pelos monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>. Da mesma forma, foi observado um aumento nos níveis de mRNA da piruvato quinase (PKM) nos subtipos de monócitos durante a infecção pelo *P. vivax*, sugerindo que essas células produzem ATP por glicólise, uma vez que a PKM é responsável pela produção de ATP através da fosforilação a nível de substrato. A análise de fluxo metabólico extracelular confirmou que os monócitos exibem um fenótipo glicolítico na exposição ao *P. vivax*, diferentemente daqueles estimulados com PMA, que apresentam um fenótipo energético.

Pelo menos oito locais na mitocôndria estão relacionados à produção de superóxido em células de mamíferos [306]. O superóxido é produzido quando um único elétron é transferido para o O<sub>2</sub>, à medida que os pares de elétrons fluem pela cadeia transportadora de elétrons [307]. Apesar de todos os sítios de produção de

superóxido apresentarem uma produção significativa [308,309], os complexos I e III da mitocôndria parecem ser as fontes mais importantes desse mediador [310,311,312]. Muitos estudos têm focado no papel do complexo I mitocondrial na produção de superóxido. Por exemplo, foi descrito que uma grande quantidade de NADH é reduzida e leva à alta produção de superóxido pelo complexo I da cadeia transportadora de elétrons (CTE), independente do potencial de membrana mitocondrial [311]. Também foi demonstrado que um alto potencial de membrana mitocondrial causa um transporte reverso de elétrons que produz grandes quantidades de superóxido também pelo complexo I [298]. Durante esses dois modos de operação, a produção de ATP encontra-se diminuída. A fim de produzir ativamente ATP, as mitocôndrias exibem uma taxa de respiração celular relativamente alta em comparação aos modos anteriores e o potencial de membrana mitocondrial encontra-se diminuído, ocasionando a produção de altos níveis de ATP e baixos níveis de ROS mitocondrial pelos complexos I e III [281]. O fato do *Pv*-RET desencadear uma diminuição nos níveis de ATP, quando adicionado às culturas de sangue total, indica que as mitocôndrias não estão produzindo ATP preferencialmente. Da mesma forma, não foram observadas alterações na razão NAD/NADH, indicando que este eixo não é relevante para a produção de mROS nesse contexto. Em conjunto, esses resultados indicam que as mitocôndrias produzem mROS em um mecanismo dependente do potencial de membrana mitocondrial, o que é evidenciado pela maior reatividade com o *MitoTracker Red CMX-Ros* por monócitos durante a malária causada pelo *P. vivax*.

De fato, o fluxo metabólico extracelular do metabolismo mitocondrial demonstrou que os monócitos de pacientes com malária ocasionada pelo *P. vivax* produzem menos ATP do que os de HD, dado reforçado por uma menor eficiência de acoplamento de prótons e menos taxa respiratória basal observada nessas células. Nessa conjectura, a mitocôndria possui um papel de destaque no metabolismo celular, seja no estabelecimento ou na manutenção de fenótipos em células do sistema imune, principalmente durante a ativação da resposta imunológica, na qual os leucócitos mudam completamente o seu metabolismo [234]. Nesse sentido, os eventos metabólicos mitocondriais são fortemente controlados nas células imunes, uma vez que podem ter um enorme impacto nas funções celulares. Estudos em macrófagos demonstraram que macrófagos M1 exibem um

CAC prejudicado, evidenciado pela diminuição dos níveis da enzima succinato desidrogenase (SDH) [250]. Nossos dados confirmam esse achado em monócitos humanos. Foi demonstrada uma diminuição nos níveis de SDH durante a malária causada pelo *P. vivax* de duas maneiras. Primeiro, foi observado que no sangue total de pacientes houve uma diminuição nos níveis de FAD, grupo protético na SDH, quando comparado aos doadores saudáveis. Além disso, foi demonstrada uma diminuição no número de transcritos da enzima nas subpopulações de monócitos dos pacientes. Importante ressaltar que a SHD também é conhecida como complexo II da CTE, sendo, portanto, a única enzima que participa da CAC e da CTE. Em conjunto, esses resultados indicaram uma diminuição na atividade de CAC e CTE nas subpopulações de monócitos dos pacientes infectados pelo *P. vivax*.

Em consonância com esses achados, também foi observada uma diminuição no número de transcritos de genes envolvidos na montagem do complexo TIM. Embora possua seu próprio material genético, o DNA mitocondrial, ele codifica uma pequena porcentagem das proteínas mitocondriais, sendo essas principalmente enzimas que atuam no CAC e no CTE. Dessa maneira, a grande maioria das proteínas encontradas nas mitocôndrias é derivada do DNA genômico e traduzida no citosol celular [264]. Para que alcancem seu local de atuação, é necessário que essas proteínas sejam transportadas até o compartimento mitocondrial. A primeira etapa desse transporte é efetuada pelo complexo TOM, responsável por reconhecer as proteínas precursoras no citosol e transportá-las através dos poros da membrana externa da mitocôndria [265]. De maneira geral, os monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax* não apresentaram diferenças significativas no número de transcritos de genes relacionados ao complexo TOM, sugerindo que o transporte pela membrana mitocondrial externa funciona normalmente em monócitos durante a infecção pelo *P. vivax*. É válido destacar que a membrana mitocondrial externa é prontamente permeável a moléculas pequenas e a íons, que se movem livremente por canais transmembrana [241].

A segunda etapa de transporte de proteínas para a mitocôndria é efetuada pelo complexo TIM, responsável pelo transporte de proteínas do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial [264]. Todos os genes analisados apresentaram um número de transcritos diminuídos em monócitos de pacientes em

comparação aos monócitos de indivíduos saudáveis, sugerindo que esse transporte se encontra alterado durante a malária ocasionada pelo *P. vivax*. É importante mencionar que a membrana interna é impermeável à maioria das moléculas pequenas e aos íons, incluindo prótons; as únicas espécies que cruzam a membrana o fazem por meio de transportadores específicos e é justamente nessa membrana que se encontram os quatro complexos da CTE e a ATP-sintase [241]. É na matriz mitocondrial que se encontram várias moléculas, incluindo todas as enzimas necessárias para a realização do CAC [265], sendo assim esses resultados sugerem que há uma diminuição na atividade do CAC.

Condizente com esse resultado, foi também demonstrado que apesar de não haver diferenças nos níveis de mRNA da enzima citocromo c oxidase, observamos uma diminuição no número de transcritos de genes relacionados à montagem do complexo IV. Curiosamente, não houve diferença no número de transcritos do complexo V, ou ATP sintase, entre pacientes e doadores saudáveis, indicando que eles têm a mesma capacidade de produzir ATP via OXPHOS. Entretanto, os resultados aqui relatados sugerem que o transporte de elétrons pela CTE resulta em um aumento na variação do potencial da membrana mitocondrial, que em vez de ser usada para produzir ATP via OXPHOS, está produzindo mROS. Esses resultados estão de acordo com a ativação dessas células durante a resposta imunológica [52,60], demonstrando que essas células apresentam um metabolismo celular anabólico, no qual a produção de ATP é balanceada com a produção de outros metabólitos necessários para a realização de um resoste imune eficiente [234], incluindo a produção de ROS.

O aumento do potencial de membrana mitocondrial nos monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> em comparação com outros subtipos foi demonstrado previamente [52], sugerindo uma atividade metabólica diferenciada durante a infecção pelo *P. vivax*, corroborando com o aumento das funções efetoras desse subtipo, como a produção de ROS mitocondrial [52] e de citocinas pró-inflamatórias [60,250]. O presente estudo confirmou esses achados e demonstrou que apesar da infecção não alterar a quantidade de mitocôndrias nas subpopulações de monócitos, ela aumentou o potencial de membrana mitocondrial nas mesmas, sugerindo que a infecção pelo *P. vivax* modifica a atividade mitocondrial nessas células. Nesse



contexto, é válido destacar que o potencial de membrana mitocondrial é um fator importante na produção de superóxido pelas mitocôndrias [285,298].

O papel do estresse oxidativo durante a malária ainda não é completamente compreendido. Estudos sugerem que ROS atuam na defesa contra o parasito e outros relacionam a sua produção com a patogênese da doença [290,291]. O papel mais bem conhecido de ROS em células do sistema imune é na morte de parasitos por meio da explosão oxidativa mediada pelo complexo da NADPH oxidase (NOX) em fagócitos. Entretanto, foi demonstrado que a ausência de NADPH oxidase não alterou a parasitemia em animais infectados com diferentes espécies de *Plasmodium spp.* [292], e não contribuiu para a patogênese da malária cerebral murina [313]. De maneira interessante, também foi demonstrado que a proteína circunsporozoíta da malária é capaz de inibir a explosão oxidativa em células de Kupffer [314]. Em conjunto, esses resultados sugerem que ROS derivadas de NOX não são essenciais para o controle do parasito. Apesar disso, no presente estudo, foi demonstrado que, assim como observado em relação a mROS, a malária também aumentou a atividade de NOX nas subpopulações de monócitos, indicando que, pelo menos em humanos, esse processo pode estar envolvido no desenvolvimento de uma resposta imune protetora contra o plasmódio.

Esses resultados condizem com dados da literatura que mostram que a malária induz uma forte resposta imune inata [49,50,51] e que as subpopulações de monócitos apresentam um perfil altamente inflamatório durante a fase aguda da doença, principalmente os monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> e CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> [52]. Nesse contexto, estudos vêm demonstrando o papel de mROS na morte de microorganismos [277,288]. Por exemplo, foi demonstrado que macrófagos que produziam mais ROS mitocondrial, devido a uma deficiência no transporte de prótons através da mitocôndria, apresentavam uma maior eficiência na eliminação de taquizoítos de *T. gondii in vitro*, sendo esse efeito revertido com o uso de antioxidantes [288]. Além disso, um trabalho mais recente demonstrou que a superexpressão de catalase, enzima antioxidante, em monócitos comprometia a capacidade dos mesmos em eliminar eficientemente a bactéria *Salmonella typhimurium* [277].

Uma vez que ROS são moléculas com meia-vida relativamente curta, acredita-se que a colocalização entre o seu sítio de produção e seu sítio alvo aumente sua

eficiência funcional [287]. Demonstramos que as mitocôndrias dos monócitos foram capazes de migrar para o fagolisossomo contendo o *Pv*-RET. Tais resultados condizem com dados da literatura que demonstram a migração de mitocôndrias para áreas contendo PAMPs de parasitos [277]. É importante ressaltar que além de migrar para o fagolisossomo, foi observado que as mitocôndrias produziram mROS, indicando um papel do último no controle do parasito. Curiosamente, foi demonstrado que os monócitos inflamatórios fagocitam e controlam o *P. vivax* melhor do que outros subtipos [52], porém o mecanismo pelo qual isso acontece ainda não foi elucidado. O presente estudo confirmou que os monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> produzem mais mROS do que as outras subpopulações, resultado que condiz com a maior reatividade dessa subpopulação com a sonda *MitoTracker Red*, uma vez que a mesma reflete o potencial de membrana mitocondrial, determinante importante para a produção de ROS mitocondrial [285,298].

Devido à importância de ROS na sinalização celular e considerando que o estresse oxidativo pode causar danos ao hospedeiro, sua produção é regulada em vários níveis. A produção de enzimas antioxidantes que atuam diminuindo a quantidade de ROS representa um mecanismo essencial de regulação [285]. As enzimas superóxido dismutase (SOD) se destacam nesse cenário, uma vez que catalisam a dismutação do superóxido em oxigênio molecular ou peróxido de hidrogênio, atuando, portanto, na defesa ao estresse oxidativo [295]. Foi demonstrado que os monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax* apresentam o mesmo número de transcritos do gene de *SOD1* em comparação a indivíduos saudáveis, exceto para os monócitos clássicos. Entretanto, todas as subpopulações de monócitos de pacientes apresentaram um aumento no número de transcritos do gene de *SOD2*. É válido ressaltar que *SOD1* é a principal enzima antioxidante presente no citoplasma celular e que *SOD2* é encontrada principalmente na matriz mitocondrial, atuando no controle antioxidante contra o estresse oxidativo mitocondrial [295]. Esses resultados corroboram com os dados anteriores, mostrando um aumento na produção de mROS durante a malária. A fim de evitar grandes danos nos tecidos durante a malária ocasionada pelo *P. vivax*, o controle antioxidante também é aumentado. Além disso, esse resultado reforça a importância da colocalização do sítio produtor de ROS e seu foco de ação.

Em conjunto, esses resultados refletem as mudanças metabólicas que ocorrem nas subpopulações de monócitos durante a ativação de uma resposta imunológica inflamatória contra o plasmódio. Nessa conjectura, é importante destacar que na maioria das infecções parasitárias, existe uma relação dinâmica entre o agente etiológico e o sistema imunológico do hospedeiro, cujo equilíbrio, se alterado, pode influenciar no prognóstico da doença [24]. Assim, o equilíbrio entre elementos da resposta imune inflamatória, como é o caso do mROS, e da resposta imune reguladora é minuciosamente modulado, a fim de permitir um controle eficaz da carga parasitária e limitar simultaneamente os danos ao hospedeiro [102]. Um potente elemento regulador da inflamação é IL-10 [122].

Sendo assim, a adenosina se destaca como uma molécula reguladora, que tem sido frequentemente associada ao controle da resposta inflamatória à infecção, principalmente por estimular a produção de IL-10 [152]. A adenosina é gerada através da hidrólise do ATP extracelular realizada por ectoenzimas [102]. Durante situações de estresse celular, o ATP pode ser liberado para o ambiente extracelular como um sinal de perigo [315,316]. A fim de regular a inflamação desencadeada pelo ATP extracelular, sua concentração é modulada pelas ectonucleotidases CD39 e CD73. Primeiro, a ecto-NTPDase1 (CD39) hidrolisa o ATP em ADP e subsequentemente em AMP. Em seguida, a ecto-5'-nucleotidase (CD73) desfosforila AMP e produz adenosina [102,157,168,169,170,171]. O papel dessas enzimas no contexto imunológico é tão importante que qualquer alteração desse processo pode modificar o prognóstico de muitos eventos fisiopatológicos [157].

O papel da adenosina na modulação da inflamação tem sido extensivamente estudado, mas sua relevância na regulação da resposta imune do hospedeiro contra infecções precisa ser aprimorada [102]. A maioria das pesquisas concentra-se no estudo dos receptores, enquanto a quantificação da adenosina é limitada, principalmente por restrições técnicas [226]. Estudos que dosaram os níveis plasmáticos de adenosina em humanos estavam interessados, principalmente, em defini-la como um biomarcador para doenças cardiovasculares [229,230,231,232]. Considerando a importância da quantificação da adenosina no cenário de doenças infecciosas, nós dosamos os níveis plasmáticos de adenosina em pacientes na fase aguda da malária causada pelo *P. vivax* ou *P. falciparum* e após o tratamento, bem como em doadores saudáveis de área endêmica e não endêmica. Nossos

resultados demonstraram um aumento no nível de adenosina em pacientes infectados pelo *P. vivax* após o tratamento, enquanto nenhuma diferença foi observada na malária *falciparum*. Curiosamente, também foi mostrado que doadores saudáveis de área endêmica apresentaram níveis mais altos de adenosina do que aqueles da região não endêmica.

Estudos recentes têm demonstrado o papel do sistema CD39/CD73 em infecções, causadas principalmente por bactérias e vírus. Um estudo mostrou que camundongos que superexpressam CD39 humano nas células epiteliais das vias aéreas aumentaram a resposta inflamatória e conseqüentemente eliminaram mais eficientemente a infecção por *Pseudomonas aeruginosa*. Foi especulado que a superexpressão de ectonucleotidase reduziu o nível de ATP extracelular, limitando a dessensibilização dos receptores purinérgicos P2, que desencadeia a inflamação das vias aéreas em resposta a bactérias [188]. Na infecção por citomegalovírus, foi demonstrado que o aumento na produção de adenosina, associado à regulação positiva na expressão de ectonucleotidases, causou um ambiente imunossupressor, facilitando a invasão celular pelo vírus [223]. Além disso, outro trabalho demonstrou um aumento na expressão de CD39 em linfócitos de indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), indicando um papel potencial das ectonucleotidases na disfunção imune relacionada a esta doença [224].

Com o intuito de definir o papel de diferentes células imunes na produção de adenosina, avaliamos a expressão de CD39 e CD73 em leucócitos do sangue periférico de pacientes com malária causada pelo *P. vivax* e pelo *P. falciparum*, antes e após o tratamento, bem como de doadores saudáveis. Evidências sugerem que a expressão dessas ectonucleotidases é induzida por citocinas pró-inflamatórias, estresse oxidativo e condições de hipóxia [166,167,174,317]. Estudos anteriores mostraram que o CD39 é expresso em níveis variáveis nos leucócitos [162,163,164]. Foi demonstrado que mais de 90% dos monócitos, neutrófilos e células B expressam CD39, enquanto apenas uma minoria de células T expressou essa ectonucleotidase [164]. Nossos resultados confirmam esses achados em indivíduos infectados e saudáveis. Monócitos clássicos e inflamatórios expressaram os maiores níveis de CD39. Curiosamente, observamos que o tratamento da malária causada pelo *P. vivax* aumentou a expressão da enzima em monócitos patrulhadores, neutrófilos e células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>.

De maneira semelhante, CD73 também é expresso em uma variedade de tecidos, bem como em leucócitos do sangue periférico [172,173]. Como observado para a expressão de CD39, CD73 também foi mais expresso nas subpopulações de monócitos e células B. Apesar das células T CD8<sup>+</sup> exibirem baixos níveis de CD39, elas expressaram altos níveis de CD73. Para os neutrófilos, os resultados foram exatamente o oposto, confirmando estudos anteriores que demonstraram que os neutrófilos expressam amplamente CD39 [164] e, em certa medida, CD73 [318]. Tomados em conjunto, nossos resultados demonstraram um papel importante para as subpopulações de monócitos e células B na produção de adenosina, uma vez que coexpressam ambas as ectonucleotidases em níveis elevados. Curiosamente, também observamos que as subpopulações de monócitos de pacientes expressaram mais CD73 do que aqueles de doadores saudáveis, e essa expressão não foi alterada após o tratamento da doença.

Estudos têm demonstrado a importância do eixo CD39/CD73 na diferenciação e ativação de macrófagos [187,319,320]. Macrófagos M1 possuem expressão diminuída de ambas as ectonucleotidases, causando um acúmulo de ATP extracelular [321]. Por outro lado, os macrófagos M2 possuem expressão aumentada de CD39 e CD73 e, conseqüentemente, um aumento na produção de adenosina, o que intensifica a capacidade anti-inflamatória e de remodelação tecidual dessas células [322]. Nesse contexto, a via CD39/CD73, através de sua atividade coordenada, regula a duração da sinalização purinérgica em resposta a várias condições extracelulares. Dessa maneira, assim como ocorre para IL-10, há uma dualidade no papel da adenosina. Durante uma infecção, a adenosina pode ser prejudicial ao hospedeiro, diminuindo a resposta antimicrobiana protetora. Ao mesmo tempo que é essencial para o controle da inflamação exacerbada durante a infecção aguda que pode ser prejudicial ao hospedeiro [102].

Da mesma forma que a adenosina, a IL-10 é uma molécula reguladora essencial, capaz de proteger o hospedeiro, limitando a inflamação exacerbada [118]. Seus efeitos são devidos à diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias e/ou quimiocinas, bem como pela regulação negativa do MHC-II e moléculas coestimuladoras nas células apresentadoras de antígenos (APCs) [121,123,124]. A ausência de IL-10, em algumas infecções, pode levar a uma eliminação mais eficaz e mais rápida do parasito sem causar danos colaterais mediados pelo sistema

imunológico ao hospedeiro [119,120]. Entretanto, em outros cenários, como o modelo experimental da malária, a falta de IL-10 causa efeitos imunopatológicos, evidenciando seu papel fundamental na modulação das respostas inflamatórias. Por exemplo, estudos usando camundongos deficientes em IL-10 infectados pelo *P. chabaudi chabaudi* AS demonstraram uma patologia excessiva, incluindo hipotermia, hipoglicemia e também uma perda de peso corporal [108]. A IL-10 também tem sido relacionada à hiperparasitemia em animais infectados pelo *P. chabaudi adami* [142]. No entanto, dados do modelo experimental de malária grave mostraram um papel protetor na malária cerebral experimental (MEC) [140], mas em uma infecção letal pelo *P. yoelii*, a produção de IL-10 foi correlacionada com alta parasitemia e anemia grave [116,141]. Portanto, juntos, esses resultados indicam que a IL-10 é necessária para controlar a inflamação e, conseqüentemente, proteger o hospedeiro, mas esse efeito também pode promover um aumento na parasitemia.

Curiosamente, estudos em humanos mostraram que indivíduos infectados pelo *P. vivax* apresentam maior expressão de IL-10 do que pacientes com malária *falciparum* [104]. Além disso, outros achados indicam que diferentes manifestações clínicas da doença estão fortemente associadas a um desequilíbrio na produção de citocinas inflamatórias e reguladoras [12]. Considerando que a IL-10 atua nas células imunes através da ativação de seu receptor (CD210) [121], analisamos a expressão de CD210 por leucócitos em pacientes infectados pelo *P. vivax* ou *P. falciparum* antes e após o tratamento da malária, bem como em doadores saudáveis. Demonstramos que os monócitos inflamatórios e as células B expressam os níveis mais altos de CD210 durante a fase aguda da malária ocasionada pelo *P. vivax*. As descobertas mostradas aqui indicam claramente um papel importante dos subtipos de monócitos no eixo CD39/CD73/IL-10/CD210.

Nosso grupo demonstrou que as subpopulações de monócitos desempenham um papel importante na defesa do hospedeiro contra a infecção, uma vez que foram os principais produtores de citocinas inflamatórias durante a fase aguda da doença, mas também foram capazes de produzir altos níveis de IL-10 quando estimulados com Pv-RET [52,60]. De maneira interessante, a fagocitose de Pv-RET não alterou a expressão de ectonucleotidases em subpopulações de monócitos, mostrando que o aumento nos níveis de CD73 observados na subpopulação de monócitos de pacientes com malária causada pelo *P. vivax* foram devidos à infecção *per se*, e não

estimulados pela fagocitose do parasito. Os monócitos inflamatórios se destacaram por expressarem os maiores níveis de todos os parâmetros analisados. Como CD39 e CD73 correspondem a etapas sequenciais de hidrólise de ATP em adenosina [102,157,168,169,170,171], é plausível pensar que sua colocalização aumenta sua eficiência. No entanto, não houve diferença nos níveis de colocalização entre as subpopulações de monócitos, indicando que eles tinham a mesma capacidade de produzir adenosina.

O ATP extracelular e a adenosina promovem suas funções via ativação dos receptores purinérgicos de superfície expressos pelas células imunes [154,157,168,194,323,324]. Burnstock (1978) propôs uma subdivisão do receptor purinérgico em P1 (adenosina) e P2 (ATP, ADP) [325]. Posteriormente, os receptores P2 foram divididos em receptores P2Y e P2X, com base em sua estrutura molecular [168]. Demonstramos que as subpopulações de monócitos exibiram expressão gênica de receptores purinérgicos P1 e P2 distinta em comparação aos doadores saudáveis. Surpreendentemente, após a infecção pelo *P. vivax*, as três subpopulações coexpressaram quase todos os genes analisados, indicando que a infecção pelo *P. vivax* causa mudanças substanciais na transcrição de receptores purinérgicos.

O papel dos receptores purinérgicos P1 tem sido amplamente relacionado nas células imunológicas. Em resumo, a sinalização da adenosina tem o intuito de evitar a inflamação exacerbada, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, inibindo a entrada de leucócitos nos tecidos através da regulação negativa de moléculas de adesão e quimiocinas, e por fim, desencadeando a produção de citocinas anti-inflamatórias [196,197,198]. Dessa forma, a natureza da ação da adenosina depende da magnitude da concentração de adenosina extracelular, bem como da expressão de cada subtipo dos receptores de adenosina nos diferentes tipos celulares [199]. Observamos um aumento na expressão dos receptores A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> em subpopulações de monócitos, indicando um papel para ambos durante a malária causada pelo *P. vivax*. Importante ressaltar que a concentração de adenosina extracelular também deve ser regulada a fim de modular os seus efeitos imunossupressivos. Sendo assim, a enzima adenosina desaminase (ADA) representa um importante regulador negativo dos níveis extracelulares de adenosina e conseqüentemente, atua modulando a estimulação dos receptores de adenosina

[192]. Nossos resultados mostram uma tendência de aumento no número de transcritos de ADA nos monócitos de pacientes, sugerindo que os efeitos da adenosina, apesar de importantes, devem ser regulados durante a infecção *pele P. vivax*

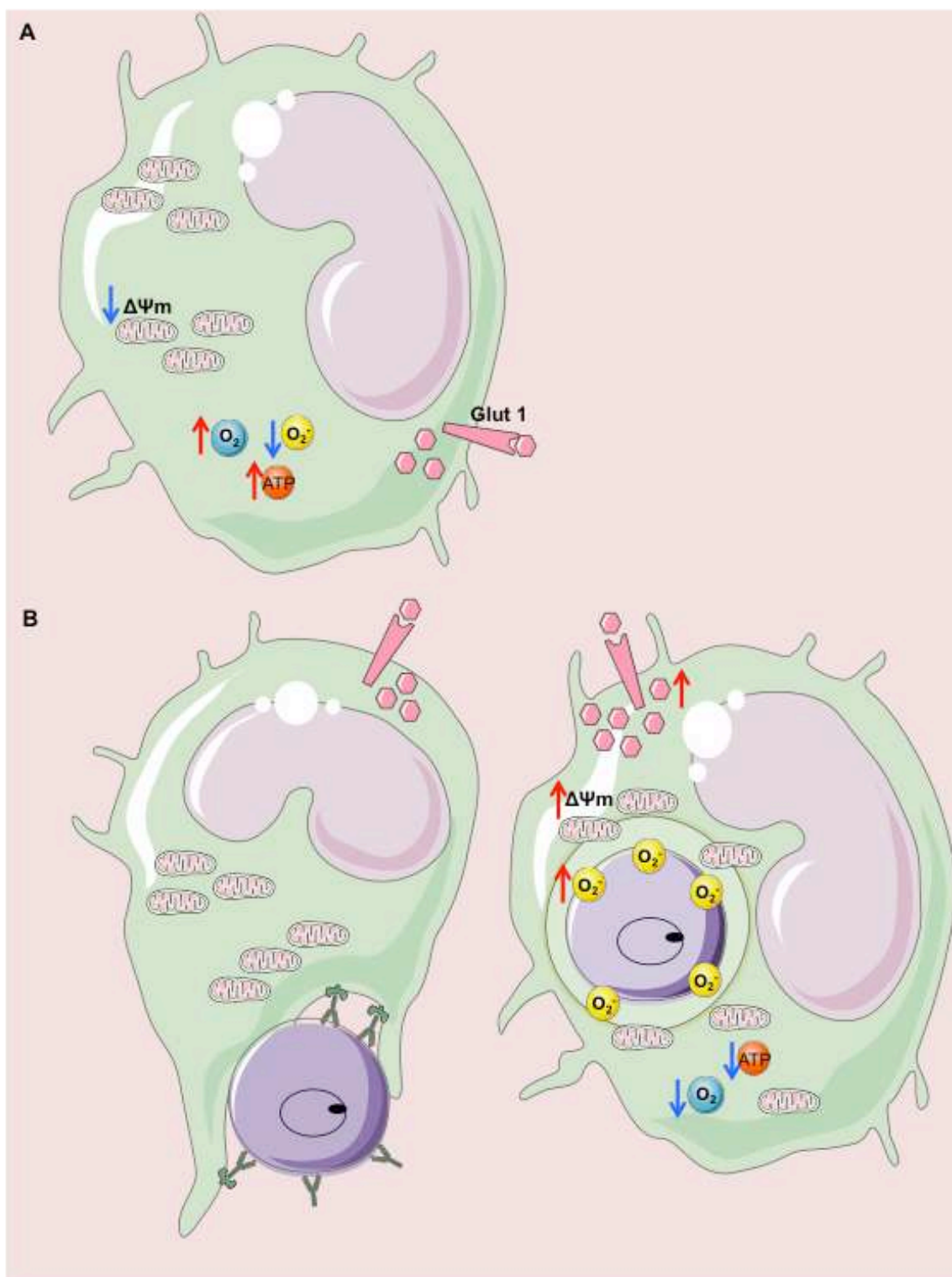
A ligação da adenosina nos receptores  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  inibe a produção de TNF [206,207,208,209] e aumenta a liberação de IL-10 [210,211,212] por macrófagos. Em monócitos, tanto o  $A_{2A}$  como o  $A_{2B}$  encontram-se envolvidos na inibição da liberação de TNF pelos monócitos [217]. Além disso, a ativação de  $A_{2A}$  também estimulou a IL-10 e inibiu a produção de IL-12 por monócitos humanos [217,218], além de inibir a produção de IL-18 induzida por LPS [220]. Nossos resultados confirmaram esses achados, demonstrando que esse efeito durante a infecção pelo *P. vivax* é completamente inibido pelo uso do antagonista do receptor  $A_{2A}$  (ZM241385), mas não pelo antagonista do  $A_{2B}$  (MRS1754).



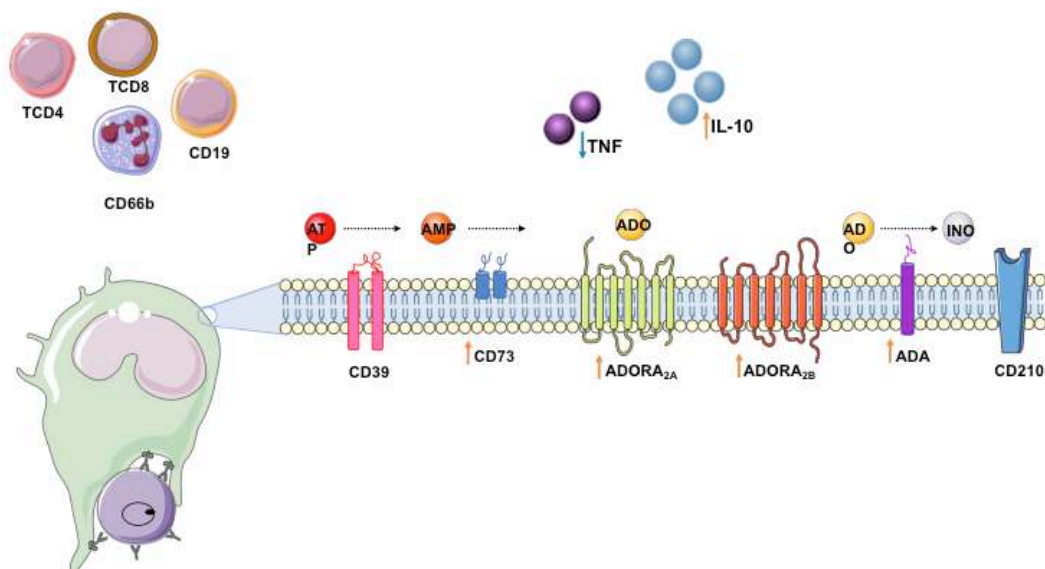
## 7 CONCLUSÕES

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que há uma reprogramação no metabolismo das subpopulações de monócitos durante a infecção pelo *P. vivax*. Em uma situação homeostática, as mitocôndrias dos monócitos produzem ATP ativamente, o que é devido a um alto consumo de oxigênio, baixo potencial de membrana mitocondrial e conseqüentemente, baixa produção de ROS mitocondrial. Entretanto, durante a malária ocasionada pelo *P. vivax*, os monócitos são capazes de fagocitar o reticulócito infectado pelo *Plasmodium vivax* e reprogramar seu metabolismo. Em vez de produzir altos níveis de ATP via OXPHOS, essas células tendem a aumentar a taxa de glicólise a fim de produzir energia suficiente para manter suas funções efectoras. Além disso, a energia da variação do potencial da membrana mitocondrial gerada pelo transporte de elétrons via CTE está sendo usada para produzir mROS, fenômeno evidenciado pela diminuição do consumo de oxigênio e da produção de ATP. Além disso, as mitocôndrias dos monócitos de pacientes possuem a habilidade de migrar para o fagolisossomo contendo o Pv-RET e produzir ROS mitocondrial, sugerindo um papel do último no controle do parasito (Figura 37).

As subpopulações de monócitos expressaram os níveis mais altos das ectonucleotidases CD39 e CD73, sugerindo um papel importante dessas células na produção de adenosina e conseqüentemente na modulação da resposta inflamatória estimulada durante malária. Apesar dos níveis circulantes de adenosina terem diminuído nos pacientes infectados pelo *P. vivax*, eles apresentaram expressão aumentada dos receptores  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  nas subpopulações de monócitos, indicando uma possível modulação da adenosina nessas células. Especulamos que a superexpressão dos receptores P1 ocasiona a redução dos níveis extracelulares de adenosina. Além disso, o tratamento com adenosina diminuiu a produção de TNF por monócitos, efeito abolido com o bloqueio do receptor de adenosina  $A_{2A}$  (Figura 38). Por fim, o presente estudo tentou contribuir com o conhecimento sobre resistência versus suscetibilidade à malária ocasionada pelo *P. vivax*.



**Figura 37. A infecção pelo *P. vivax* altera o metabolismo de monócitos** (A) Em uma situação homeostática, as mitocôndrias dos monócitos produzem ATP ativamente, o que é devido a um alto consumo de oxigênio, baixo potencial de membrana mitocondrial e consequentemente, baixa produção de ROS mitocondrial. (B) Durante a malária causada pelo *P. vivax*, os monócitos são capazes de fagocitar o Pv-RET e reprogramar seu metabolismo. As mitocôndrias dos monócitos de pacientes possuem a habilidade de migrar para o fagolisossomo contendo o Pv-RET e produzir ROS mitocondrial, que desempenha um papel no controle do plasmódio.



**Figura 38. Adenosina desempenha um papel na modulação da resposta de monócitos durante a infecção pelo *P. vivax*.** Durante a malária, os monócitos apresentam um aumento na expressão da ectonucleotidase CD73, bem como dos receptores ADORA<sub>2A</sub> e ADORA<sub>2B</sub> e da enzima adenosina desaminase (ADA). Foi demonstrado que monócitos possuem a maquinaria necessária para produzir adenosina a partir da hidrólise completa do ATP, e que essa através do receptor ADORA2 é capaz de diminuir a produção de TNF e aumentar a de IL-10 por essas células.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ministério da Saúde SdVeS (2017) Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica - Notificação de Casos - Malária.
2. Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, et al. (2004) A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. *Lancet* 363: 1017-1024.
3. Brasil P, Zalis MG, de Pina-Costa A, Siqueira AM, Junior CB, et al. (2017) Outbreak of human malaria caused by Plasmodium simium in the Atlac Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *Lancet Glob Health* 5: e1038-e1046.
4. -WHO WHO (2018) World Malaria Report: 2018.
5. Tauil PL (2006) Perspectives of vector borne diseases control in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 275-277.
6. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, et al. (2010) Malaria in Brazil: an overview. *Malar J* 9: 115.
7. Loiola CC, da Silva CJ, Tauil PL (2002) [Malaria control in Brazil: 1965 to 2001]. *Rev Panam Salud Publica* 11: 235-244.
8. Ministério da Saúde SdVeS (2014) Manual de diagnóstico laboratorial da malária.
9. Bousema T, Drakeley C (2011) Epidemiology and infectivity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clin Microbiol Rev* 24: 377-410.
10. Lacerda MV, Mourao MP, Alexandre MA, Siqueira AM, Magalhaes BM, et al. (2012) Understanding the clinical spectrum of complicated Plasmodium vivax malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malar J* 11: 12.
11. Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhaes BL, Mourao MP, et al. (2010) Severe Plasmodium vivax malaria, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis* 16: 1611-1614.
12. Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarencio J, Camargo LM, et al. (2010) Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J* 9: 13.
13. Costa FT, Lopes SC, Albrecht L, Ataide R, Siqueira AM, et al. (2012) On the pathogenesis of Plasmodium vivax malaria: perspectives from the Brazilian field. *Int J Parasitol* 42: 1099-1105.
14. Hall N, Karras M, Raine JD, Carlton JM, Kooij TW, et al. (2005) A comprehensive survey of the Plasmodium life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. *Science* 307: 82-86.
15. Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, et al. (2009) Key gaps in the knowledge of Plasmodium vivax, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis* 9: 555-566.
16. Schofield L, Grau GE (2005) Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol* 5: 722-735.
17. Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, et al. (2006) Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nat Med* 12: 220-224.
18. Kebaier C, Voza T, Vanderberg J (2009) Kinetics of mosquito-injected Plasmodium sporozoites in mice: fewer sporozoites are injected into sporozoite-immunized mice. *PLoS Pathog* 5: e1000399.
19. Menard R, Tavares J, Cockburn I, Markus M, Zavala F, et al. (2013) Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. *Nat Rev Microbiol* 11: 701-712.
20. Sturm A, Graewe S, Franke-Fayard B, Retzlaff S, Bolte S, et al. (2009) Alteration of the parasite plasma membrane and the parasitophorous vacuole membrane during exoerythrocytic development of malaria parasites. *Protist* 160: 51-63.
21. Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, et al. (2006) Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* 313: 1287-1290.

22. Kurup SP, Anthony SM, Hancox LS, Vijay R, Pewe LL, et al. (2019) Monocyte-Derived CD11c(+) Cells Acquire Plasmodium from Hepatocytes to Prime CD8 T Cell Immunity to Liver-Stage Malaria. *Cell Host Microbe* 25: 565-577 e566.
23. Neill US (2011) From branch to bedside: Youyou Tu is awarded the 2011 Lasker~DeBakey Clinical Medical Research Award for discovering artemisinin as a treatment for malaria. *The Journal of clinical investigation* 121(10): 3768-3773.
24. Stevenson MM, Riley EM (2004) Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol* 4: 169-180.
25. Katsuragawa TH, Gil LH, Tada MS, de Almeida e Silva A, Costa JD, et al. (2010) The dynamics of transmission and spatial distribution of malaria in riverside areas of Porto Velho, Rondonia, in the Amazon region of Brazil. *PLoS One* 5: e9245.
26. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK (2002) The pathogenic basis of malaria. *Nature* 415: 673-679.
27. Clark IA, Alleva LM, Mills AC, Cowden WB (2004) Pathogenesis of malaria and clinically similar conditions. *Clin Microbiol Rev* 17: 509-539, table of contents.
28. Marsh K, Kinyanjui S (2006) Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol* 28: 51-60.
29. Gething PW, Elyazar IR, Moyes CL, Smith DL, Battle KE, et al. (2012) A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1814.
30. Fowkes FJ, Boeuf P, Beeson JG (2016) Immunity to malaria in an era of declining malaria transmission. *Parasitology* 143: 139-153.
31. Crompton PD, Moebius J, Portugal S, Waisberg M, Hart G, et al. (2014) Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease. *Annu Rev Immunol* 32: 157-187.
32. Castelli F, Matteelli A, Caligaris S, Gulletta M, el-Hamad I, et al. (1999) Malaria in migrants. *Parassitologia* 41: 261-265.
33. Jelinek T, Schulte C, Behrens R, Grobusch MP, Coulaud JP, et al. (2002) Imported *Falciparum* malaria in Europe: sentinel surveillance data from the European network on surveillance of imported infectious diseases. *Clin Infect Dis* 34: 572-576.
34. Matteelli A, Colombini P, Gulletta M, Castelli F, Carosi G (1999) Epidemiological features and case management practices of imported malaria in northern Italy 1991-1995. *Trop Med Int Health* 4: 653-657.
35. Struik SS, Riley EM (2004) Does malaria suffer from lack of memory? *Immunol Rev* 201: 268-290.
36. Mueller I, Galinski MR, Tsuboi T, Arevalo-Herrera M, Collins WE, et al. (2013) Natural acquisition of immunity to *Plasmodium vivax*: epidemiological observations and potential targets. *Adv Parasitol* 81: 77-131.
37. Takeuchi O, Akira S (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140: 805-820.
38. Coban C, Ishii KJ, Uematsu S, Arisue N, Sato S, et al. (2007) Pathological role of Toll-like receptor signaling in cerebral malaria. *Int Immunol* 19: 67-79.
39. Gazzinelli RT, Kalantari P, Fitzgerald KA, Golenbock DT (2014) Innate sensing of malaria parasites. *Nat Rev Immunol* 14: 744-757.
40. Antonelli LR, Junqueira C, Vinetz JM, Golenbock DT, Ferreira MU, et al. (2019) The immunology of *Plasmodium vivax* malaria. *Immunol Rev* 1: 163-189.
41. Krishnegowda G, Hajjar AM, Zhu J, Douglass EJ, Uematsu S, et al. (2005) Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem* 280: 8606-8616.
42. Jaramillo M, Bellemare MJ, Martel C, Shio MT, Contreras AP, et al. (2009) Synthetic *Plasmodium*-like hemozoin activates the immune response: a morphology - function study. *PLoS One* 4: e6957.

43. Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, Latz E, Monks BG, et al. (2007) Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 1919-1924.
44. Coban C, Ishii KJ, Kawai T, Hemmi H, Sato S, et al. (2005) Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med* 201: 19-25.
45. Franklin BS, Ishizaka ST, Lamphier M, Gusovsky F, Hansen H, et al. (2011) Therapeutical targeting of nucleic acid-sensing Toll-like receptors prevents experimental cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 3689-3694.
46. Lyke KE, Burges R, Cissoko Y, Sangare L, Dao M, et al. (2004) Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. *Infect Immun* 72: 5630-5637.
47. Walther M, Woodruff J, Edele F, Jeffries D, Tongren JE, et al. (2006) Innate immune responses to human malaria: heterogeneous cytokine responses to blood-stage *Plasmodium falciparum* correlate with parasitological and clinical outcomes. *J Immunol* 177: 5736-5745.
48. Lagasse HA, Anidi IU, Craig JM, Limjunyawong N, Poupore AK, et al. (2016) Recruited monocytes modulate malaria-induced lung injury through CD36-mediated clearance of sequestered infected erythrocytes. *J Leukoc Biol* 99: 659-671.
49. Sponaas AM, Freitas do Rosario AP, Voisine C, Mastelic B, Thompson J, et al. (2009) Migrating monocytes recruited to the spleen play an important role in control of blood stage malaria. *Blood* 114: 5522-5531.
50. Langhorne J, Albano FR, Hensmann M, Sanni L, Cadman E, et al. (2004) Dendritic cells, pro-inflammatory responses, and antigen presentation in a rodent malaria infection. *Immunol Rev* 201: 35-47.
51. von der Weid T, Honarvar N, Langhorne J (1996) Gene-targeted mice lacking B cells are unable to eliminate a blood stage malaria infection. *J Immunol* 156: 2510-2516.
52. Antonelli LR, Leoratti FM, Costa PA, Rocha BC, Diniz SQ, et al. (2014) The CD14+CD16+ inflammatory monocyte subset displays increased mitochondrial activity and effector function during acute *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS Pathog* 9: e1004393.
53. Urban BC, Ing R, Stevenson MM (2005) Early interactions between blood-stage plasmodium parasites and the immune system. *Curr Top Microbiol Immunol* 297: 25-70.
54. Engwerda CR, Kumar R (2013) Mast cells fuel the fire of malaria immunopathology. *Nat Med* 19: 672-674.
55. Porcherie A, Mathieu C, Peronet R, Schneider E, Claver J, et al. (2011) Critical role of the neutrophil-associated high-affinity receptor for IgE in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *J Exp Med* 208: 2225-2236.
56. Rocha BC, Marques PE, Leoratti FMS, Junqueira C, Pereira DB, et al. (2015) Type I Interferon Transcriptional Signature in Neutrophils and Low-Density Granulocytes Are Associated with Tissue Damage in Malaria. *Cell Rep* 13: 2829-2841.
57. Wolf AS, Sherratt S, Riley EM (2017) NK Cells: Uncertain Allies against Malaria. *Front Immunol* 8: 212.
58. Hansen DS, D'Ombain MC, Schofield L (2007) The role of leukocytes bearing Natural Killer Complex receptors and Killer Immunoglobulin-like Receptors in the immunology of malaria. *Curr Opin Immunol* 19: 416-423.
59. Gogoi D, Biswas D, Borkakoty B, Mahanta J (2018) Exposure to *Plasmodium vivax* is associated with the increased expression of exhaustion markers on gammadelta T lymphocytes. *Parasite Immunol* 40: e12594.
60. Leoratti FM, Trevelin SC, Cunha FQ, Rocha BC, Costa PA, et al. (2012) Neutrophil paralysis in *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1710.
61. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F (2009) Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27: 669-692.

62. Swirski FK, Hilgendorf I, Robbins CS (2014) From proliferation to proliferation: monocyte lineage comes full circle. *Semin Immunopathol* 36: 137-148.
63. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404: 193-197.
64. Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P, et al. (2006) A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 311: 83-87.
65. Hettinger J, Richards DM, Hansson J, Barra MM, Joschko AC, et al. (2013) Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat Immunol* 14: 821-830.
66. Sheel M, Engwerda CR (2012) The diverse roles of monocytes in inflammation caused by protozoan parasitic diseases. *Trends Parasitol* 28: 408-416.
67. Bieber K, Autenrieth SE (2015) Insights how monocytes and dendritic cells contribute and regulate immune defense against microbial pathogens. *Immunobiology* 220: 215-226.
68. Geissmann F, Jung S, Littman DR (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19: 71-82.
69. Randolph GJ, Furie MB (1996) Mononuclear phagocytes egress from an in vitro model of the vascular wall by migrating across endothelium in the basal to apical direction: role of intercellular adhesion molecule 1 and the CD11/CD18 integrins. *J Exp Med* 183: 451-462.
70. Serbina NV, Pamer EG (2006) Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol* 7: 311-317.
71. Varol C, Landsman L, Fogg DK, Greenshtein L, Gildor B, et al. (2007) Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med* 204: 171-180.
72. Serbina NV, Cherny M, Shi C, Bleau SA, Collins NH, et al. (2009) Distinct responses of human monocyte subsets to *Aspergillus fumigatus* conidia. *J Immunol* 183: 2678-2687.
73. Goncalves R, Zhang X, Cohen H, Debrabant A, Mosser DM (2011) Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. *J Exp Med* 208: 1253-1265.
74. Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, et al. (2005) TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med* 11: 653-660.
75. Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG (2003) TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 19: 59-70.
76. Geissmann F, Auffray C, Palframan R, Wirrig C, Ciocca A, et al. (2008) Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol Cell Biol* 86: 398-408.
77. Leon B, Lopez-Bravo M, Ardavin C (2007) Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity* 26: 519-531.
78. Kratochvil RM, Kubes P, Deniset JF (2017) Monocyte Conversion During Inflammation and Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 37: 35-42.
79. Xiong H, Pamer EG (2015) Monocytes and infection: modulator, messenger and effector. *Immunobiology* 220: 210-214.
80. Jakubzick C, Gautier EL, Gibbings SL, Sojka DK, Schlitzer A, et al. (2013) Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* 39: 599-610.
81. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW (1989) Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74: 2527-2534.
82. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, et al. (2002) The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 168: 3536-3542.

83. Skrzeczynska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, et al. (2008) Peripheral blood CD14<sup>high</sup> CD16<sup>+</sup> monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol* 67: 152-159.
84. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, et al. (2010) Human CD14<sup>dim</sup> monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33: 375-386.
85. Wong KL, Tai JJ, Wong WC, Han H, Sem X, et al. (2011) Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 118: e16-31.
86. Mukherjee R, K $\alpha$  Barman P, Kumar Thatoi P, Tripathy R, Kumar Das B, et al. (2015) Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Rep* 5: 13886.
87. Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, Winter P, Marell RR, et al. (2011) SuperSAGE evidence for CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 118: e50-61.
88. Rossol M, Kraus S, Pierer M, Baerwald C, Wagner U (2012) The CD14(bright) CD16<sup>+</sup> monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum* 64: 671-677.
89. Schauer D, Starlinger P, Zajc P, Alidzanovic L, Maier T, et al. (2014) Monocytes with angiogenic potential are selectively induced by liver resection and accumulate near the site of liver regeneration. *BMC Immunol* 15: 50.
90. Tapp LD, Shantsila E, Wrigley BJ, Pamukcu B, Lip GY (2012) The CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocyte subset and monocyte-platelet interactions in patients with ST-elevation myocardial infarction. *J Thromb Haemost* 10: 1231-1241.
91. Tsujioka H, Imanishi T, Ikejima H, Kuroi A, Takarada S, et al. (2009) Impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 54: 130-138.
92. Baeten D, Boots AM, Steenbakkers PG, Elewaut D, Bos E, et al. (2000) Human cartilage gp-39<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> monocytes in peripheral blood and synovium: correlation with joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43: 1233-1243.
93. Kaito M, Araya S, Gondo Y, Fujita M, Minato N, et al. (2013) Relevance of distinct monocyte subsets to clinical course of ischemic stroke patients. *PLoS One* 8: e69409.
94. Rogacev KS, Cremers B, Zawada AM, Seiler S, Binder N, et al. (2012) CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J Am Coll Cardiol* 60: 1512-1520.
95. Warimwe GM, Murungi LM, Kamuyu G, Nyangweso GM, Wambua J, et al. (2013) The ratio of monocytes to lymphocytes in peripheral blood correlates with increased susceptibility to clinical malaria in Kenyan children. *PLoS One* 8: e57320.
96. Gowda DC (2007) TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs. *Trends Parasitol* 23: 596-604.
97. Chua CL, Brown G, Hamilton JA, Rogerson S, Boeuf P (2013) Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology? *Trends Parasitol* 29: 26-34.
98. Chikka P, Roussilhon C, Sratongno P, Ruangveerayuth R, Pattanapanyasat K, et al. (2009) A distinct peripheral blood monocyte phenotype is associated with parasite inhibitory activity in acute uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Pathog* 5: e1000631.
99. Kai OK, Roberts DJ (2008) The pathophysiology of malarial anaemia: where have all the red cells gone? *BMC Med* 6: 24.
100. Perkins DJ, Were T, Davenport GC, Kempaiah P, Hittner JB, et al. (2011) Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis. *Int J Biol Sci* 7: 1427-1442.
101. Awandare GA, Kempaiah P, Ochiel DO, Piazza P, Keller CC, et al. (2011) Mechanisms of erythropoiesis inhibition by malarial pigment and malaria-induced proinflammatory mediators in an in vitro model. *Am J Hematol* 86: 155-162.



102. Alam MS, Costales MG, Cavanaugh C, Williams K (2015) Extracellular adenosine generation in the regulation of pro-inflammatory responses and pathogen colonization. *Biomolecules* 5: 775-792.
103. Kumar R, Ng S, Engwerda C (2019) The Role of IL-10 in Malaria: A Double Edged Sword. *Front Immunol* 10: 229.
104. Gonçalves RM, Scopel KK, Bastos MS, Ferreira MU (2012) Cytokine balance in human malaria: does *Plasmodium vivax* elicit more inflammatory responses than *Plasmodium falciparum*? *PLoS One* 7.
105. Mendonça VR, Queiroz AT, Lopes FM, Andrade BB, Barral-Netto M (2013) Networking the host immune response in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J*: 12-69.
106. Gazzinelli RT, Wysocka M, Hieny S, Schariton-Kersten T, Cheever A, et al. (1996) In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4<sup>+</sup> T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . *J Immunol* 157: 798-805.
107. Hunter CA, Ellis-Neyes LA, Slifer T, Kanaly S, Grunig G, et al. (1997) IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 158: 3311-3316.
108. Li C, Corraliza I, Langhorne J (1999) A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice. *Infect Immun* 67: 4435-4442.
109. Wilson EH, Wille-Reece U, Dzierszynski F, Hunter CA (2005) A critical role for IL-10 in limiting inflammation during toxoplasmic encephalitis. *J Neuroimmunol* 165: 63-74.
110. Grau GE, Fajardo LF, Piguet PF, Allet B, Lambert PH, et al. (1987) Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science* 237: 1210-1212.
111. Rudin W, Favre N, Bordmann G, Ryffel B (1997) Interferon- $\gamma$  is essential for the development of cerebral malaria. *Eur J Immunol* 27: 810-815.
112. Anderson CF, Mendez S, Sacks DL (2005) Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *J Immunol* 174: 2934-2941.
113. Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, et al. (2001) The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of  $\alpha$ -IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med* 194: 1497-1506.
114. Reed SG, Brownell CE, Russo DM, Silva JS, Grabstein KH, et al. (1994) IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 153: 3135-3140.
115. Roque S, Nobrega C, Appelberg R, Correia-Neves M (2007) IL-10 underlies distinct susceptibility of BALB/c and C57BL/6 mice to *Mycobacterium avium* infection and influences efficacy of abiotic therapy. *J Immunol* 178: 8028-8035.
116. Omer FM, de Souza JB, Riley EM (2003) Differential induction of TGF- $\beta$  regulates proinflammatory cytokine production and determines the outcome of lethal and nonlethal *Plasmodium yoelii* infections. *J Immunol* 171: 5430-5436.
117. Wu Y, Wang QH, Zheng L, Feng H, Liu J, et al. (2007) *Plasmodium yoelii*: distinct CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell responses during the early stages of infection in susceptible and resistant mice. *Exp Parasitol* 115: 301-304.
118. Couper KN, Blount DG, Riley EM (2008) IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 180: 5771-5777.
119. Ejrnaes M, Fillipi CM, Martinic MM, Ling EM, Togher LM, et al. (2006) Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. *J Med Exp* 203: 2461-2472.
120. Brooks DG, Trifilo MJ, Edelmann KH, Teyton L, McGavern DB, et al. (2006) Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nat Med* 12: 1301-1309.
121. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19: 683-765.

122. Saraiva M, O'Garra A (2010) The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 10: 170-181.
123. Mege JL, Meghari S, Honstettre A, Capo C, Raoult D (2006) The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 6: 557-569.
124. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, et al. (1991) IL-10 acts on the  $\alpha$ gen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 146: 3444-3451.
125. Freitas do Rosario AP, Langhorne J (2012) T cell-derived IL-10 and its impact on the regulation of host responses during malaria. *Int J Parasitol* 42: 549-555.
126. Rogers NC, Slack EC, Edwards AD, Nolte MA, Schulz O, et al. (2005) Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* 22: 507-517.
127. Netea MG, Suttmuller R, Hermann C, Van der Graaf CA, Van der Meer JW, et al. (2004) Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol* 172: 3712-3718.
128. Hu X, Paik PK, Chen J, Yarinina A, Kockeritz L, et al. (2006) IFN-gamma suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity* 24: 563-574.
129. Boonstra A, Rajsbaum R, Holman M, Marques R, Asselin-Paturel C, et al. (2006) Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. *J Immunol* 177: 7551-7558.
130. Wilkes DS, Neimeier M, Mathur PN, Soliman DM, Twigg HL, 3rd, et al. (1995) Effect of human lung allograft alveolar macrophages on IgG production: immunoregulatory role of interleukin-10, transforming growth factor-beta, and interleukin-6. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13: 621-628.
131. Armstrong L, Jordan N, Millar A (1996) Interleukin 10 (IL-10) regulation of tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) from human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes. *Thorax* 51: 143-149.
132. de Waal Malefyt R, Figdor CG, Huijbens R, Mohan-Peterson S, Bennett B, et al. (1993) Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10. *J Immunol* 151: 6370-6381.
133. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE (1991) Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174: 1209-1220.
134. Gruber MF, Williams CC, Gerrard TL (1994) Macrophage-colony-stimulating factor expression by  $\alpha$ -CD45 stimulated human monocytes is transcriptionally up-regulated by IL-1 beta and inhibited by IL-4 and IL-10. *J Immunol* 152: 1354-1361.
135. Berkman N, John M, Roesems G, Jose PJ, Barnes PJ, et al. (1995) Inhibition of macrophage inflammatory protein-1 alpha expression by IL-10. Differential sensitivities in human blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol* 155: 4412-4418.
136. Marfaing-Koka A, Maravic M, Humbert M, Galanaud P, Emilie D (1996) Contrasting effects of IL-4, IL-10 and corticosteroids on RANTES production by human monocytes. *Int Immunol* 8: 1587-1594.
137. Hart PH, Hunt EK, Bonder CS, Watson CJ, Finlay-Jones JJ (1996) Regulation of surface and soluble TNF receptor expression on human monocytes and synovial fluid macrophages by IL-4 and IL-10. *J Immunol* 157: 3672-3680.
138. Joyce DA, Steer JH (1996) IL-4, IL-10 and IFN-gamma have distinct, but interacting, effects on differentiation-induced changes in TNF-alpha and TNF receptor release by cultured human monocytes. *Cytokine* 8: 49-57.
139. Dickensheets HL, Freeman SL, Smith MF, Donnelly RP (1997) Interleukin-10 upregulates tumor necrosis factor receptor type-II (p75) gene expression in endotoxin-stimulated human monocytes. *Blood* 90: 4162-4171.

140. Sanni LA, Jarra W, Li C, Langhorne J (2004) Cerebral edema and cerebral hemorrhages in interleukin-10-deficient mice infected with *Plasmodium chabaudi*. *Infect Immun* 72: 3054-3058.
141. Kobayashi F, Ishida H, Matsui T, Tsuji M (2000) Effects of in vivo administration of  $\alpha$ -IL-10 or  $\alpha$ -IFN- $\gamma$  monoclonal antibody on the host defense mechanism against *Plasmodium yoelii yoelii* infection. *J Vet Med Sci* 62: 583-587.
142. Weidanz WP, Batchelder JM, Flaherty P, LaFleur G, Wong C, et al. (2005) *Plasmodium chabaudi* adami: use of the B-cell-deficient mouse to define possible mechanisms modulating parasitemia of chronic malaria. *Exp Parasitol* 111: 97-104.
143. Zhang G, Manaca MN, McNamara-Smith M, Mayor A, Nhabomba A, et al. (2012) Interleukin-10 (IL-10) polymorphisms are associated with IL-10 production and clinical malaria in young children. *Infect Immun* 80: 2316-2322.
144. Luty AJ, Perkins DJ, Lell B, Schmidt-Ott R, Lehman LG, et al. (2000) Low interleukin-12 activity in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* 68: 3909-3915.
145. Kurtzhals JA, Adabayeri V, Goka BQ, Akanmori BD, Oliver-Commey JO, et al. (1998) Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. *Lancet* 351: 1768-1772.
146. Othoro C, Lal AA, Nahlen B, Koech D, Orago AS, et al. (1999) A low interleukin-10 tumor necrosis factor- $\alpha$  ratio is associated with malaria anemia in children residing in a holoendemic malaria region in western Kenya. *J Infect Dis* 179: 279-282.
147. Borges QI, Fontes CJ, Damazo AS (2013) Analysis of lymphocytes in patients with *Plasmodium vivax* malaria and its relation to the annexin-A1 and IL-10. *Malar J*: 1475-2875-1412-1455.
148. Drury AN, Szent-Gyorgyi A (1929) The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 68: 213-237.
149. Huang S, Apasov S, Koshiba M, Sitkovsky M (1997) Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion. *Blood* 90: 1600-1610.
150. Lappas CM, Rieger JM, Linden J (2005) A2A adenosine receptor induction inhibits IFN- $\gamma$  production in murine CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 174: 1073-1080.
151. Sitkovsky M, Lukashev D, Deaglio S, Dwyer K, Robson SC, et al. (2008) Adenosine A2A receptor antagonists: blockade of adenosinergic effects and T regulatory cells. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1: S457-464.
152. Koscsó B, Csoka B, Kokai E, Nemeth ZH, Pacher P, et al. (2013) Adenosine augments IL-10-induced STAT3 signaling in M2c macrophages. *J Leukoc Biol* 94: 1309-1315.
153. Peng Z, Fernandez P, Wilder T, Yee H, Chiriboga L, et al. (2008) Ecto-5'-nucleotidase (CD73) -mediated extracellular adenosine production plays a critical role in hepatic fibrosis. *FASEB J* 22: 2263-2272.
154. Sitkovsky MV, Lukashev D, Apasov S, Kojima H, Koshiba M, et al. (2004) Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. *Annu Rev Immunol* 22: 657-682.
155. Idzko M, Ferrari D, Riegel AK, Eltzschig HK (2014) Extracellular nucleotide and nucleoside signaling in vascular and blood disease. *Blood* 124: 1029-1037.
156. Faigle M, Seessle J, Zug S, El Kasmí KC, Eltzschig HK (2008) ATP release from vascular endothelia occurs across Cx43 hemichannels and is attenuated during hypoxia. *PLoS One* 3: e2801.
157. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G (2013) CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med* 19: 355-367.
158. Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM, Louis N, Karhausen J, et al. (2002) Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest* 110: 993-1002.
159. Homolya L, Steinberg TH, Boucher RC (2000) Cell to cell communication in response to mechanical stress via bilateral release of ATP and UTP in polarized epithelia. *J Cell Biol* 150: 1349-1360.

160. Seror C, Melki MT, Subra F, Raza SQ, Bras M, et al. (2011) Extracellular ATP acts on P2Y2 purinergic receptors to facilitate HIV-1 infection. *J Exp Med* 208: 1823-1834.
161. Burnstock G, Kennedy C (1985) Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol* 16: 433-440.
162. Koziak K, Sevigny J, Robson SC, Siegel JB, Kaczmarek E (1999) Analysis of CD39/ATP diphosphohydrolase (ATPDase) expression in endothelial cells, platelets and leukocytes. *Thromb Haemost* 82: 1538-1544.
163. Dwyer KM, Deaglio S, Gao W, Friedman D, Strom TB, et al. (2007) CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal* 3: 171-180.
164. Pulte ED, Broekman MJ, Olson KE, Drosopoulos JH, Kizer JR, et al. (2007) CD39/NTPDase-1 activity and expression in normal leukocytes. *Thromb Res* 121: 309-317.
165. Beldi G, Banz Y, Kroemer A, Sun X, Wu Y, et al. (2010) Deletion of CD39 on natural killer cells attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Hepatology* 51: 1702-1711.
166. Deaglio S, Robson SC (2011) Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity. *Adv Pharmacol* 61: 301-332.
167. Eltzschig HK, Kohler D, Eckle T, Kong T, Robson SC, et al. (2009) Central role of Sp1-regulated CD39 in hypoxia/ischemia protection. *Blood* 113: 224-232.
168. Abbracchio MP, Burnstock G (1994) Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 64: 445-475.
169. Robson SC, Sevigny J, Zimmermann H (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2: 409-430.
170. Zimmermann H (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362: 299-309.
171. Regateiro FS, Cobbold SP, Waldmann H (2013) CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments. *Clin Exp Immunol* 171: 1-7.
172. Thompson LF, Eltzschig HK, Ibla JC, Van De Wiele CJ, Resta R, et al. (2004) Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J Exp Med* 200: 1395-1405.
173. Lennon PF, Taylor CT, Stahl GL, Colgan SP (1998) Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation. *J Exp Med* 188: 1433-1443.
174. Beavis PA, Stagg J, Darcy PK, Smyth MJ (2012) CD73: a potent suppressor of tumor immune responses. *Trends Immunol* 33: 231-237.
175. Jackson EK, Gillespie DG (2013) Extracellular 2',3'-cAMP-adenosine pathway in proximal tubular, thick ascending limb, and collecting duct epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 304: F49-55.
176. Jackson EK, Ren J, Mi Z (2009) Extracellular 2',3'-cAMP is a source of adenosine. *J Biol Chem* 284: 33097-33106.
177. Hart ML, Grenz A, Gorzolla IC, Schittenhelm J, Dalton JH, et al. (2011) Hypoxia-inducible factor-1alpha-dependent protection from intestinal ischemia/reperfusion injury involves ecto-5'-nucleotidase (CD73) and the A2B adenosine receptor. *J Immunol* 186: 4367-4374.
178. Hart ML, Henn M, Kohler D, Kloor D, Mittelbronn M, et al. (2008) Role of extracellular nucleotide phosphohydrolysis in intestinal ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 22: 2784-2797.
179. Hart ML, Much C, Gorzolla IC, Schittenhelm J, Kloor D, et al. (2008) Extracellular adenosine production by ecto-5'-nucleotidase protects during murine hepatic ischemic preconditioning. *Gastroenterology* 135: 1739-1750 e1733.
180. Hasko G, Pacher P (2012) Regulation of macrophage function by adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32: 865-869.

181. Mahamed DA, Mills JH, Egan CE, Denkers EY, Bynoe MS (2012) CD73-generated adenosine facilitates *Toxoplasma gondii* differentiation to long-lived tissue cysts in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 16312-16317.
182. Thammavongsa V, Kern JW, Missiakas DM, Schneewind O (2009) *Staphylococcus aureus* synthesizes adenosine to escape host immune responses. *J Exp Med* 206: 2417-2427.
183. Firon A, Dinis M, Raynal B, Poyart C, Trieu-Cuot P, et al. (2014) Extracellular nucleotide catabolism by the Group B *Streptococcus* ectonucleotidase NudP increases bacterial survival in blood. *J Biol Chem* 289: 5479-5489.
184. Idzko M, Ferrari D, Eltzschig HK (2014) Nucleotide signalling during inflammation. *Nature* 509: 310-317.
185. Sansom FM, Newton HJ, Crikis S, Cianciotto NP, Cowan PJ, et al. (2007) A bacterial ecto-triphosphate diphosphohydrolase similar to human CD39 is essential for intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* 9: 1922-1935.
186. Riedmaier P, Sansom FM, Sofian T, Beddoe T, Schuelein R, et al. (2014) Multiple ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases facilitate intracellular replication of *Legionella pneumophila*. *Biochem J* 462: 279-289.
187. Hasko G, Csoka B, Koscsó B, Chandra R, Pacher P, et al. (2011) Ecto-5'-nucleotidase (CD73) decreases mortality and organ injury in sepsis. *J Immunol* 187: 4256-4267.
188. Theatre E, Frederix K, Guilmain W, Delierneux C, Lecut C, et al. (2012) Overexpression of CD39 in mouse airways promotes bacteria-induced inflammation. *J Immunol* 189: 1966-1974.
189. Francois V, Shehade H, Acolty V, Preyat N, Delree P, et al. (2015) Intestinal immunopathology is associated with decreased CD73-generated adenosine during lethal infection. *Mucosal Immunol* 8: 773-784.
190. Friedman DJ, Kunzli BM, Yi AR, Sevigny J, Berberat PO, et al. (2009) From the Cover: CD39 deletion exacerbates experimental murine colitis and human polymorphisms increase susceptibility to inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 16788-16793.
191. Bynoe MS, Waickman AT, Mahamed DA, Mueller C, Mills JH, et al. (2012) CD73 is critical for the resolution of murine colonic inflammation. *J Biomed Biotechnol* 2012: 260983.
192. Antonioli L, Colucci R, La Motta C, Tuccori M, Awwad O, et al. (2012) Adenosine deaminase in the modulation of immune system and its potential as a novel target for treatment of inflammatory disorders. *Curr Drug Targets* 13: 842-862.
193. van Calker D, Muller M, Hamprecht B (1979) Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem* 33: 999-1005.
194. Hasko G, Linden J, Cronstein B, Pacher P (2008) Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov* 7: 759-770.
195. Sakowicz-Burkiewicz M, Pawelczyk T (2011) Recent advances in understanding the relationship between adenosine metabolism and the function of T and B lymphocytes in diabetes. *J Physiol Pharmacol* 62: 505-512.
196. Hasko G, Cronstein BN (2004) Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* 25: 33-39.
197. Okusa MD, Linden J, Huang L, Rieger JM, Macdonald TL, et al. (2000) A(2A) adenosine receptor-mediated inhibition of renal injury and neutrophil adhesion. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F809-818.
198. Hasko G, Nemeth ZH, Vizi ES, Salzman AL, Szabo C (1998) An agonist of adenosine A3 receptors decreases interleukin-12 and interferon-gamma production and prevents lethality in endotoxemic mice. *Eur J Pharmacol* 358: 261-268.
199. Feoktistov I, Biaggioni I, Cronstein BN (2009) Adenosine receptors in wound healing, fibrosis and angiogenesis. *Handb Exp Pharmacol*: 383-397.
200. Sitkovsky MV, Ohta A (2005) The 'danger' sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors? *Trends Immunol* 26: 299-304.

201. Sitkovsky MV (2003) Use of the A(2A) adenosine receptor as a physiological immunosuppressor and to engineer inflammation in vivo. *Biochem Pharmacol* 65: 493-501.
202. Lukashev D, Ohta A, Apasov S, Chen JF, Sitkovsky M (2004) Cutting edge: Physiologic attenuation of proinflammatory transcription by the Gs protein-coupled A2A adenosine receptor in vivo. *J Immunol* 173: 21-24.
203. Xaus J, Mirabet M, Lloberas J, Soler C, Lluís C, et al. (1999) IFN-gamma up-regulates the A2B adenosine receptor expression in macrophages: a mechanism of macrophage deactivation. *J Immunol* 162: 3607-3614.
204. Murphree LJ, Sullivan GW, Marshall MA, Linden J (2005) Lipopolysaccharide rapidly modifies adenosine receptor transcripts in murine and human macrophages: role of NF-kappaB in A(2A) adenosine receptor induction. *Biochem J* 391: 575-580.
205. Elson G, Eisenberg M, Garg C, Outram S, Ferrante CJ, et al. (2013) Induction of murine adenosine A(2A) receptor expression by LPS: analysis of the 5' upstream promoter. *Genes Immun* 14: 147-153.
206. Kreckler LM, Wan TC, Ge ZD, Auchampach JA (2006) Adenosine inhibits tumor necrosis factor-alpha release from mouse peritoneal macrophages via A2A and A2B but not the A3 adenosine receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 317: 172-180.
207. Ezeamuzie CI, Khan I (2007) The role of adenosine A(2) receptors in the regulation of TNF-alpha production and PGE(2) release in mouse peritoneal macrophages. *Int Immunopharmacol* 7: 483-490.
208. Chen H, Yang D, Carroll SH, Eltzschig HK, Ravid K (2009) Activation of the macrophage A2b adenosine receptor regulates tumor necrosis factor-alpha levels following vascular injury. *Exp Hematol* 37: 533-538.
209. Buenestado A, Grassin Delye S, Arnould I, Besnard F, Naline E, et al. (2010) The role of adenosine receptors in regulating production of tumour necrosis factor-alpha and chemokines by human lung macrophages. *Br J Pharmacol* 159: 1304-1311.
210. Nemeth ZH, Lutz CS, Csoka B, Deitch EA, Leibovich SJ, et al. (2005) Adenosine augments IL-10 production by macrophages through an A2B receptor-mediated posttranscriptional mechanism. *J Immunol* 175: 8260-8270.
211. Csoka B, Nemeth ZH, Selmeczy Z, Koscsó B, Pacher P, et al. (2007) Role of A(2A) adenosine receptors in regulation of opsonized *E. coli*-induced macrophage function. *Purinergic Signal* 3: 447-452.
212. Csoka B, Nemeth ZH, Virag L, Gergely P, Leibovich SJ, et al. (2007) A2A adenosine receptors and C/EBPbeta are crucially required for IL-10 production by macrophages exposed to *Escherichia coli*. *Blood* 110: 2685-2695.
213. Barczyk K, Ehrchen J, Tenbrock K, Ahlmann M, Kneidl J, et al. (2010) Glucocorticoids promote survival of  $\alpha$ -inflammatory macrophages via stimulation of adenosine receptor A3. *Blood* 116: 446-455.
214. Velot E, Haas B, Leonard F, Ernens I, Rolland-Turner M, et al. (2008) Activation of the adenosine-A3 receptor stimulates matrix metalloproteinase-9 secretion by macrophages. *Cardiovasc Res* 80: 246-254.
215. Cohen HB, Briggs KT, Marino JP, Ravid K, Robson SC, et al. (2013) TLR stimulation initiates a CD39-based autoregulatory mechanism that limits macrophage inflammatory responses. *Blood* 122: 1935-1945.
216. Le Vraux V, Chen YL, Masson I, De Sousa M, Giroud JP, et al. (1993) Inhibition of human monocyte TNF production by adenosine receptor agonists. *Life Sci* 52: 1917-1924.
217. Zhang JG, Hepburn L, Cruz G, Borman RA, Clark KL (2005) The role of adenosine A2A and A2B receptors in the regulation of TNF-alpha production by human monocytes. *Biochem Pharmacol* 69: 883-889.
218. Perez-Aso M, Feig JL, Mediero A, Cronstein BN (2013) Adenosine A2A receptor and TNF-alpha regulate the circadian machinery of the human monocytic THP-1 cells. *Inflammation* 36: 152-162.

219. Link AA, Kino T, Worth JA, McGuire JL, Crane ML, et al. (2000) Ligand-activation of the adenosine A2a receptors inhibits IL-12 production by human monocytes. *J Immunol* 164: 436-442.
220. Takahashi HK, Kanke T, Liu K, Yoshino T, Sendo T, et al. (2007) Adenosine A2A-receptor stimulation inhibits lipopolysaccharide-induced interleukin-18 production in monocytes. *J Pharmacol Sci* 104: 183-186.
221. Sciaraffia E, Riccomi A, Lindstedt R, Gesa V, Cirelli E, et al. (2014) Human monocytes respond to extracellular cAMP through A2A and A2B adenosine receptors. *J Leukoc Biol* 96: 113-122.
222. Kolachala VL, Vijay-Kumar M, Dalmaso G, Yang D, Linden J, et al. (2008) A2B adenosine receptor gene deletion attenuates murine colitis. *Gastroenterology* 135: 861-870.
223. Kas-Deelen AM, Bakker WW, Olinga P, Visser J, de Maar EF, et al. (2001) Cytomegalovirus infection increases the expression and activity of ecto-ATPase (CD39) and ecto-5'nucleotidase (CD73) on endothelial cells. *FEBS Lett* 491: 21-25.
224. Leal DB, Streher CA, Bertoncheli Cde M, Carli LF, Leal CA, et al. (2005) HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39-positive lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 1746: 129-134.
225. Figueiredo AB, Serafim TD, Marques-da-Silva EA, Meyer-Fernandes JR, Afonso LC (2012) *Leishmania amazonensis* impairs DC function by inhibiting CD40 expression via A2B adenosine receptor activation. *Eur J Immunol* 42: 1203-1215.
226. Moser GH, Schrader J, Deussen A (1989) Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. *Am J Physiol* 256: C799-806.
227. Deussen A, Stappert M, Schafer S, Kelm M (1999) Quodification of extracellular and intracellular adenosine production: understanding the transmembranous concentration gradient. *Circulation* 99: 2041-2047.
228. Maguire MH, Szabo I, Valko IE, Finley BE, Bennett TL (1998) Simultaneous measurement of adenosine and hypoxanthine in human umbilical cord plasma using reversed-phase high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection and on-line validation of peak purity. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 707: 33-41.
229. Ramakers BP, Pickkers P, Deussen A, Rongen GA, van den Broek P, et al. (2008) Measurement of the endogenous adenosine concentration in humans in vivo: methodological considerations. *Curr Drug Metab* 9: 679-685.
230. Simard T, Jung R, Labinaz A, Faraz MA, Ramirez FD, et al. (2019) Evaluation of Plasma Adenosine as a Marker of Cardiovascular Risk: Analytical and Biological Considerations. *J Am Heart Assoc* 8: e012228.
231. Bonello L, Laine M, Kipson N, Mancini J, Helal O, et al. (2014) Ticagrelor increases adenosine plasma concentration in patients with an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol* 63: 872-877.
232. Anderson JL, Habashi J, Carlquist JF, Muhlestein JB, Horne BD, et al. (2000) A common variant of the AMPD1 gene predicts improved cardiovascular survival in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 36: 1248-1252.
233. Pearce EL, Pearce EJ (2013) Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity* 38: 633-643.
234. Weinberg SE, Sena LA, Chandel NS (2015) Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity. *Immunity* 42: 406-417.
235. O'Neill LA, Kishton RJ, Rathmell J (2016) A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol* 16: 553-565.
236. Fox CJ, Hammerman PS, Thompson CB (2005) Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. *Nat Rev Immunol* 5: 844-852.
237. Rathmell JC, Farkash EA, Gao W, Thompson CB (2001) IL-7 enhances the survival and maintains the size of naive T cells. *J Immunol* 167: 6869-6876.

238. Wofford JA, Wieman HL, Jacobs SR, Zhao Y, Rathmell JC (2008) IL-7 promotes Glut1 trafficking and glucose uptake via STAT5-mediated activation of Akt to support T-cell survival. *Blood* 111: 2101-2111.
239. Igelsrud DE (1989) How Living Things Obtain Energy: A Simpler Explanation. *The American Biology Teacher* 51: 89-93.
240. Reid LS (1940) Cellular respiration. *British Journal of Anaesthesia* 17: 41-56.
241. Nelson DL, Cox MM (2014) *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. Veiga ABGd, translator. Porto Alegre: Artmed.
242. Newsholme P, Curi R, Gordon S, Newsholme EA (1986) Metabolism of glucose, glutamine, long-chain fatty acids and ketone bodies by murine macrophages. *Biochem J* 239: 121-125.
243. Alonso D, Nungester WJ (1956) Comparative study of host resistance of guinea pigs and rats. V. The effect of pneumococcal products on glycolysis and oxygen uptake by polymorphonuclear leucocytes. *J Infect Dis* 99: 174-181.
244. Michl J, Ohlbaum DJ, Silverstein SC (1976) 2-Deoxyglucose selectively inhibits Fc and complement receptor-mediated phagocytosis in mouse peritoneal macrophages II. Dissociation of the inhibitory effects of 2-deoxyglucose on phagocytosis and ATP generation. *J Exp Med* 144: 1484-1493.
245. Hamilton JA, Vairo G, Lingelbach SR (1986) CSF-1 stimulates glucose uptake in murine bone marrow-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 138: 445-454.
246. Shi LZ, Wang R, Huang G, Vogel P, Neale G, et al. (2011) HIF1 $\alpha$ -dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *J Exp Med* 208: 1367-1376.
247. Jha AK, Huang SC, Sergushichev A, Lampropoulou V, Ivanova Y, et al. (2015) Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity* 42: 419-430.
248. Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, et al. (2013) Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ . *Nature* 496: 238-242.
249. Infano V, Convertini P, Cucci L, Panaro MA, Di Noia MA, et al. (2011) The mitochondrial citrate carrier: a new player in inflammation. *Biochem J* 438: 433-436.
250. Mills EL, Kelly B, Logan A, Costa ASH, Varma M, et al. (2016) Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. *Cell* 167: 457-470 e413.
251. Murphy MP, O'Neill LAJ (2018) Krebs Cycle Reimagined: The Emerging Roles of Succinate and Itaconate as Signal Transducers. *Cell* 174: 780-784.
252. Zhao RZ, Jiang S, Zhang L, Yu ZB (2019) Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int J Mol Med* 44: 3-15.
253. Gaisne M, Bonnefoy N (2006) The COX18 gene, involved in mitochondrial biogenesis, is functionally conserved and tightly regulated in humans and fission yeast. *FEMS Yeast Res* 6: 869-882.
254. Osellame LD, Blacker TS, Duchon MR (2012) Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 26: 711-723.
255. Alberts B (2004) *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre: Artmed.
256. Archer SL (2013) Mitochondrial dynamics--mitochondrial fission and fusion in human diseases. *N Engl J Med* 369: 2236-2251.
257. Ryu SW, Han EC, Yoon J, Choi C (2015) The mitochondrial fusion-related proteins Mfn2 and OPA1 are transcriptionally induced during differentiation of bone marrow progenitors to immature dendritic cells. *Mol Cells* 38: 89-94.
258. Wai T, Langer T (2016) Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab* 27: 105-117.
259. Exner N, Treske B, Paquet D, Holmstrom K, Schiesling C, et al. (2007) Loss-of-function of human PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. *J Neurosci* 27: 12413-12418.



260. Zorzano A, Liesa M, Palacin M (2009) Role of mitochondrial dynamics proteins in the pathophysiology of obesity and type 2 diabetes. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 1846-1854.
261. Knott AB, Perkins G, Schwarzenbacher R, Bossy-Wetzel E (2008) Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 9: 505-518.
262. Buck MD, O'Sullivan D, Klein Geltink RI, Curtis JD, Chang CH, et al. (2016) Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate through Metabolic Programming. *Cell* 166: 63-76.
263. Lewis MR, Lewis WH (1914) Mitochondria in Tissue Culture. *Science* 39: 330-333.
264. Neupert W, Herrmann JM (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76: 723-749.
265. Varabyova A, Stojanovski D, Chacinska A (2013) Mitochondrial protein homeostasis. *IUBMB Life* 65: 191-201.
266. Faou P, Hoogenraad NJ (2012) Tom34: a cytosolic cochaperone of the Hsp90/Hsp70 protein complex involved in mitochondrial protein import. *Biochim Biophys Acta* 1823: 348-357.
267. Ceh-Pavia E, Spiller MP, Lu H (2013) Folding and biogenesis of mitochondrial small Tim proteins. *Int J Mol Sci* 14: 16685-16705.
268. Garabedian M, Jarnik M, Kotova E, Tulin AV (2011) Generating a knockdown transgene against *Drosophila* heterochromatic *Tim17b* gene encoding mitochondrial translocase subunit. *PLoS One* 6: e25945.
269. Kawai A, Nishikawa S, Hirata A, Endo T (2001) Loss of the mitochondrial Hsp70 functions causes aggregation of mitochondria in yeast cells. *J Cell Sci* 114: 3565-3574.
270. Schulz C, Lytovchenko O, Melin J, Chacinska A, Guiard B, et al. (2011) Tim50's presequence receptor domain is essential for signal driven transport across the TIM23 complex. *J Cell Biol* 195: 643-656.
271. Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C (2012) Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 566-578.
272. Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, et al. (1998) Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 11715-11720.
273. Haschemi A, Kosma P, Gille L, Evans CR, Burant CF, et al. (2012) The sedoheptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. *Cell Metab* 15: 813-826.
274. Huang SC, Everts B, Ivanova Y, O'Sullivan D, Nascimento M, et al. (2014) Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. *Nat Immunol* 15: 846-855.
275. Jin Z, Wei W, Yang M, Du Y, Wan Y (2014) Mitochondrial complex I activity suppresses inflammation and enhances bone resorption by shifting macrophage-osteoclast polarization. *Cell Metab* 20: 483-498.
276. Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, Schumacker PT (2000) Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol* 165: 1013-1021.
277. West AP, Brodsky IE, Rahner C, Woo DK, Erdjument-Bromage H, et al. (2011) TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* 472: 476-480.
278. Lambeth JD (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4: 181-189.
279. Morgenstern DE, Gifford MA, Li LL, Doerschuk CM, Dinauer MC (1997) Absence of respiratory burst in X-linked chronic granulomatous disease mice leads to abnormalities in both host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus*. *J Exp Med* 185: 207-218.

280. Shiloh MU, MacMicking JD, Nicholson S, Brause JE, Potter S, et al. (1999) Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Immunity* 10: 29-38.
281. Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417: 1-13.
282. Erecinska M, Silver IA (2001) Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir Physiol* 128: 263-276.
283. Finkel T (1998) Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 10: 248-253.
284. Rhee SG, Bae YS, Lee SR, Kwon J (2000) Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci STKE* 2000: pe1.
285. Sena LA, Chandel NS (2012) Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell* 48: 158-167.
286. Echtay KS, Murphy MP, Smith RA, Talbot DA, Brand MD (2002) Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side. Studies using targeted oxidants. *J Biol Chem* 277: 47129-47135.
287. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, et al. (2006) Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 127: 397-408.
288. Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, Raimbault S, Manning BS, et al. (2000) Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet* 26: 435-439.
289. Mailloux RJ, Harper ME (2011) Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radic Biol Med* 51: 1106-1115.
290. Dey S, Guha M, Alam A, Goyal M, Bindu S, et al. (2009) Malarial infection develops mitochondrial pathology and mitochondrial oxidate stress to promote hepatocyte apoptosis. *Free Radic Biol Med* 46: 271-281.
291. Tripathy S, Roy S (2015) Redox sensing and signaling by malaria parasite in vertebrate host. *J Basic Microbiol* 55: 1053-1063.
292. Potter SM, Mitchell AJ, Cowden WB, Sanni LA, Dinauer M, et al. (2005) Phagocyte-derived reactive oxygen species do not influence the progression of murine blood-stage malaria infections. *Infect Immun* 73: 4941-4947.
293. Gopalakrishnan AM, Kumar N (2015) Amalarial action of artesunate involves DNA damage mediated by reactive oxygen species. *Amicrob Agents Chemother* 59: 317-325.
294. Becker K, Rahlfs S, Nickel C, Schirmer RH (2003) Glutathione--functions and metabolism in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Biol Chem* 384: 551-566.
295. Nojima Y, Ito K, Ono H, Nakazato T, Bono H, et al. (2015) Superoxide dismutases, SOD1 and SOD2, play a distinct role in the fat body during pupation in silkworm *Bombyx mori*. *PLoS One* 10: e0116007.
296. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG (2008) Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 26: 421-452.
297. Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, Dahl T, Dowidar N, et al. (2008) Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol* 26: 317-325.
298. Lambert AJ, Brand MD (2004) Superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. *Biochem J* 382: 511-517.
299. Breda CNS, Davanzo GG, Basso PJ, Câmara NOS, Moraes-Vieira PMM (2019) Mitochondria as central hub of the immune system. *Redox Biology*: 101255.
300. Angajala A, Lim S, Phillips JB, Kim JH, Yates C, et al. (2018) Diverse Roles of Mitochondria in Immune Responses: Novel Insights Into Immuno-Metabolism. *Front Immunol* 9: 1605.
301. Gren ST, Rasmussen TB, Janciauskiene S, Hakansson K, Gerwien JG, et al. (2015) A Single-Cell Gene-Expression Profile Reveals Inter-Cellular Heterogeneity within Human Monocyte Subsets. *PLoS One* 10: e0144351.

302. Ingersoll MA, Spanbroek R, Lottaz C, Gautier EL, Frankenberger M, et al. (2010) Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* 115: e10-19.
303. Freemerman AJ, Johnson AR, Sacks GN, Milner JJ, Kirk EL, et al. (2014) Metabolic reprogramming of macrophages: glucose transporter 1 (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a proinflammatory phenotype. *J Biol Chem* 289: 7884-7896.
304. Tan Z, Xie N, Cui H, Moellering DR, Abraham E, et al. (2015) Pyruvate dehydrogenase kinase 1 participates in macrophage polarization via regulating glucose metabolism. *J Immunol* 194: 6082-6089.
305. Lachmandas E, Boutens L, Ratter JM, Hijmans A, Hooiveld GJ, et al. (2016) Microbial stimulation of different Toll-like receptor signalling pathways induces diverse metabolic programmes in human monocytes. *Nat Microbiol* 2: 16246.
306. Kausar S, Wang F, Cui H (2018) The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Generation and Its Implications for Neurodegenerative Diseases. *Cells* 7: e274.
307. Chance B, Sies H, Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605.
308. Brand MD (2010) The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol* 45: 466-472.
309. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* 70: 200-214.
310. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ (2003) Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 278: 36027-36031.
311. Kudin AP, Bimpong-Buta NY, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS (2004) Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem* 279: 4127-4135.
312. Liu Y, Fiskum G, Schubert D (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 80: 780-787.
313. Sanni LA, Fu S, Dean RT, Bloomfield G, Stocker R, et al. (1999) Are reactive oxygen species involved in the pathogenesis of murine cerebral malaria? *J Infect Dis* 179: 217-222.
314. Usynin I, Klotz C, Frevert U (2007) Malaria circumsporozoite protein inhibits the respiratory burst in Kupffer cells. *Cell Microbiol* 9: 2610-2628.
315. la Sala A, Ferrari D, Di Virgilio F, Idzko M, Norgauer J, et al. (2003) Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J Leukoc Biol* 73: 339-343.
316. Di Virgilio F (2005) Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells. *Purinergic Signal* 1: 205-209.
317. Regateiro FS, Howie D, Nolan KF, Agorogiannis EI, Greaves DR, et al. (2011) Generation of  $\alpha$ -inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF- $\beta$ . *Eur J Immunol* 41: 2955-2965.
318. Flogel U, Burghoff S, van Lent PL, Temme S, Galbarz L, et al. (2012) Selective activation of adenosine A2A receptors on immune cells by a CD73-dependent prodrug suppresses joint inflammation in experimental rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med* 4: 146ra108.
319. Levesque SA, Kukulski F, Enjyoji K, Robson SC, Sevigny J (2010) NTPDase1 governs P2X7-dependent functions in murine macrophages. *Eur J Immunol* 40: 1473-1485.
320. Petrovic-Djergovic D, Hyman MC, Ray JJ, Bouis D, Visovatti SH, et al. (2012) Tissue-resident ecto-5' nucleotidase (CD73) regulates leukocyte trafficking in the ischemic brain. *J Immunol* 188: 2387-2398.
321. Zanin RF, Braganhol E, Bergamin LS, Campesato LF, Filho AZ, et al. (2012) Differential macrophage activation alters the expression profile of NTPDase and ecto-5'-nucleotidase. *PLoS One* 7: e31205.
322. Csoka B, Selmeczy Z, Koscsó B, Nemeth ZH, Pacher P, et al. (2012) Adenosine promotes alternative macrophage activation via A2A and A2B receptors. *FASEB J* 26: 376-386.

323. Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53: 527-552.
324. Burnstock G (2007) Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64: 1471-1783.
325. Burnstock G (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. *Cell membrane receptors for drugs and hormones*: 107-118.