

Suelen Queiroz Diniz

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES
REATIVAS DE OXIGÊNIO EM SUBPOPULAÇÕES DE
MONÓCITOS DE PACIENTES INFECTADOS PELO
*Plasmodium vivax***

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
2015

Suelen Queiroz Diniz

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES
REATIVAS DE OXIGÊNIO EM SUBPOPULAÇÕES DE
MONÓCITOS DE PACIENTES INFECTADOS PELO
*Plasmodium vivax***

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica e Imunologia da
Universidade Federal de Minas Gerais
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Dr. Ricardo Tostes
Gazzinelli

Co-orientadora: Dra. Lis Ribeiro do
Valle Antonelli

Belo Horizonte

2015

***Aos meus pais,
sem os quais nada disso teria sido possível.***

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir fazer o que amo todos os dias da minha vida.

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

À minha orientadora Lis, por ser um exemplo de profissional a ser seguido. Muito obrigada por tudo.

A todos os amigos do laboratório de Imunopatologia do Centro de Pesquisas René Rachou, por todos os momentos compartilhados.

Ao Dr. Ricardo Gazzinelli, líder do grupo de Imunopatologia da Fundação Oswaldo Cruz-MG (FIOCRUZ-MG), pela infraestrutura do laboratório e colaborações na área endêmica de malária.

Ao Centro de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ-MG e às plataformas de citometria de fluxo e PCR (PDTIS);

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 e a Profa. Andrea Teixeira pelas discussões e colaboração.

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

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

A malária é considerada uma das doenças mais prevalentes do mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a malária afeta aproximadamente 400 milhões de pessoas por ano. Apesar de sua incidência ter diminuído consideravelmente nos últimos anos, a malária continua sendo um dos maiores problemas de saúde pública no Brasil e no mundo. Durante a infecção, o agente etiológico *Plasmodium spp.* desencadeia a produção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Dados do nosso grupo e de outros demonstram a importância dos monócitos no controle e na patogênese da malária, visto que são os maiores produtores de citocinas inflamatórias durante a infecção. Os monócitos são uma população heterogênea e podem ser divididos em três subpopulações baseadas na expressão de CD14 e de CD16. Essas células são denominadas, monócitos clássicos (CD14⁺CD16⁻), inflamatórios ou intermediários (CD14^{high}CD16⁺) e patrulhadores (CD14^{low}CD16⁺). Considerando a importância dos monócitos durante a malária, o objetivo do presente estudo foi definir o papel das subpopulações de monócitos durante a infecção pelo *P. vivax*. A fim de responder essa questão, os monócitos clássicos, inflamatórios e patrulhadores presentes no sangue periférico de pacientes na fase aguda da malária foram caracterizados fenotipicamente e funcionalmente. Primeiramente, foram avaliadas as características ultraestruturais e atividade mitocondrial das subpopulações de monócitos. Uma vez que as subpopulações apresentaram características distintas, foi avaliada a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) total e mitocondrial. Os dados demonstram que os monócitos CD14^{high}CD16⁺ de pacientes com malária apresentam maior atividade mitocondrial e produzem mais ROS que os outros subtipos, sugerindo uma atividade metabólica diferenciada durante a infecção pelo *P. vivax*.

ABSTRACT

Malaria is considered one of the most prevalent diseases in the world. According with World Health Organization, malaria affects approximately 400 million people a year. Although the incidence of the disease has decreased remarkably in recent years, malaria is still one of the greatest public health problems in Brazil and worldwide. During the disease, the etiologic agent *Plasmodium spp.* triggers the production of high levels of inflammatory cytokines. Data from our group and others indicate the importance of monocytes in the control and pathogenesis of malaria, once they are the major source of pro-inflammatory cytokines during the infection. Monocytes are heterogeneous and can be divided into three distinct subsets described based on their expression of CD14 and CD16. These cells are referred to as, classical (CD14⁺CD16⁻), inflammatory or intermediate (CD14^{high}CD16⁺) and patrolling (CD14^{low}CD16⁺) monocytes. Given the importance of monocytes during malaria, the aim of our study is to define the role of the monocyte subsets during *P. vivax* infection. To address this question, we phenotypically and functionally characterized the classical, inflammatory, and patrolling monocytes present in the peripheral blood from patients experiencing acute malaria episodes. We first evaluated the ultra-structural features and mitochondria activity of monocyte subpopulations. Once they display distinct characteristics, we also assessed total and mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production. Our data show that CD14^{high}CD16⁺ monocytes in malaria patients displays increased mitochondrial activity and produce higher ROS level than the others subsets, suggesting a differential metabolic activity during *P. vivax* infection.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Ciclo da malária.....	17
FIGURA 2. Pacientes infectados pelo <i>P. vivax</i> apresentam alterações no compartimento de leucócitos.....	38
FIGURA 3. Caracterização das subpopulações de monócitos circulantes em pacientes infectados pelo <i>P. vivax</i>	39
FIGURA 4. Avaliação da pureza das subpopulações de monócitos..	40
FIGURA 5. Subpopulações de monócitos circulantes apresentam morfologia e conteúdo mitocondrial distintos... ..	41
FIGURA 6. Produção de ROS durante a malária <i>vivax</i>	43
FIGURA 7. Monócitos inflamatórios produzem mais ROS durante a malária <i>vivax</i> do que os demais subtipos.....	44
FIGURA 8. Mitocôndrias migram para o fagossomo em monócitos que fagocitaram Pv-RET.....	46
FIGURA 9. TLRs se colocizam com reticulócitos infectados pelo <i>P. vivax</i> e mitocôndrias em monócitos circulantes.....	47
FIGURA 10. Genes do complexo TIM, mas não TOM, possuem sua transcrição diminuída durante a malária <i>vivax</i>	49
FIGURA 11. Genes do complexo da citocromo c oxidase possuem a transcrição gênica diminuída durante a malária, enquanto transcritos de <i>SOD2</i> estão aumentados.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 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 factors*)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
1.1 Malária	12
1.1.1 <i>Malária no Brasil</i>	133
1.1.2 <i>Ciclo da malária</i>	14
1.2 Imunidade na Malária	17
1.2.1 <i>Imunidade inata</i>	18
1.2.1.1 <u>Monócitos</u>	20
1.2.1.1.1 Monócitos e imunopatogênese da Malária	211
1.3 Mitocôndria na regulação da resposta imune.....	22
1.3.1 <i>Espécies Reativas de Oxigênio</i>	24
1.3.1.1 <u>ROS na Malária</u>	266
1.3.2 Metabolismo Mitocondrial.....	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
1.3.2.1 <u>Complexo TOM</u>	27
1.3.2.2 <u>Complexo TIM</u>	28
1.3.2.3 <u>Complexo da citocromo c oxidase</u>	29
1.3.2.4 <u>Superóxidos Dismutases</u>	29
2 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo Geral	31
3.2 Objetivos Específicos	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 População avaliada - critérios de inclusão ou exclusão.....	32
4.2 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico (PBMC)	32
4.3 Purificação das subpopulações de monócitos.....	33
4.4 Microscopia Eletrônica	33
4.5 Análise mitocondrial	34
4.6 Detecção de ácido ribonucleico (RNA).....	34
4.7 Purificação de reticulócitos infectados pelo Plasmodium vivax.....	35

4.8	Detecção de ROS intracelular total e mitocondrial	35
4.9	Detecção de ROS total.....	36
4.10	Ensaio de colocalização.....	36
4.11	Análise estatística.....	37
4.12	Comitê de ética	37
5	RESULTADOS	38
5.1	Pacientes infectados pelo <i>P. vivax</i> apresentam alteração no compartimento leucocitário.....	38
5.2	Caracterização das subpopulações de monócitos circulantes durante a malária <i>vivax</i>	39
5.3	Análise da pureza	39
5.4	Monócitos de pacientes infectados pelo <i>P. vivax</i> exibem diferenças morfológicas	40
5.5	Reticulócitos infectados pelo <i>P. vivax</i> estimulam a produção de ROS por subpopulações de monócitos	42
5.6	Monócitos CD14 ⁺ CD16 ⁺ produzem mais ROS mitocondrial que os outros subtipos.....	43
5.7	Colocalização entre mitocôndrias e fagossomos em monócitos circulantes de pacientes infectados pelo <i>P. vivax</i>	45
5.8	Colocalização entre mitocôndrias, TLRs e reticulócitos infectados pelo <i>P. vivax</i> em monócitos circulantes.....	46
5.9	Monócitos de pacientes infectados pelo <i>P. vivax</i> apresentam diminuição na transcrição de genes relacionados ao transporte na mitocôndria	48
5.10	Monócitos de pacientes infectados pelo <i>P. vivax</i> apresentam diminuição na transcrição de genes de enzimas que atuam na mitocôndria	49
6	DISCUSSÃO	51
7	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS.....	58

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* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Dentro desse gênero, existem cinco 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 (SINGH *et al.*, 2004). 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 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Apesar de sua incidência ter diminuído consideravelmente nos últimos anos, a malária é apontada como uma das doenças mais prevalentes no mundo, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) estimava-se que 3,2 bilhões de pessoas se encontravam em risco de contrair a doença no ano de 2013. A malária atinge aproximadamente 97 países e infecta anualmente cerca de 120 a 300 milhões de pessoas, ocasionando milhares de mortes, principalmente de gestantes e crianças menores de cinco anos (WHO, 2014).

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. De acordo com dados da OMS, a maior proporção da mortalidade causada pela malária ocorre na África (90%), seguida pela Ásia e Oceania (≈10%) e por último, as Américas (<1%) (WHO, 2014).

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 a melhora econômica e social das áreas endêmicas da doença (TAUIL, 2006).

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 (DEANE, 1992 *apud* OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010).

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 (LOIOLA; SILVA; TAUIL, 2002).

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 o tratamento dos febris, o diagnóstico precoce e tratamento adequado dos casos foram tidos como prioridade. Além disso, a política visando o aumento do número de postos de saúdes capacitados a realizar as ações prioritárias resultou em uma menor proporção de casos de malária *falciparum* (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010).

No Brasil, existem três espécies do gênero *Plasmodium*: *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, não havendo casos de transmissão autóctone de *P. ovale* e *P. knowlesi* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). 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 (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010).

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 (BOUSEMA; DRAKELEY, 2011).

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 à região da Amazônia Legal, composta pelos estados do Amazonas, Acre, Roraima, Amapá, Pará, Tocantins, Rondônia e partes do Mato Grosso e do Maranhão (LACERDA *et al.*, 2012).

Em 2014, segundo dados do Ministério da Saúde, dos 142.564 casos notificados no Brasil, 83,3% 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* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Embora as infecções pelo *P. vivax* sejam consideradas mais brandas quando comparadas as de *P. falciparum*, é válido ressaltar que relatos de malária grave causada pelo *P. vivax* vêm sendo descritos na região amazônica (ALEXANDRE *et al.*, 2010; ANDRADE *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2012).

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 1) (HALL *et al.*, 2005; MUELLER *et al.*, 2009).

A malária é transmitida para hospedeiros vertebrados durante o repasto sanguíneo da fêmea do mosquito *Anopheles spp.*, desde que esta 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 (SCHOFIELD; GRAU, 2005).

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 se diferenciar parcialmente em estágios exoeritrocíticos. Tais resultados demonstram que esporozoítos podem, de fato, migrar para diferentes lugares, além do fígado, liberando antígenos exoeritrocíticos (AMINO *et al.*, 2006; KEBAIER; VOZA; VANDERBERG, 2009).

Uma vez nas células hepáticas, o plasmódio permanece dentro de vacúolos parasitóforos e passam 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 à diferenciação do parasito em merozoítos (MENARD *et al.*, 2013; STURM *et al.*, 2009). O grande número de merozoítos acaba por causar a lise 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 (MUELLER *et al.*, 2009).

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 merozoítos 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 (STURM *et al.*, 2006).

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. (MUELLER *et al.*, 2009).

Após esse período de intensa reprodução assexuada por esquizogonia, o grande número de merozoítos causa a lise dos eritrócitos, fazendo com que os primeiros sejam lançados na corrente sanguínea, promovendo o estágio eritrocítico do ciclo (SCHOFIELD; GRAU, 2005). 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 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Alguns merozoítos se diferenciam em gametócitos imaturos que posteriormente se tornarão gametócitos masculinos e femininos. No caso do *P. vivax*, é válido salientar que nessa fase podemos 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 (MUELLER *et al.*, 2009).

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 denominado oocineto (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). 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 do mesmo, dando continuidade ao ciclo de vida do parasito (HALL *et al.*, 2005; MUELLER *et al.*, 2009).

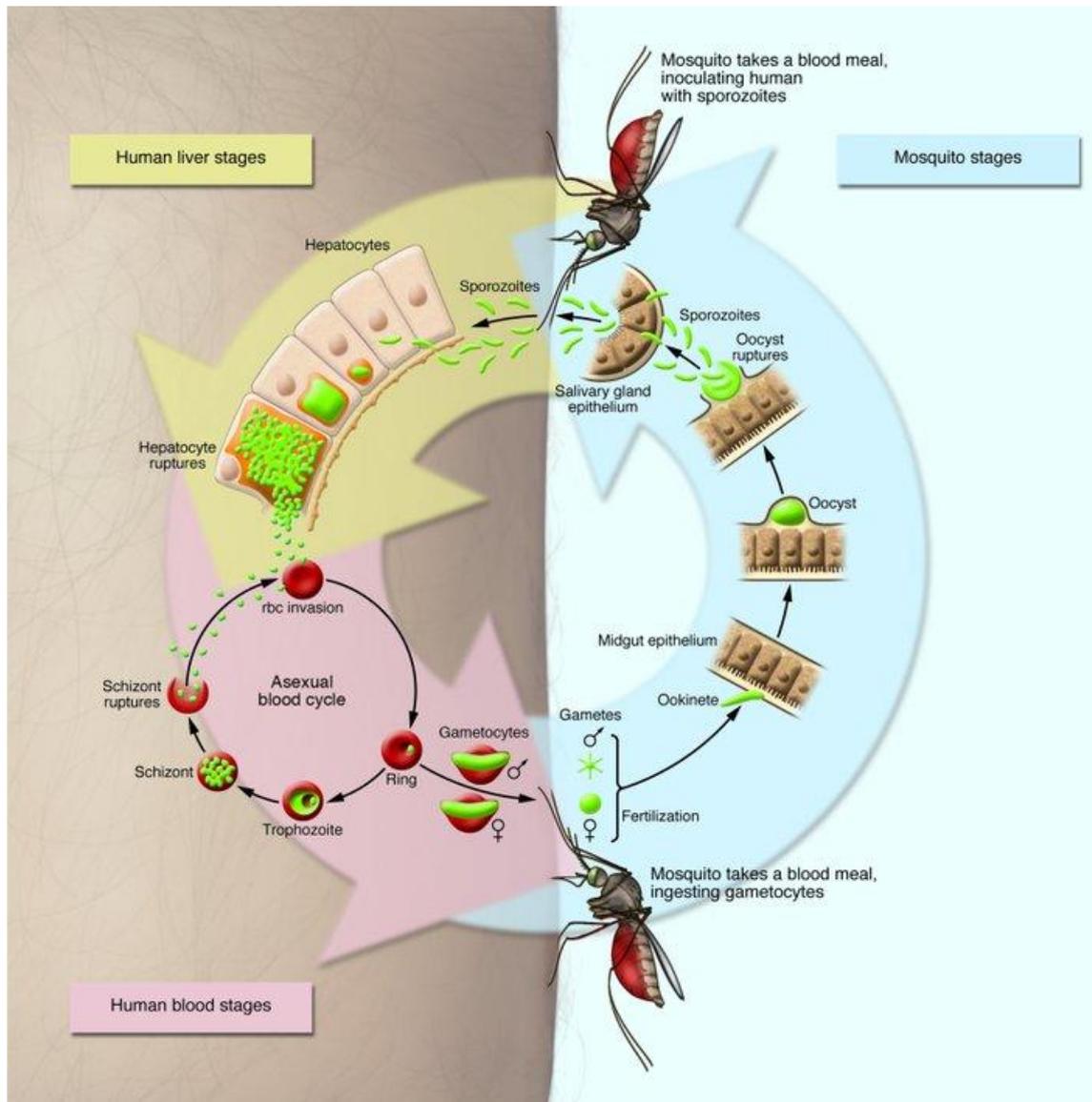


Figura 1. Ciclo da malária. O ciclo se inicia durante o repasto sanguíneo de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles* que injetam esporozoítos na derme do hospedeiro vertebrado. Os esporozoítos atingem a corrente sanguínea e alcançam o fígado infectando os hepatócitos. Após milhares de divisões se diferenciam 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 repete 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 parasito se diferencia novamente em esporozoítos migrando para as glândulas salivares do mosquito finalizando esse complexo ciclo (USHHMA, 2011).

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 (STEVENSON; RILEY, 2004).

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 (KATSURAGAWA *et al.*, 2010). Entretanto, os motivos pelos quais a resolução completa da doença não é alcançada ainda não são bem esclarecidos (MILLER *et al.*, 2002; CLARK *et al.*, 2004).

Nesse contexto, 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. Dessa maneira, adultos que vivem em regiões endêmicas frequentemente apresentam infecção assintomática (MARSH; KINYANJUI, 2006). Assim, a aquisição de imunidade contra a malária em seres humanos é complexa, envolvendo primeiramente a resistência contra formas graves da doença, seguida da resistência a doença não complicada e raramente resistência a infecção (CROMPTON *et al.*, 2014).

Quando os indivíduos deixam a área endêmica, a imunidade dos mesmos contra formas graves da doença parece persistir, por sua vez, a imunidade contra casos não complicados de malária diminui com o passar dos anos (CASTELLI *et al.*, 1999; JELINEK *et al.*, 2002; MATTEELLI *et al.*, 1999; STRUIK; RILEY, 2004). Sugerindo que a malária induz apenas uma memória de curto prazo (MUELLER *et al.*, 2013).

1.2.1 Imunidade inata

O sistema imune inato está envolvido no reconhecimento de componentes ativos derivados de patógenos através de uma variedade de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) expressos na membrana plasmática ou endossomal. Esses receptores reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e moléculas endógenas provenientes de dano celular,

denominadas padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) (TAKEUCHI *et al.*, 2010).

Os PRRs estão amplamente distribuídos em uma gama de tecidos e células com a finalidade de detectar e responder a infecções, desencadeando uma resposta imune inata através de adaptadores intracelulares e moléculas sinalizadoras. Em particular, os receptores semelhantes a *Toll* (TLRs), que são altamente expressos em células do sistema imunológico especializadas tais como macrófagos, células dendríticas e linfócitos B, possuem um importante papel não somente na eliminação dos parasitos, mas também na indução de respostas imunes adaptativas antígenos-específicas alcançando, assim, a proteção contra a infecção (COBAN *et al.*, 2007).

Estudos sugerem que além da função primária contra microrganismos, a ativação do sistema imune inato por TLRs pode estar envolvida na patogênese de várias enfermidades (COBAN *et al.*, 2007). Por exemplo, em modelo experimental de malária cerebral, foi demonstrado que TLR9 é essencial para a produção de citocinas pró-inflamatórias, indicando a sua importância na patogênese da doença (FRANKLIN *et al.*, 2011).

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 consequente liberação de merozoítos na corrente sanguínea, vários componentes do parasito são reconhecidos por receptores do sistema imune inato levando a ativação dos leucócitos (GAZZINELLI *et al.*, 2014).

A ruptura dos reticulócitos é tipicamente acompanhada por febre, náuseas, dores de cabeça e outros sintomas devidos a resposta de citocinas pró-inflamatórias produzidas em sua maioria por células do sistema imune inato, tais como Interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-12(p70), interferon (IFN)- γ e fator de necrose tumoral (TNF)- α (MILLER *et al.*, 2002; LYKE *et al.*, 2004; WALTHER *et al.*, 2006). Nesse contexto, é importante salientar que mediadores inflamatórios vêm sendo repetidamente relacionados à gravidade da malária, o que corrobora a ideia de que, pelo menos em parte, o sistema imune seja responsável pelos sintomas observados durante a doença (STEVENSON;RILEY, 2004).

A infecção pelo plasmódio induz uma forte resposta imune inata pelo hospedeiro que é necessária para iniciar a imunidade protetora adquirida, mediada principalmente por linfócitos T CD4+ e anticorpos (SPONNAS *et al.*, 2009; LANGHORNE *et al.*, 2004; VON DER WEID; HONARVAR; LANGHORNE, 1996). 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 (STEVENSON; RILEY, 2004).

Trabalhos utilizando modelos animais 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 (URBAN; STEVENSON, 2005), mastócitos (GUERMONPREZ *et al.*, 2013), neutrófilos (PORCHERIE *et al.*, 2011), células NK, NKT e linfócitos T $\gamma\delta$ (HANSEN; D'OMBRAIN; SCHOLFIELD, 2007).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que os monócitos desempenham um papel fundamental na resposta inflamatória contra o *P. vivax*. Essas células encontram-se altamente ativadas durante a doença, além de fagocitar o parasito também produzem altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (LEORATTI *et al.*, 2012; ANTONELLI *et al.*, 2014).

1.2.1.1 Monócitos

Os monócitos são leucócitos mononucleados que fazem parte do sistema imune inato e compõem uma das primeiras populações celulares a atuar na defesa do organismo contra patógenos (SHEEL; ENGWERDA, 2012). Estudos têm demonstrado que além de originar outros tipos celulares teciduais, os monócitos atuam como células efetoras inatas da resposta inflamatória contra microrganismos. Neste contexto, suas funções são inúmeras, incluindo, por exemplo, a morte de patógenos por meio da fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico, mieloperoxidase e citocinas inflamatórias (SERBINA *et al.*, 2009; GONÇALVES *et al.*, 2011; LEORATTI *et al.*, 2012; ANTONELLI *et al.*, 2014).

Os monócitos formam uma população de células heterogênea, com variadas funções, fazendo com que sua caracterização e fenotipagem sejam dificultadas. Há quase duas décadas, as subpopulações de monócitos humanos foram distinguidas

utilizando-se a expressão de CD14 (receptor de lipopolissacarídeo) e CD16 (receptor Fc para IgG). A população de monócitos CD14⁺CD16⁻ é capaz de produzir IL-10 e baixos níveis de TNF- α *in vitro*. Já os monócitos CD16⁺ são os principais produtores de citocinas inflamatórias, como o TNF- α e IL-1 β quando estimulados com LPS (lipopolissacarídeo) (BELGE *et al.*, 2002).

Dados da literatura mostram que a subpopulação de monócitos CD16⁺ ainda é heterogênea (SKRZECZYNSKA-MONCZNIZ *et al.*, 2008). Cros e colaboradores (2010) subclassificaram a população de monócitos CD16⁺ em duas subpopulações de acordo o nível da expressão de CD14: CD14⁺⁺(*high*) CD16⁺ e CD14⁺(*low*) CD16⁺. 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, estes monócitos são capazes de produzir TNF- α , IL-1 β , e CCL3 (CROS *et al.* 2010).

Dessa maneira, os monócitos circulantes de humanos foram divididos em três subpopulações: monócitos clássicos (CD14⁺CD16⁻), inflamatórios (CD14⁺CD16⁺) e patrulhadores (CD14^{lo}CD16⁺) (SHEEL; ENGWERDA, 2012; CROS *et al.*, 2010).

1.2.1.1.1 Monócitos e imunopatogênese da Malária

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. Este fenômeno foi demonstrado ser dependente de CCR2 e a ausência deste ocasionou um aumento da parasitemia dos animais infectados. Durante a infecção, essas células foram responsáveis pela produção de óxido nítrico sintase induzível e ROS. Portanto, estes resultados demonstraram que os monócitos são um componente de defesa imediata contra patógenos, sendo importantes no controle da infecção pelo plasmódio (SPONAAS *et al.*, 2009).

Na malária, para que ocorra o controle do parasito, são desencadeadas respostas essencialmente inflamatórias, que também são os responsáveis pelos sintomas observados durante a doença. 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 (LEORATTI *et al.*, 2012).

Nosso grupo demonstrou que os monócitos dos pacientes infectados pelo *P. vivax* apresentam um perfil de ativação diferenciado durante a fase aguda da doença. Há uma diminuição na expressão de HLA-DR (molécula de ativação) que pode refletir a ativação dessas células, PECAM-1 (moléculas de adesão) e CCR7 (receptor de CCL19 e CCL21) e um aumento de ICAM-1, VCAM-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⁺CD16⁻ e CD14⁺CD16⁺ apresentam um perfil mais inflamatório que os patrulhadores (ANTONELLI *et al.*, 2014).

É importante salientar que os monócitos inflamatórios apresentaram um aumento de suas funções efetoras, tais como fagocitose e *killing* do parasito, sendo, portanto, fundamentais no controle da parasitemia e na resistência do hospedeiro à infecção pelo *P. vivax* (ANTONELLI *et al.*, 2014).

1.3 Mitocôndria na regulação da 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. 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 adenosina trifosfato (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 (WEINBERG; SENA; CHANDEL, 2015).

Atualmente, acredita-se que o metabolismo não sustenta o fenótipo de diversas células como uma consequência da sinalização celular, mas sim atua alterando as vias de sinalização que levam a determinados fenótipos celulares. Nesse contexto, a mitocôndria desempenha um papel central no metabolismo celular, sendo necessária tanto para a manutenção quanto para o estabelecimento dos fenótipos das células do sistema imune (WEINBERG; SENA; CHANDEL, 2015).

As mitocôndrias são organelas compostas por dois subcompartimentos: a matriz mitocondrial e o espaço intermembranas. Esses compartimentos são formados pelas duas membranas mitocondriais: a membrana interna, que forma extensas invaginações denominadas cristas, e a membrana externa que está em contato com o citosol. Embora possua seu próprio material genético, o DNA mitocondrial, a maioria de suas proteínas é produzida no citosol (ALBERTS *et al.*, 2006).

Historicamente, o papel central da mitocôndria é efetuar a ligação eficiente entre a oxidação de metabólitos através do ciclo do ácido cítrico (CAC) e a produção de ATP pela cadeia transportadora de elétrons (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 (WEINBERG; SENA; CHANDEL, 2015).

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 citosólico. Esse influxo resulta na ativação de múltiplas enzimas do CAC e da CTE (RIZZUTO *et al.*, 2012). 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 (HIFs) um bom exemplo dessa via (CHANDEL *et al.*, 1998).

Nesse contexto, é importante ressaltar o papel da mitocôndria na regulação da resposta imune. Por exemplo, foi demonstrado que macrófagos M1 (perfil pró-inflamatório) 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 (HASCHEMI *et al.*, 2012; HUANG *et al.*, 2014). Em contraste, macrófagos M2 (perfil anti-inflamatório) apresentam um aumento do consumo de oxigênio. A importância da diferença do metabolismo mitocondrial entre M1 e M2 *in vivo* é suportada pelo

achado que camundongos deficientes em NDUFS4, subunidade do complexo I da CTE, exibem um aumento da polarização para M1 e diminuição para M2 (JIN *et al.*, 2014).

Os estudos iniciais implicando a mitocôndria como uma organela de sinalização na imunidade inata vieram de observações que LPS sinalizando via TLR4 e TNF- α através de fatores associados ao receptor TNF (*TNF receptor associated factors* - TRAFs) ativam a produção de citocinas inflamatórias por meio da produção de mROS (CHANDEL *et al.*, 2000). Estudos mais recentes demonstraram que a diminuição de mROS afeta a sinalização de múltiplos TLRs e a atividade bactericida em macrófagos (WEST *et al.*, 2011). Sendo assim, o papel de mROS na regulação da resposta imune se destaca como um tema emergente que vem sendo continuamente abordado.

1.3.1 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^-) pela coenzima nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (NADP+ na sua forma oxidada e NADPH na sua forma reduzida) (LAMBETH, 2004). ROS derivadas da NADPH oxidase (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 (MORGENSTERN *et al.*, 1997; SHILOH *et al.*, 1999). É válido salientar que ROS podem ser provenientes da NADPH ou do metabolismo mitocondrial, sendo a primeira fonte mais estudada no contexto de capacidade fagocítica.

Nesse contexto, a mitocôndria é uma importante fonte de superóxido intracelular na maioria das células de mamíferos. Essa produção ocorre através da redução por um elétron da molécula de oxigênio (O_2) formando O_2^- . 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^- varia de acordo com as concentrações dos mesmos (MURPHY, 2009). 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 (ERECINSKA; SILVER, 2001).

Atualmente, as ROS são consideradas moléculas de sinalização capazes de regular diversas vias fisiológicas. É válido ressaltar que essa não é uma ideia nova. Esse papel para ROS foi proposto na década de 90 quando demonstraram que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) era importante para a produção de citocinas, insulina, fatores de crescimento e sinalização de NF- κ B (fator de transcrição) (FINKEL *et al.*, 1998). O H_2O_2 pode inativar fosfatases por meio da oxidação de resíduos de cisteína, promovendo assim um mecanismo bioquímico plausível no qual ROS podem atuar nas cascatas de sinalização (RHEE *et al.*, 2000).

Dessa maneira, uma regulação precisa da produção de mROS é crítica para sua habilidade em atuar em vias de sinalização celular. Assim, a capacidade de sinalização de mROS é regulada em diversos níveis. Primeiro, a célula possui várias enzimas antioxidantes que conseguem eliminar ROS, geralmente transformando-as em água. Essa função antioxidante depende de quão rápido essas enzimas conseguem reagir com ROS, da concentração de ROS e da enzima (SENA; CHANDEL, 2012). Segundo, a regulação da produção de mROS também pode alterar a sua capacidade de sinalização. Foi encontrado que os maiores determinantes da produção de mROS são o estado redox da CTE e força próton-motriz (PMF) 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 CTE (ECHTAY *et al.*, 2002).

Por último, a capacidade de sinalização de mROS pode ser alterada pela localização da mitocôndria. ROS são geralmente moléculas de 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 (ST-PIERRE *et al.*, 2006). 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 a 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 UCP2, proteína responsável pelo transporte de prótons através da mitocôndria, produzem mais mROS e eliminam mais eficientemente taquizóitos de *Toxoplasma gondii in vitro*, efeito eliminado com o uso de antioxidantes (ARSENIJEVIC *et al.*, 2000). Considerando-se esse cenário é importante salientar que a expressão aumentada de UCP2 correlaciona-se negativamente com a produção mROS (MAILLOUX; HARPER, 2011).

Um estudos mais recente demonstrou que mROS é essencial para a via sinalização de TLRs. Foi demonstrado que a estimulação de TLRs de superfície (TLR1, TLR2 e TLR4), mas não endossomais (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9), leva a um aumento na produção de mROS. Além disso, foi demonstrado o papel de ROS no *killing* de bactérias, uma vez que monócitos superexpressando a enzima antioxidante catalase apresentavam um comprometimento em sua capacidade de *clearence* de *Salmonella typhimurium*. Assim sendo, é importante mencionar que esse estudo demonstrou que as mitocôndrias foram recrutadas para os vacúolos contendo a bactéria (WEST *et al.*, 2011).

1.3.1.1 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 (DEY *et al.*, 2009). 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 (TRIPATHY; ROY, 2015).

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. Esses dados sugerem que a geração de radicais livres não é devido à explosão respiratória por fagócitos, mas

sim pela mitocôndria e talvez pela produção pelo próprio parasito (POTTER *et al.*, 2005).

É importante salientar que a atividade antimalária 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 (GOPALAKRISHNAN; KUMAR, 2015). A fim de conter o estresse oxidativo, os parasitos da malária possuem um sistema de proteção antioxidante, incluindo GSH (glutathiona), SOD (superóxido dismutase) entre outros (BECKER *et al.*, 2003). 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 (GOPALAKRISHNAN; KUMAR, 2015).

Em conjunto, esses resultados sugerem que ROS são necessárias para a morte do parasito, mas também participam da patogênese da doença.

1.3.2 *Metabolismo Mitocondrial*

A biogênese de proteínas mitocondriais é extremamente dificultada devido à arquitetura da organela. 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. Essas proteínas são traduzidas em ribossomos no citosol da célula na forma de precursores que se diferenciam em sua forma funcional uma vez dentro da mitocôndria (NEUPERT; HERRMANN, 2007).

1.3.2.1 Complexo TOM

O transporte de proteínas precursoras pela membrana externa da mitocôndria é realizado pelo complexo de Translocase da Membrana Externa (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 (VARABYOVA; STOJANOVSKI; CHACINSKA, 2013).

No presente trabalho foram analisados os genes *TOMM34*, *TOMM40* e *TOMM70A*, pertencentes a esse complexo.

TOMM34 – O gene *TOMM34* codifica a proteína Tom34 que 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 (FAOU; HOOGENRAAD, 2012).

TOMM40 – O gene *TOMM40* codifica a proteína Tom40 que é a subunidade formadora do poro do complexo TOM, sendo, portanto essencial para o transporte de proteínas para a mitocôndria (NEUPERT; HERRMANN, 2007).

TOMM70A – O gene *TOMM70A* codifica a proteína Tom70 que é um dos receptores de superfície do complexo TOM responsável pelo reconhecimento de proteínas precursoras no citosol para posterior transporte pela membrana externa mitocondrial (VARABYOVA; STOJANOVSKI; CHACINSKA, 2013).

1.3.2.2 Complexo TIM

O transporte de proteínas precursoras pela membrana interna da mitocôndria é realizado pelo complexo de Translocase da Membrana Interna (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 (NEUPERT; HERRMANN, 2007).

Os genes analisados pertencentes a esse complexo foram: *TIMM10B*, *TIMM17B*, *TIMM44* e *TIMM50*:

TIMM10B – O gene *TIMM10B* codifica a proteína Tim10 que pertence a uma família de proteínas conservadas que se encontram organizadas em complexos no espaço intermembranas. Essas proteínas medeiam a importação e inserção de proteínas de membrana 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 (CEH-PAVIA; SPILLER; LU, 2013).

TIMM17B – Esse gene codifica uma proteína transmembrana Tim17, um componente integral do complexo TIM23 (GARABEDIAN *et al.*, 2011).

TIMM44 – O gene *TIMM44* codifica a proteína Tim44 que ancora a mtHsp70 ao complexo TIM23, estando envolvida na importação de proteínas para a matriz mitocondrial. Essa importação é dependente do potencial elétrico da membrana

mitocondrial interna e da hidrólise de ATP pelo domínio ATPase da mtHsp70 (KAWAI *et al.*, 2001).

TIMM50 – O gene *TIMM50* codifica a proteína Tim50 que 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 (SCHULZ *et al.*, 2011).

1.3.2.3 Complexo da citocromo c oxidase

A enzima citocromo c oxidase, também conhecida como complexo IV, é um complexo proteico transmembranar, sendo o último componente da CTE. Essa enzima recebe um elétron por vez da 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, que auxiliam na formação de um potencial quimiosmótico, utilizado pela ATP sintase para a formação de ATP. Esse complexo é formado por três subunidades catalíticas codificadas por genes mitocondriais e múltiplas subunidades estruturais codificadas por genes provenientes do DNA genômico. As subunidades mitocondriais atuam na transferência de elétrons e as genômicas, acredita-se, atuam na regulação e montagem do complexo (GAISNE; BONNEFOY, 2006).

Os genes analisados pertencentes a esse complexo foram: *COX10 E COX18*.

COX10 – É importante para a funcionalidade do complexo da citocromo c oxidase, uma vez que a proteína Cox10 está envolvida na maturação do grupo prostético heme da enzima (GAISNE; BONNEFOY, 2006).

COX18 – Esse gene codifica uma proteína importante para a montagem do complexo da citocromo c oxidase, sendo essencial para a inserção do complexo na membrana mitocondrial interna. Cox18 é necessária para a atividade do complexo e é requerida especificamente para que haja o acúmulo de Cox2, umas das subunidades catalíticas do complexo (GAISNE; BONNEFOY, 2006).

1.3.2.4 Superóxidos Dismutases

As superóxidos dismutase são enzimas que catalisam a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, atuando, portanto na defesa ao estresse oxidativo. 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 (NOJIMA *et al.*, 2015).

2 JUSTIFICATIVA

As infecções parasitárias são caracterizadas por uma relação dinâmica entre o agente etiológico e o hospedeiro. Fatores que alteram esse equilíbrio podem influenciar a susceptibilidade do hospedeiro e consequente prognóstico da doença. Nesse âmbito, as subpopulações de monócitos se destacam durante a resposta imune inata contra o plasmódio, influenciando a maneira como o hospedeiro controla e elimina a infecção malárica. Portanto, a realização do presente estudo visa auxiliar no entendimento da resposta imune contra o *Plasmodium spp.*, 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.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os mecanismos pelos quais as subpopulações de monócitos controlam diferentemente o *Plasmodium vivax*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar características ultraestruturais das subpopulações de monócitos em pacientes infectados pelo *P. vivax* e indivíduos saudáveis de área endêmica;
- Quantificar o número e a área das mitocôndrias das subpopulações de monócitos de pacientes com malária *vivax*;
- Analisar o potencial de membrana mitocondrial das subpopulações de monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax*;
- Avaliar a produção de ROS total e intracelular durante a malária *vivax*;
- Mensurar a produção de mROS pelas subpopulações de monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax*;
- Avaliar o recrutamento de mitocôndrias para os fagossomos de monócitos, após fagocitose de reticulócitos infectados pelo *P. vivax*;
- Avaliar a participação de TLRs na resposta imune ao *P. vivax*, através da colocalização dos mesmos com reticulócitos infectados pelo *P. vivax*;
- Determinar a transcrição de genes nucleares envolvidos no metabolismo mitocondrial.

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 ≥ 18 anos), que não apresentavam nenhuma outra 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 responsáveis e assinaram termos de consentimento em português e de acordo com as normas da resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Pesquisa do Brasil. 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 dano 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 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

4.2 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico (PBMC)

O sangue periférico de pacientes infectados pelo *P. vivax* e controles saudáveis (HD) foi coletado em tubos heparinizados. 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 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 antimarcadores de superfície celular (α -CD14 conjugado com APC, α -CD16 conjugado com PerCP-Cy5.5 e α -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 FACS Aria II *cell sorter* (BD *Biosciences*). A utilização deste equipamento permitiu a purificação das três subpopulações de monócitos: CD14⁺CD16⁻, CD14⁺CD16⁺ e CD14^{lo}CD16⁺.

4.4 Microscopia Eletrônica

Uma vez purificadas as subpopulações de monócitos por FACS-sorting, as células foram fixadas em uma solução 2,5% de glutaraldeído, 0,1 M, pH 7,2 durante 6 horas a 8°C. Em seguida, as células foram lavadas no mesmo tampão e o *pellet* ressuspendido em tampão fosfato, 4% de agarose e deixados *overnight* a 4°C. O próximo passo foi fixar as células em uma mistura de 1% de tetróxido de ósmio e 1,5% ferrocianeto de potássio e desidratá-las em soluções de etanol. As células foram então embebidas em Araldite 502 (*Electron Microscopy Sciences*, Hatfield, PA, USA). Após a polimerização, as células foram cortadas com uma lâmina de diamante no equipamento *Sorvall MT-2B ultramicrotome* (Dupont, Wilmington, DE, USA) e montadas em malhas de cobre (Ted Pella, Inc., Reading, CA, USA). Os cortes foram corados com acetato de urânio e citrato de chumbo de Reynolds e então analisados por microscopia eletrônica no Centro de Microscopia Eletrônica (CEMEL) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.5 Análise mitocondrial

As imagens de microscopia eletrônica foram analisadas utilizando o programa *ImageJ*. Através desse *software* foi possível contar o número de mitocôndrias e calcular a área das mesmas nas subpopulações de monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax*. A análise do conteúdo mitocondrial foi realizada utilizando a sonda *MitoTracker Red CMXRos* (*Life Technologies*). De maneira geral, após separação de PBMC, as células foram plaqueadas e incubadas durante 15 min, 4°C com o marcador de morte celular *Live/Dead* e em seguida levadas por centrifugação a 630 g, 5 min a temperatura ambiente. Em seguida foi adicionada a sonda *MitoTracker Red* na concentração de 37,5 nM por 15 min. Após esse período, as células foram marcadas com anticorpos de superfície α -CD14, α -CD16 e α -HLA-DR durante 30 min a 4°C. Após a lavagem, as células foram adquiridas em citômetro de fluxo (LSR Fortessa) e analisadas utilizando o *software FlowJo* versão 9.3.2 (*TreeStar*).

4.6 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 (GEISS *et al.*, 2008).

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 (GEISS *et al.*, 2008)..

Um total de 1×10^4 células de cada subpopulação foram lisadas com tampão RLT (*Qiagen*) suplementado com β -Mercaptoetanol, e em seguida congeladas no freezer -80°C. Posteriormente, os lisados celulares foram hibridizados com as

sondas repórter e de captura por 16 horas a 65°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.

4.7 Purificação de reticulócitos infectados pelo *Plasmodium vivax*

Com o pellet de eritrócitos, obtido da centrifugação do gradiente de densidade utilizando o *Ficoll Hypaque*, foram realizadas as etapas de lavagem. As hemácias foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (*Sigma Aldrich*) a um hematócrito final de 10%. 5 mL 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 (x10) e 2,25 mL de água destilada] em um tubo de 15 mL. Após centrifugação a 1600 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.

4.8 Detecção de ROS intracelular total e mitocondrial

A produção de ROS intracelular e mitocondrial foi detectada respectivamente através dos Kits de detecção de espécies reativas de oxigênio *Image-iT LIVE Green* (carboxi-H₂DCFDA) na concentração de 5 µM e indicador de superóxido mitocondrial *MitoSOX Red (MitoSOX)* (*Invitrogen*) na concentração de 2,5 µM. PBMC foram lavadas em PBS e incubadas em meio, Pv-Ret (0,5 Pv-Ret/PBMC) ou PMA/Ionomicina (10 ng/mL e 500 ng/mL). Carboxi-H₂DCFDA ou MitoSOX foram adicionados às células durante 3h à 37°C. As células foram então lavadas e coradas para caracterização de subpopulações de monócitos com os anticorpos α-CD14 conjugado com APC, α-CD16 conjugado com PerCP-Cy5.5 e α-HLA-DR conjugado com APC-eFluor 780, e analisadas por citometria de fluxo e avaliadas utilizando o software *FlowJo* versão 9.3.2 (TreeStar). Em experimentos específicos, foram

utilizados inibidores de ROS que foram acrescentados a cultura 30 minutos antes de colocar o estímulo. Foram utilizados difenil iodônio (DPI), inibidor de NADPH na concentração de 5 μ M e rotenona, inibidor do complexo I da CTE mitocondrial na concentração de 10 μ M.

4.9 Detecção de ROS total

Luminol (*Sigma*) (0,5 mM) e carboxi-H₂DCFDA (5 μ M) foram utilizados para a detecção da produção total de ROS respectivamente por luminescência e fluorescência. As culturas foram preparadas com 5x10⁵ PBMC ou 1,25x10⁵ monócitos purificados em citômetro de fluxo (células CD14⁺CD16⁻, CD14⁺CD16⁺, CD14^{lo}CD16⁺) em HBSS, eritrócitos não infectados, Pv-Ret (0,5 Pv-Ret/PBMC) ou PMA/Ionomicina (10 ng/mL e 500 ng/mL). As suspensões celulares foram incubadas por 3 horas a 37°C, enquanto as medidas foram realizadas pelos equipamentos a cada 10 min: Luminol pelo *SpectraMax M5* (unidade relativa de luz, RLU) e carboxi-H₂DCFDA pelo *Synergy H4*, *Biotek* (unidade relativa de fluorescência, RFU).

4.10 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 anti-CD107a (LAMP) conjugado com Brilhante Violeta 450, respectivamente. Os monócitos foram identificados a partir da expressão de CD14 revelada por anticorpo monoclonal conjugado com PE-Cy7. Após purificação de monócitos por FACS *sorting*, os mesmos foram plaqueados em meio HBSS e colocados em cultura durante 3 horas na ausência (iRET-) ou na presença (iRET+) de reticulócitos infectados pelo *P. vivax* marcados com Alexa 488 na proporção 1:1. O anti-LAMP conjugado com Brilhante Violeta 450, o CD14 conjugado com PE-Cy7 e os anti-TLR2, TLR3, TLR4 e TLR9 conjugados com PE foram adicionados no início da cultura. Após a cultura, as células foram lavadas e ressuspensas em 50 μ l de *MitoTracker Green* (10nM) e incubadas durante 15 minutos. Após esse período as células foram lavadas novamente e ressuspensas em 50 μ l de tampão FACS e analisadas no citômetro de fluxo de imagem (*ImageStream^X 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 (iRET-) ou na presença (iRET+) de reticulócitos infectados pelo *P. vivax* marcados com FITC na proporção 1:1. O anti-LAMP conjugado com Brilhante Violeta 450 e o anti-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.

As análises foram efetuadas utilizando o *software* IDEAS v6.1. Para as análises de colocalização foi utilizada a ferramenta do *wizard* “*Colocalization*”

4.11 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 *Kruskal-Wallis* seguido pelo pós-teste de *Dunns*. Dados paramétricos foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de *Tukey*. 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 análise dos dados.

4.12 Comitê de ética

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

5 RESULTADOS

5.1 Pacientes infectados pelo *P. vivax* apresentam alteração no compartimento leucocitário

Para a realização desse trabalho foram recrutados pacientes durante a fase aguda da infecção pelo *P. vivax* e 30-45 dias após o tratamento antimalárico. No hemograma realizado foi observado uma diminuição do número absoluto de leucócitos (Figura 2A) e um aumento na porcentagem de monócitos (Figura 2B) nos pacientes quando comparados a eles mesmos após o tratamento. A fim de confirmar esse aumento de monócitos, PBMC foram marcadas com anticorpo anti-CD14 conjugado com APC, marcador de monócitos, e avaliadas por citometria de fluxo. Confirmando os dados do hemograma, os pacientes infectados pelo *P. vivax* apresentaram maior proporção de células CD14⁺ no sangue periférico durante a fase aguda da doença (Figura 2C e 2D).

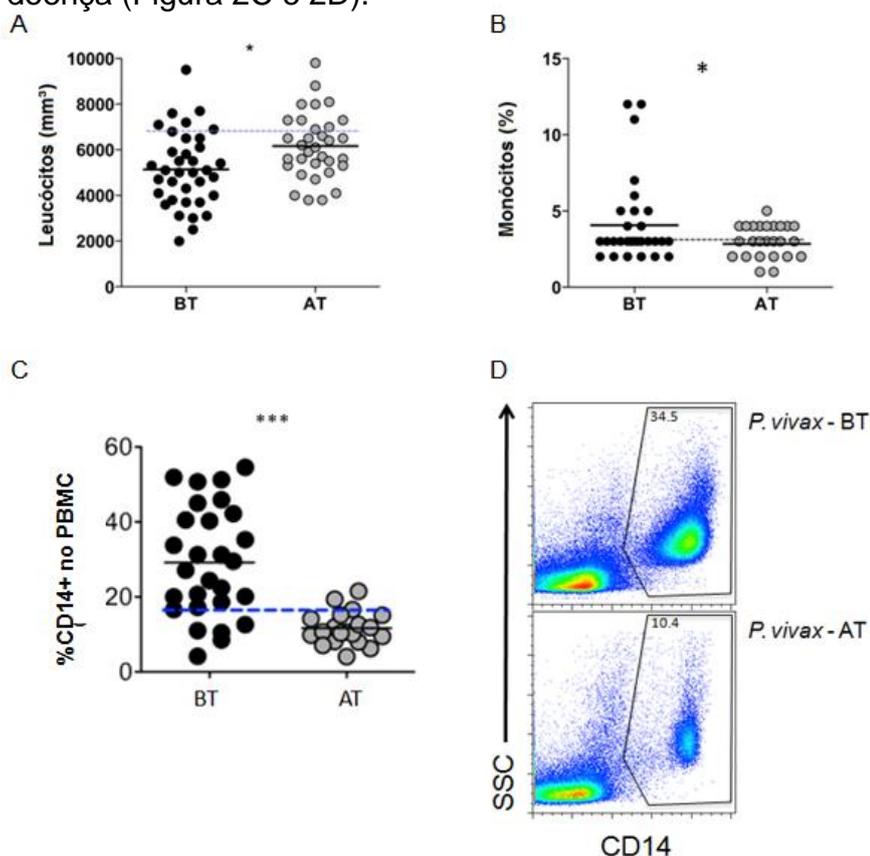


Figura 2. Pacientes infectados pelo *P. vivax* apresentam alterações no compartimento de leucócitos. (A) O número absoluto de leucócitos (mm³) e (B) a frequência de monócitos (%) foram medidos imediatamente antes do tratamento (BT) e após confirmação de cura (AT) através de um hemograma. n=36 * 0.01 ≤ p ≤ 0.05. A linha tracejada é referente aos valores obtidos em indivíduos do grupo controle. (C) A frequência de células CD14⁺ no PBMC foi avaliada por citometria de fluxo imediatamente antes do tratamento (BT) e após confirmação de cura (AT). (D) *Dot plot* representativo de citometria de fluxo. n=28 *** p ≤ 0,001 . SSC (*Side Scatter*) é referente à granuloseidade. Teste estatístico utilizado foi o teste t pareado.

5.2 Caracterização das subpopulações de monócitos circulantes durante a malária vivax

Como mostrado anteriormente (CROS *et al.*, 2010), os monócitos humanos formam uma população heterogênea que pode ser distinguida por citometria de fluxo por meio da expressão dos marcadores de superfície CD14 e CD16. A fim de excluir possíveis contaminações por neutrófilos, apenas células HLA-DR⁺ foram analisadas. Os monócitos CD14⁺CD16⁻ compreendem aproximadamente 80% dos monócitos de sangue periférico e as duas outras subpopulações compõem os 20% restantes (Figura 3).

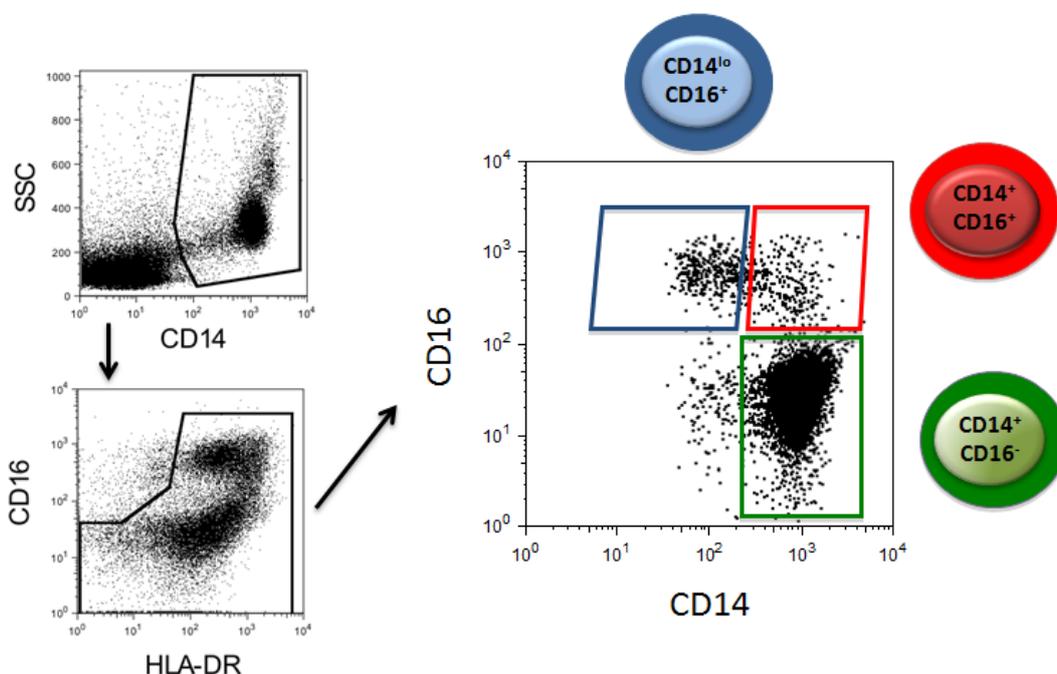


Figura 3. Caracterização das subpopulações de monócitos circulantes em pacientes infectados pelo *P. vivax*. As subpopulações de monócitos foram distinguidas baseando-se na expressão de CD14 e CD16. Em verde estão representados os monócitos clássicos (CD14⁺CD16⁻), em vermelho os monócitos inflamatórios (CD14⁺CD16⁺) e por último, em azul os monócitos patrulhadores (CD14^{lo}CD16⁺).

5.3 Análise da pureza

As subpopulações de monócitos foram purificadas através de FACS *sorting* (FACS-ARIA II) baseando-se na expressão de CD14 e CD16. Essas células foram utilizadas para dar continuidade aos experimentos, portanto fez-se necessário avaliar a pureza das populações. Para tal, foi realizado um pós *sorting* de cada subpopulação após a purificação por citometria de fluxo (Figura 4).

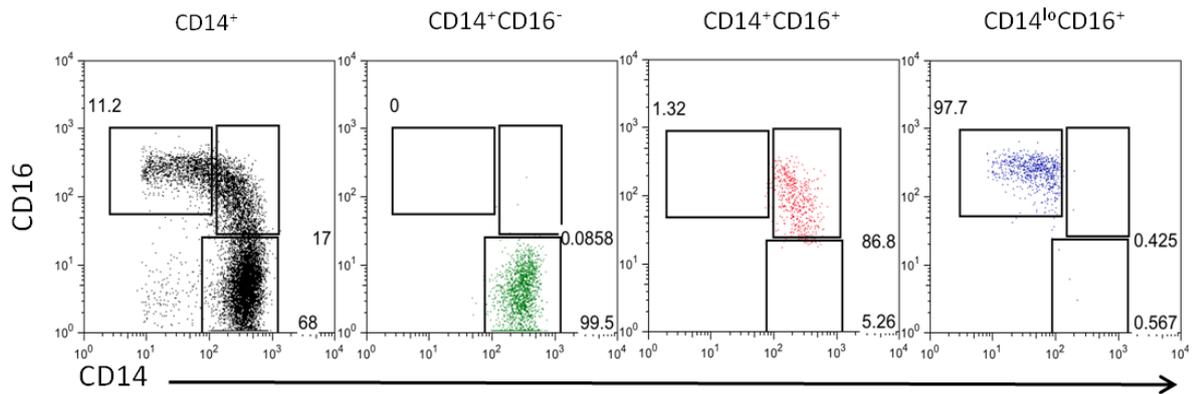


Figura 4. Avaliação da pureza das subpopulações de monócitos. *Dot plot* representativo mostrando as frequências das subpopulações de monócitos após o FACS sorting.

5.4 Monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax* exibem diferenças morfológicas

Foi demonstrado que as subpopulações de monócitos apresentam fenótipos de ativação distintos durante a infecção pelo *P. vivax* (ANTONELLI *et al.*, 2014) e podem ser diferenciados baseado na expressão de moléculas de superfície (CROS *et al.*, 2010). Entretanto, nenhuma análise ultraestrutural foi realizada nessas subpopulações celulares. Assim, foi realizada uma microscopia eletrônica com a finalidade de encontrar possíveis alterações morfológicas entre as subpopulações. Monócitos CD14⁺CD16⁻ e CD14^{high}CD16⁺ de doadores saudáveis (HD) (Figura 5A, painel superior) e de pacientes com malária *vivax* (Figura 5A, painel inferior) apresentaram um número aumentado de mitocôndrias quando comparados aos monócitos patrulhadores. Além disso, todos os monócitos dos pacientes apresentam alterações morfológicas compatíveis com ativação, tais como núcleo eucromático e aumento das projeções celulares e do número de vesículas (Figura 5A).

Uma vez observada essa diferença em relação às mitocôndrias nas subpopulações de monócitos, foi realizada a quantificação da área das mesmas utilizando o *software ImageJ* 1.47K. Os monócitos inflamatórios apresentaram mitocôndrias maiores em comparação aos demais subtipos (Figura 5B). O conteúdo mitocondrial foi avaliado utilizando a sonda *MitoTracker Red CMX-Ros*. A intensidade média de fluorescência (MFI) do *MitoTracker Red*, sonda sensível ao potencial de membrana mitocondrial, foi medida nas subpopulações de monócitos de pacientes infectados com *P. vivax* por citometria de fluxo. Os monócitos CD14⁺CD16⁻ e CD14^{low}CD16⁺ apresentaram reatividade semelhante a sonda,

enquanto os monócitos inflamatórios apresentaram uma reatividade significativamente maior (Figura 5C).

Nossos dados demonstraram que os monócitos $CD14^{high}CD16^{+}$ possuem mitocôndrias maiores e mais ativadas, sugerindo uma atividade metabólica diferenciada durante a infecção causada pelo *P. vivax*.

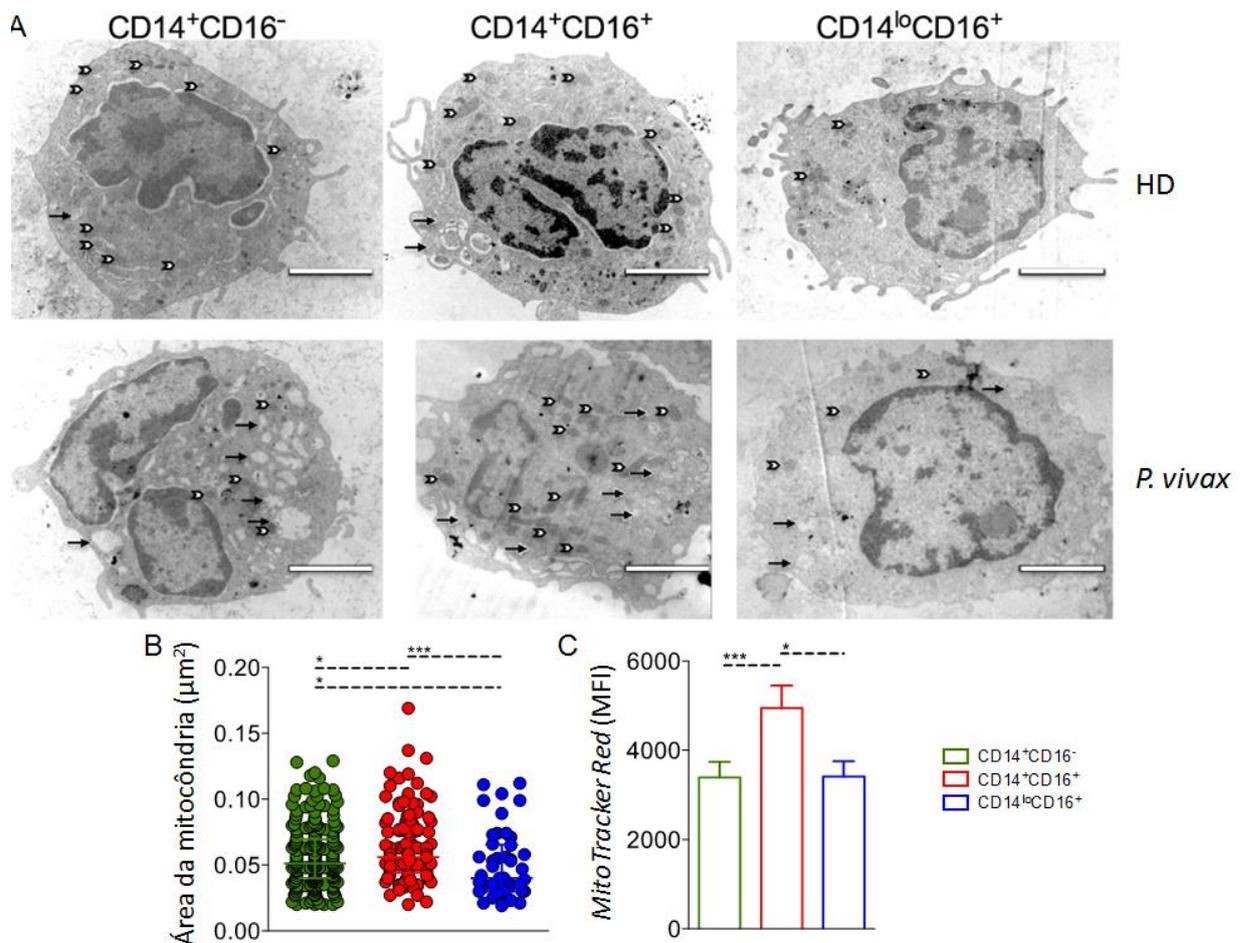


Figura 5. Subpopulações de monócitos circulantes apresentam morfologia e conteúdo mitocondrial distintos. (A) Microscopia eletrônica das subpopulações de monócitos de um doador saudável de área endêmica (HD) (painel superior) e de um paciente infectado pelo *P. vivax* (painel inferior) representativa de uma análise de pelo menos seis células de cada subtipo por paciente (controles n=5, pacientes n=6). As mitocôndrias estão assinaladas pelas setas brancas e vesículas pelas setas pretas. Escala = 2µm. (B) Área da mitocôndria (µm²) de monócitos clássicos (círculos verdes), inflamatórios (círculos vermelhos) e patrulhadores (círculos azuis) de pacientes. Os círculos são relativos a uma mitocôndria. (C) Conteúdo mitocondrial foi avaliado através da reatividade da sonda *MitoTracker Red* nas subpopulações de monócitos de pacientes com malária *vivax*. Teste estatístico utilizado foi o teste t pareado. * 0.01 ≤ p ≤ 0.05 *** p ≤ 0,001.

5.5 Reticulócitos infectados pelo *P. vivax* estimulam a produção de ROS por subpopulações de monócitos

Sabendo que a mitocôndria é responsável por parte da produção de ROS celular (MURPHY, 2009) e que esta se encontra diferentemente presente nas subpopulações de monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax*, o próximo passo foi avaliar a produção de ROS durante a malária *vivax*. Primeiramente, foi realizada a cinética da produção de ROS em PBMC de pacientes infectados (BT) e após o tratamento antimalárico (AT), para tal, as células foram estimuladas com meio ou PMA na presença de luminol e a produção de ROS foi medida por quimioluminescência. As PBMC de pacientes infectados produzem mais ROS quando estimulados com PMA do que as células dos mesmos pacientes após o tratamento, o pico de produção ocorreu com 60 a 70 minutos de estímulo (Figura 6A).

Em seguida, foi avaliada a produção de ROS pelas subpopulações de monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax*. Os monócitos foram estimulados com meio, eritrócitos (RBC) ou reticulócitos infectados (PV-Ret) na presença de Carboxi-H₂DCFDA, a produção de ROS foi medida por fluorescência. É possível observar que os PV-Ret são capazes de estimular a produção de ROS pelas subpopulações de monócitos, principalmente pelos clássicos e inflamatórios (Figura 6B).

Tendo em vista que o ROS celular pode ser proveniente de NADPH oxidase (LAMBETH, 2004) e da mitocôndria (MURPHY, 2009), as possíveis fontes produtoras de ROS durante a malária foram avaliadas. Para tal, PBMC de pacientes infectados pelo *P. vivax* foram incubadas com rotenona, inibidor do complexo I da CTE mitocondrial, ou DPI, inibidor de flavoenzimas. Quando as PBMC do paciente foram estimuladas com PMA foi possível observar um aumento significativo na produção de ROS, porém essa produção foi completamente anulada com o uso de DPI. Entretanto, com o uso da rotenona, ocorreu uma diminuição transiente na produção de ROS (Figura 6C), sugerindo que a mitocôndria contribui para a produção de ROS durante a malária *vivax*.

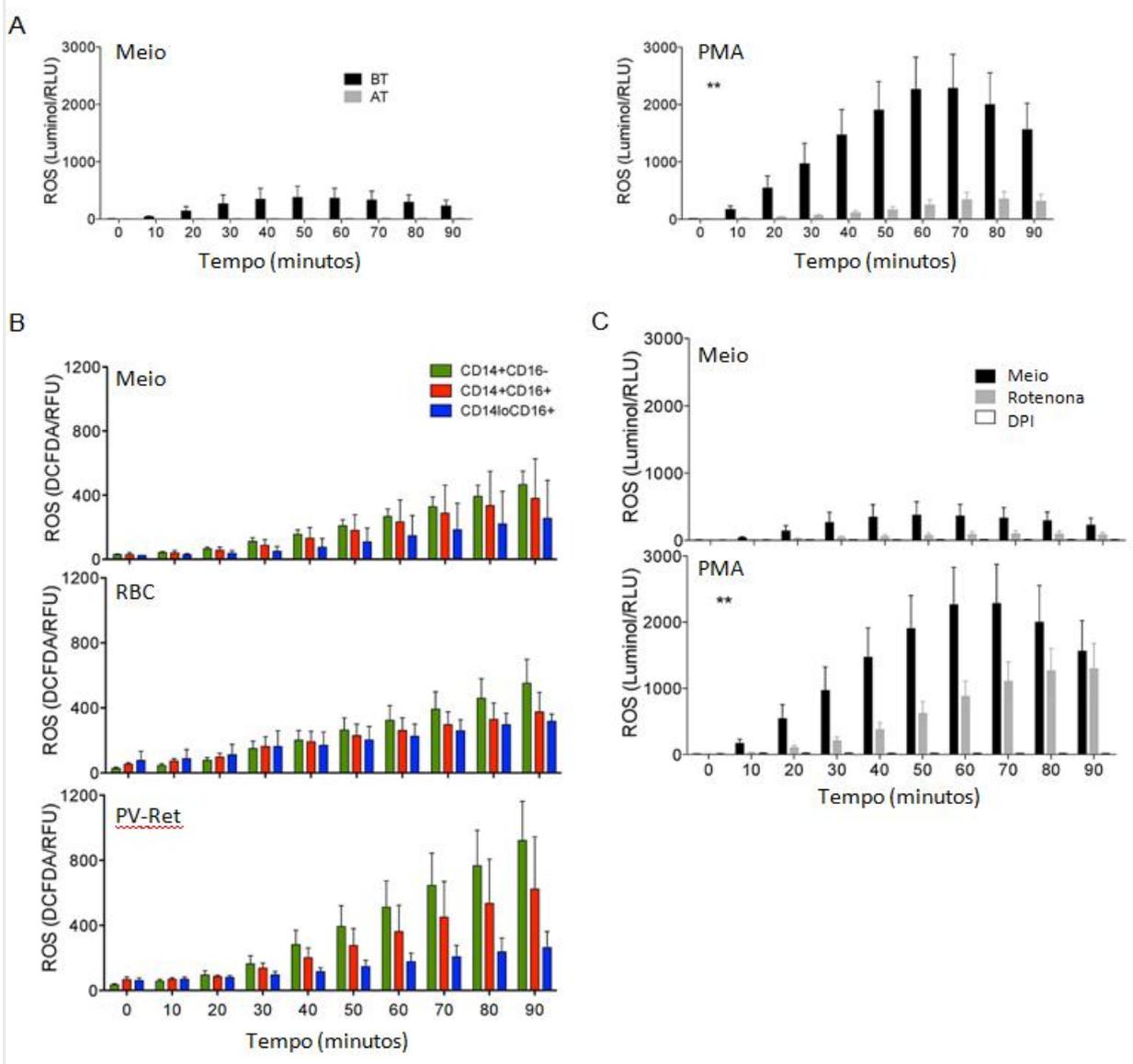


Figura 6. Produção de ROS durante a malária *vivax* (A) Cinética da produção de ROS por PBMC de pacientes infectados pelo *P. vivax* antes (BT) e depois do tratamento (AT) medida por quimiluminescência na presença de luminol (n=5). (B) Cinética da produção de ROS pelas subpopulações de monócitos estimuladas com meio (painel superior), eritrócitos (painel do meio) e reticulócitos infectados (painel inferior) (n=4). (C) Cinética da produção de ROS por PBMC de pacientes infectados pelo *P. vivax* na presença de rotenona, inibidor do complexo I da CTE mitocondrial, ou DPI, inibidor de coenzimas. A análise estatística foi realizada comparando os diferentes tratamentos durante o tempo de cultura. ** 0,05>p>0,01.

5.6 Monócitos CD14⁺CD16⁺ produzem mais ROS mitocondrial que os outros subtipos

Tendo observado que não há diferença significativa entre a produção de ROS total pelas subpopulações de monócitos durante a malária e visto a contribuição da mitocôndria para essa produção, foi avaliada a produção de ROS intracelular e mitocondrial nessas células. Para isso, as subpopulações de monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax* foram incubadas durante 3 horas com reticulócitos

infectados na presença de Carboxi-H₂DCFDA e analisadas por citometria de fluxo. Os monócitos inflamatórios apresentaram uma maior frequência de células produtoras de ROS e maior MFI quando comparado aos demais subtipos (Figura 7A).

Para a análise do ROS mitocondrial, as subpopulações de monócitos foram estimuladas com PV-Ret na presença de *MitoSox*, sonda específica para superóxido com alto tropismo mitocondrial. Novamente, os monócitos inflamatórios apresentaram mais produção de ROS mitocondrial. Em conjunto, esses dados sugerem que os monócitos CD14^{high}CD16⁺ desempenham um importante papel efetor durante a infecção pelo *P. vivax*.

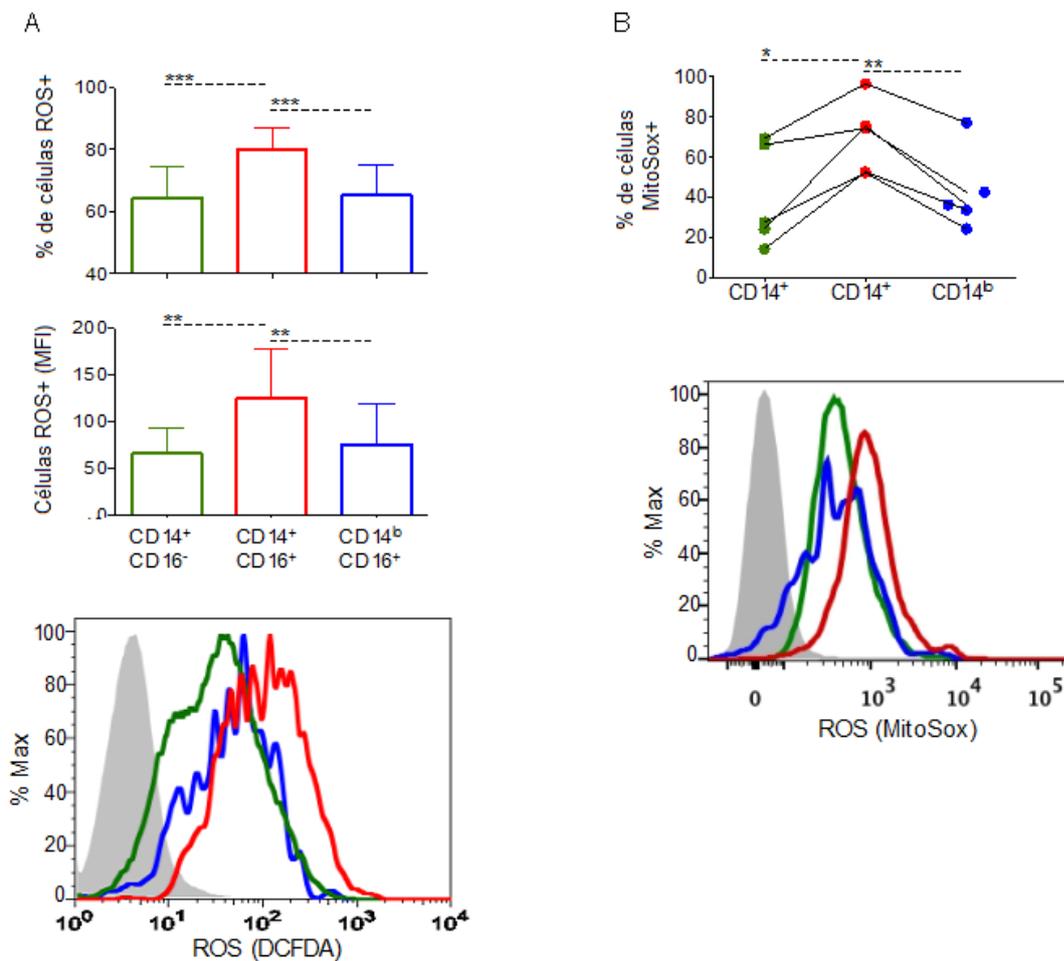


Figura 7. Monócitos inflamatórios produzem mais ROS durante a malária vivax do que os demais subtipos. (A) Frequência de monócitos produtores de ROS intracelular (painel superior) e produção de ROS medida por MFI (painel do meio). Histograma representativo do MFI de Carboxi-H₂DCFDA nas subpopulações de monócitos de pacientes (painel inferior) (n=9). (B) Frequência de monócitos produtores de ROS mitocondrial (painel superior) e histograma representativo da produção de ROS, representada pelo MFI, nas subpopulações de monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax* (n=5). Teste estatístico utilizado foi *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. * 0.01 ≤ p ≤ 0.05 ** 0,05>p>0,01 *** p ≤ 0,001.

5.7 Colocalização entre mitocôndrias e fagossomos em monócitos circulantes de pacientes infectados pelo *P. vivax*

Considerando que ROS são moléculas de vida curta, a colocalização entre a mitocôndria e o alvo de ação de ROS sugere uma maior eficiência em sua atividade. Dessa maneira, foi avaliada a colocalização entre a mitocôndria e o fagossomo em monócitos circulantes que fagocitaram reticulócitos infectados pelo *P. vivax* (iRET+) e que não fagocitaram (iRET-) utilizando citômetro de fluxo de imagem.

As células foram selecionadas para análise considerando o foco (Figura 8A – painel esquerdo) e tamanho (Figura 8A – painel central). Além disso, monócitos foram selecionados através da expressão de CD14 por anticorpo monoclonal conjugado com PE-Cy7 (Figura 8A – painel direito).

Foi possível observar uma maior colocalização entre a mitocôndria (*MitoTracker Green*) e lisossomos (CD107a – LAMP) em monócitos circulantes de pacientes que fagocitaram reticulócitos infectados pelo *P. vivax* (iRET+) em comparação aos monócitos que não fagocitaram (iRET-) (Figura 8B).

Visto o papel da mitocôndria na produção de ROS e a ação do último no controle de parasitos, foi avaliada a colocalização entre ROS mitocondrial (*MitoSox Red*) e o reticulócito infectado pelo *P. vivax* marcado com FITC. Essa colocalização foi observada em monócitos circulantes de pacientes infectados pelo *P. vivax* (Figura 8C), sugerindo um papel para o ROS mitocondrial no controle do plasmódio.

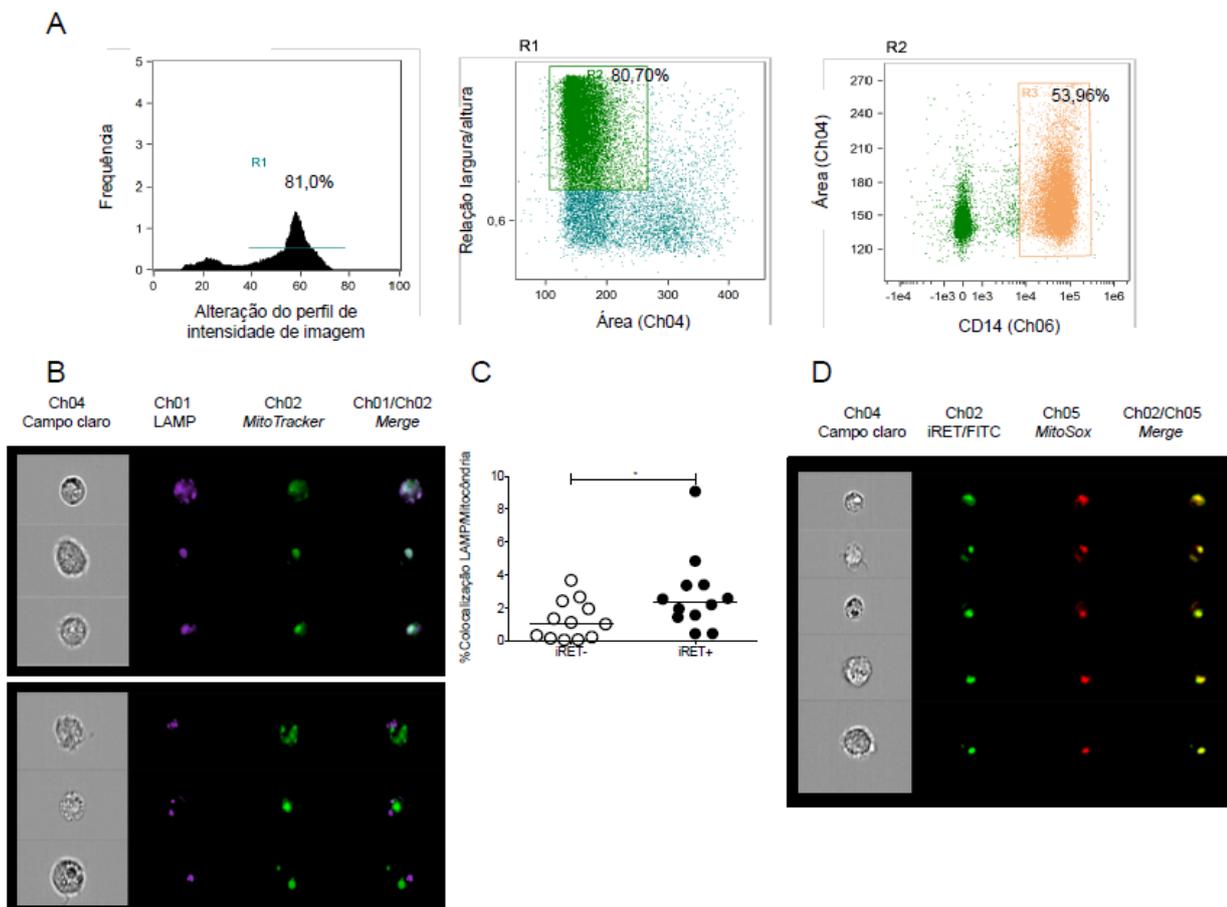


Figura 8. Mitocôndrias migram para o fagossomo em monócitos que fagocitaram Pv-RET. (A) As células foram selecionadas para análise de acordo com o foco (Painel esquerdo), tamanho (painel central) e expressão de CD14 (Painel direito). (B) Imagens representativas da colocalização entre lisossomos (roxo) e mitocôndrias (verde). O painel superior representa amostras com colocalização e o painel inferior representa amostras não colocalizadas. (C) Frequência de colocalização entre o fagossomo (LAMP) e a mitocôndria em monócitos que fagocitaram Pv-Ret (iRET+) e que não fagocitaram (iRET-) n=12. (D) Imagens representativas da colocalização entre iRET conjugado com FITC (FITC) e ROS mitocondrial (vermelho) em monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax* n=5. Teste estatístico utilizado foi teste t pareado * 0.01 ≤ p ≤ 0.05.

5.8 Colocalização entre mitocôndrias, TLRs e reticulócitos infectados pelo *P. vivax* em monócitos circulantes.

Sabendo a importância do ROS mitocondrial na via de sinalização de TLRs, foi avaliada a colocalização de TLR2, TLR3, TLR4 e TLR9 com reticulócitos infectados pelo *P. vivax* e com mitocôndrias utilizando citômetro de fluxo de imagem.

As células foram selecionadas em relação ao foco, tamanho e expressão de CD14 (Figura 8A). Foi possível observar que todos os TLRs analisados apresentaram colocalização com reticulócitos infectados pelo *P. vivax* em monócitos circulantes (Figura 9A), porém é importante ressaltar que não houve diferença estatística na frequência de colocalização entre os TLRs analisados (Figura 9B).

O próximo passo foi avaliar a colocalização dos TLRs com mitocôndrias em monócitos circulantes que fagocitaram reticulócitos infectados pelo *P. vivax* (iRET+)

e que não fagocitaram (iRET-). Foi observada a colocalização dos TLRs analisados com mitocôndrias (Figura 9C). Entretanto, os monócitos que fagocitaram reticulócitos infectados pelo *P. vivax* (iRET+) apresentaram uma maior colocalização entre mitocôndria e TLR2, TLR3 e TLR9 do que os monócitos que não fagocitaram (iRET-) (Figura 9D).

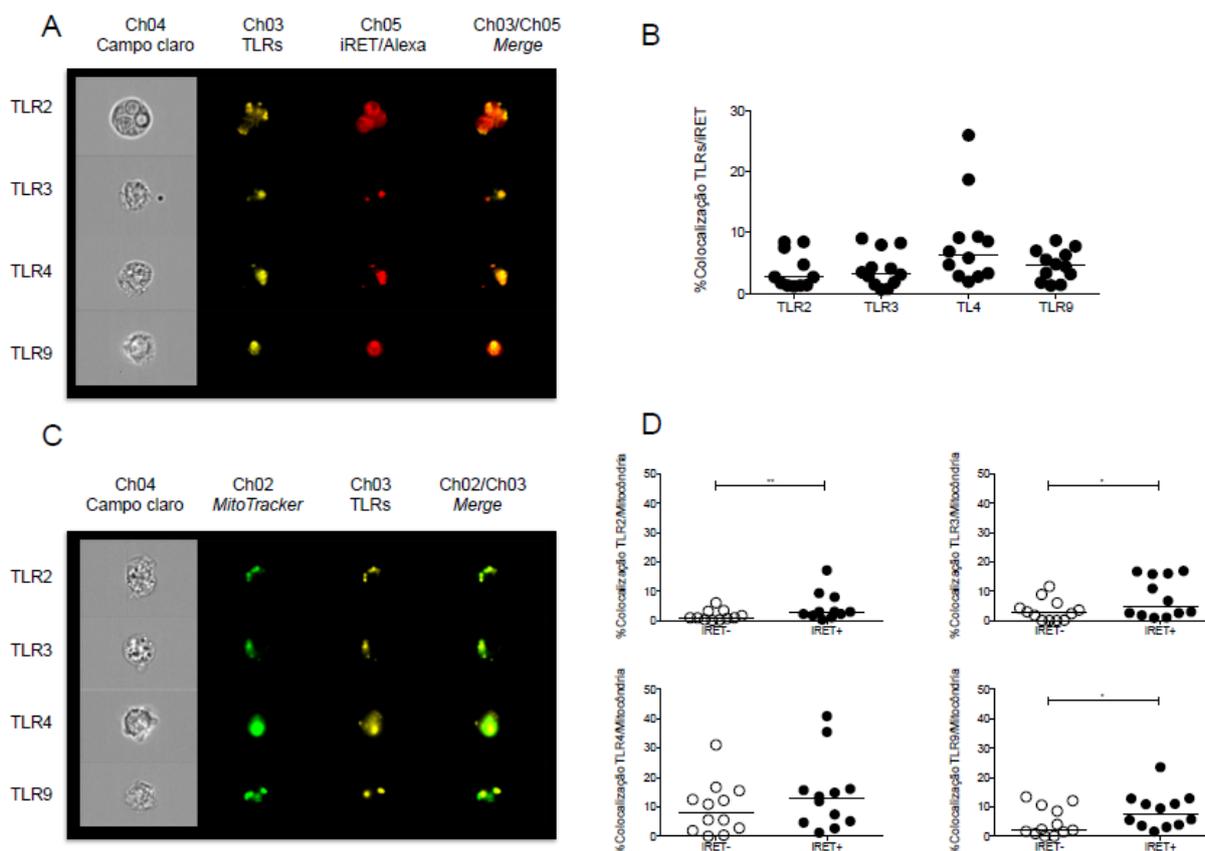


Figura 9. TLRs se colocalizam com reticulócitos infectados pelo *P. vivax* e mitocôndrias em monócitos circulantes. (A) Imagens representativas da colocalização entre TLRs conjugados com PE (amarelo) e reticulócitos infectados pelo *P. vivax* corados com Alexa (vermelho). (B) Frequência de colocalização entre TLRs e Pv-RET em monócitos circulantes de pacientes com malária *vivax* n=12. (C) Imagens representativas da colocalização entre mitocôndria (verde) e TLRs (amarelo) em monócitos circulantes de pacientes infectados pelo *P. vivax* (D) Frequência de colocalização de TLRs e mitocôndria em monócitos que fagocitaram reticulócitos infectados pelo *P. vivax* (iRET+) e que não fagocitaram (iRET-) n=12. Teste estatístico utilizado foi teste t pareado * 0,01 ≤ p ≤ 0,05 ** 0,05 > p > 0,01.

5.9 Monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax* apresentam uma diminuição na transcrição de genes relacionados ao transporte na mitocôndria

Considerando o papel da mitocôndria durante a malária *vivax* e sabendo que a maior parte de suas proteínas é produzida por genes nucleares no citosol celular (ALBERTS *et al.*, 2006), foi avaliado o número de cópias de mRNA dos genes relacionados ao metabolismo mitocondrial por *nanosttring*. Primeiramente, foram analisados genes relacionados ao complexo TOM, que efetua o transporte de metabólitos do citosol para o espaço intermembranas. De maneira geral, os monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax* apresentaram a transcrição do gene *TOMM70A* diminuída em relação aos monócitos de indivíduos saudáveis de área endêmica (Figura 10A). Os demais genes analisados não obtiveram diferença entre todas as subpopulações.

Em seguida, foram avaliados genes relacionados ao complexo TIM, responsável pelo transporte de metabólitos do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial. Todos os genes analisados tiveram sua transcrição gênica diminuída nos monócitos dos pacientes em relação ao dos indivíduos saudáveis, sugerindo uma deficiência desse transporte durante a malária *vivax* (Figura 10B).

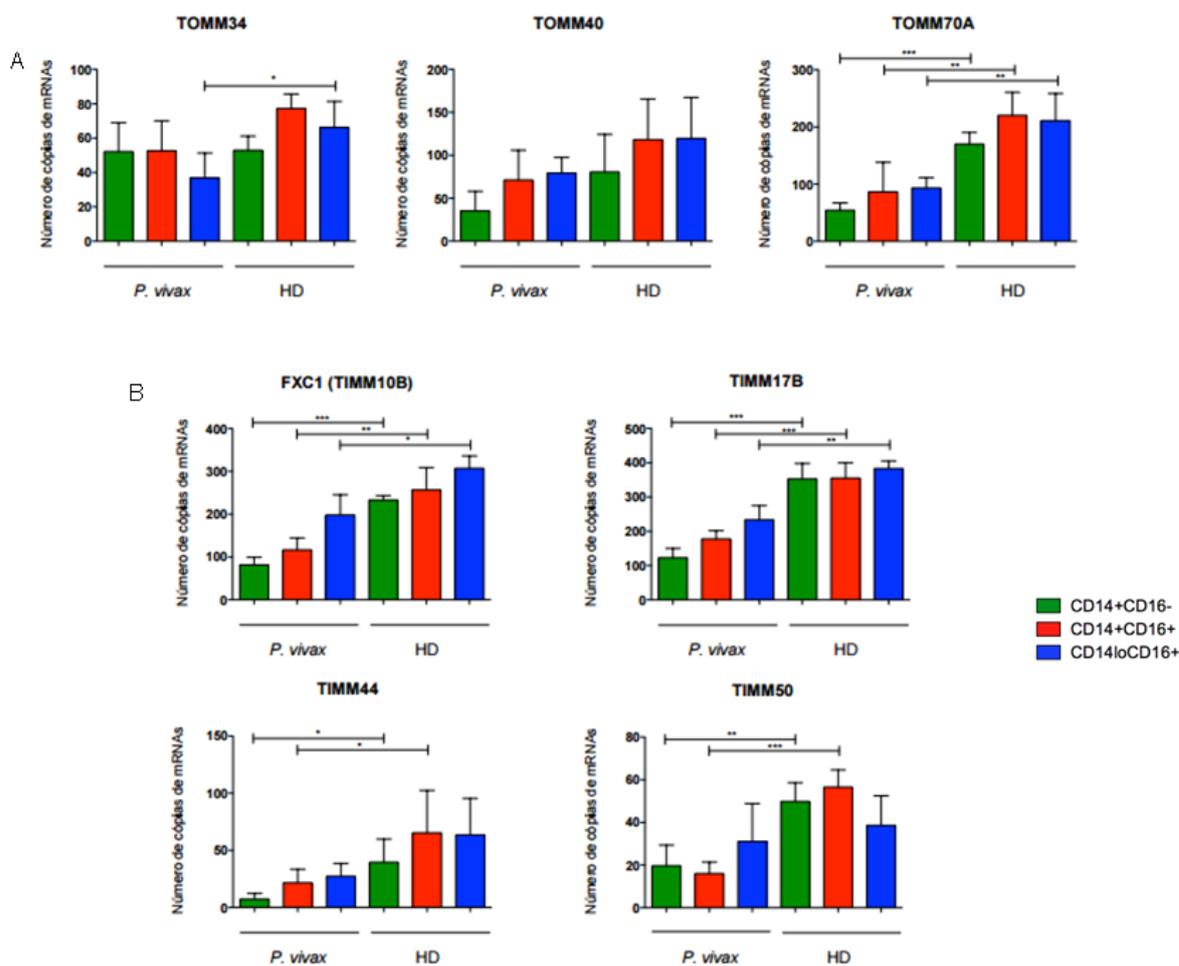


Figura 10. Genes do complexo TIM, mas não TOM, possuem sua transcrição diminuída durante a malária vivax. (A) Número de cópias de mRNA de genes envolvidos na montagem do complexo TOM das subpopulações de monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax* (n=5) e de doadores saudáveis (HD) (n=4). (B) (A) Número de cópias de mRNA de genes envolvidos na montagem do complexo TIM das subpopulações de monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax* (n=5) e de doadores saudáveis (HD) (n=4). Teste estatístico utilizado foi teste t pareado ou Wilcoxon dependendo da distribuição das amostras * 0.01 ≤ p ≤ 0.05 ** 0,05 > p > 0,01 *** p ≤ 0,001.

5.10 Monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax* apresentam uma diminuição na transcrição de genes de enzimas que atuam na mitocôndria

A fim de compreender um pouco melhor o metabolismo mitocondrial durante a malária vivax, foi realizada a análise da transcrição de genes nucleares relacionados à montagem do complexo da enzima citocromo c oxidase e das enzimas antioxidantes SOD1 e SOD2. Ambas as subunidades do complexo da citocromo c oxidase, *COX10* e *COX18*, possuem sua transcrição gênica diminuída nas subpopulações de monócitos durante a malária vivax (Figura 11A).

Interessantemente, os transcritos de *SOD2* encontram-se aumentados durante a infecção malária, enquanto não há diferença na transcrição gênica de

SOD1 (Figura 11B). Sugerindo que o controle antioxidante mitocondrial está aumentado durante a doença, enquanto o citoplasmático não apresenta alterações significativas.

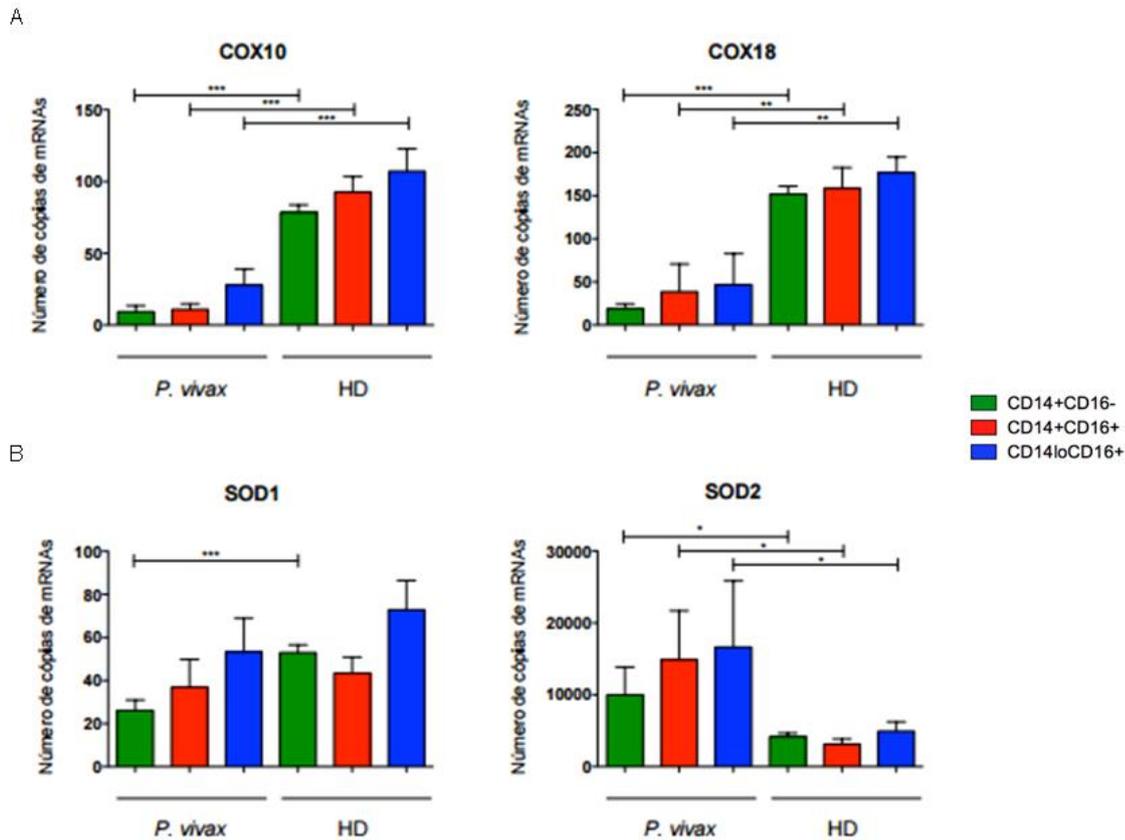


Figura 11. Genes do complexo da citocromo c oxidase possuem a transcrição gênica diminuída durante a malária, enquanto transcritos de *SOD2* estão aumentados. (A) Número de cópias de mRNA de genes envolvidos na montagem do complexo da enzima citocromo c oxidase das subpopulações de monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax* (n=5) e de doadores saudáveis (HD) (n=4). (B) (A) Número de cópias de mRNA de genes envolvidos no controle antioxidante das subpopulações de monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax* (n=5) e de doadores saudáveis (HD) (n=4). Teste estatístico utilizado foi teste t pareado ou Wilcoxon dependendo da distribuição das amostras * 0.01 ≤ p ≤ 0.05 ** 0,05>p>0,01 *** p ≤ 0,001.

6 DISCUSSÃO

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 (SPONNAS *et al.*, 2009; LANGHORNE *et al.*, 2004; STEVENSON; RILEY, 2004). Nesse contexto, os monócitos se sobressaem como importantes células efetoras, uma vez que produzem altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (LEORATTI *et al.*, 2012) e conseguem controlar o parasito (ANTONELLI *et al.*, 2014). O presente trabalho demonstrou que as subpopulações de monócitos encontram-se altamente ativadas e produzem altos níveis de ROS durante a fase aguda da doença, com destaque para os monócitos inflamatórios.

Foi demonstrado que os pacientes infectados pelo *P. vivax* apresentam um quadro de monocitose. E assim como descrito anteriormente (CROS *et al.*, 2010), foi possível observar a presença das três subpopulações de monócitos: CD14⁺CD16⁻, CD14^{high}CD16⁺ e CD14^{low}CD16⁺. De maneira similar ao que foi demonstrado em ratos utilizando o modelo de doença de Chagas (FABRINO *et al.*, 2004), as análises de microscopia eletrônica indicaram alterações morfológicas em todas as subpopulações de monócitos de pacientes compatíveis com ativação celular, tais como núcleo eucromático, aumento das projeções celulares e do número de vacúolos (Figura 5A). Esses resultados condizem com o papel efetor dos monócitos durante a malária *vivax* (LEORATTI *et al.*, 2012; ANTONELLI *et al.*, 2014).

Interessantemente, foram encontradas mitocôndrias maiores e mais numerosas na subpopulação de monócitos inflamatórios. Devido ao papel central da mitocôndria no metabolismo celular (WEINBERG; SENA; CHANDEL, 2015) e na regulação da resposta imune (HASCHEMI *et al.*, 2012; HUANG *et al.*, 2014; JIN *et al.*, 2014; CHANDEL *et al.*, 2000) foi investigado o papel da mesma durante a malária *vivax*. Primeiramente, foi utilizada a sonda *MitoTracker Red* que cora mitocôndrias em células vivas, sendo sua acumulação dependente do potencial de membrana mitocondrial. Todas as subpopulações apresentaram reatividade com a sonda, porém a subpopulação CD14^{high}CD16⁺ apresentou uma reatividade significativamente maior em comparação aos demais subtipos. Esses resultados condizem com a presença de mitocôndrias maiores e mais numerosas nessa

subpopulação. Em conjunto, esses dados sugerem que os monócitos inflamatórios possuem uma atividade metabólica diferenciada durante a infecção pelo *P. vivax*.

Sabendo que a mitocôndria é uma importante fonte de ROS intracelular na maioria das células de mamíferos (MURPHY, 2009), foi avaliada a produção de ROS durante a malária *vivax*. Inicialmente, foi medida a capacidade de PBMC de pacientes durante a fase aguda da doença e após o tratamento em produzir ROS. As células de pacientes infectados produziram um nível significativamente maior de ROS do que as células dos mesmos indivíduos depois do tratamento após estímulo com PMA. Em seguida, foi avaliado se reticulócitos infectados pelo *P. vivax* são capazes de estimular a produção de ROS pelas subpopulações de monócitos e se a mitocôndria participa dessa produção. Os resultados demonstram que a malária *vivax* induz a produção de ROS por subpopulações de monócitos, principalmente dos clássicos e inflamatórios e que a mitocôndria é pelo menos em parte responsável por essa produção. Esses resultados condizem com dados da literatura que mostram que a malária induz uma forte resposta imune inata (SPONNAS *et al.*, 2009; LANGHORNE *et al.*, 2004; VON DER WEID; HONARVAR; LANGHORNE, 1996) e que as subpopulações de monócitos apresentam um perfil altamente inflamatório durante a fase aguda da doença, principalmente os monócitos CD14⁺CD16⁻ e CD14^{high}CD16⁺ (ANTONELLI *et al.*, 2014).

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 (DEY *et al.*, 2009; (TRIPATHY; ROY, 2015). O papel mais bem conhecido de ROS em células do sistema imune é na morte de parasitos por meio da explosão oxidativa mediada por NOX em fagócitos. Entretanto, um estudo em camundongos demonstrou que a ausência de NADPH oxidase não ocasionou nenhuma diferença na parasitemia em animais infectados por distintas espécies de plasmódio, sugerindo que ROS derivadas de NADPH oxidase não são importantes para o controle do parasito (POTTER *et al.*, 2005).

No entanto, trabalhos vêm demonstrando o papel do ROS mitocondrial no *killing* de microrganismos. 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 invertido com o uso de antioxidantes (ARSENIJEVIC *et al.*, 2000). 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* (WEST *et al.*, 2011).

Levando em consideração esses estudos, foi avaliada a produção de ROS mitocondrial e intracelular total nas subpopulações de monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax*. Os monócitos CD14^{high}CD16⁺ apresentaram produção de ROS mitocondrial e intracelular total aumentada em comparação aos demais subtipos. Em conjunto, esses dados sugerem que os monócitos inflamatórios apresentam uma atividade metabólica diferenciada durante a malária *vivax*. Esses resultados condizem com a maior reatividade desta 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 (SENA; CHANDEL, 2012).

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 aumenta sua eficiência funcional (ST-PIERRE *et al.*, 2006). Sendo assim, foi avaliada a colocalização entre a mitocôndria e o lisossomo utilizando o citômetro de fluxo de imagem. Foi possível observar que monócitos circulantes que fagocitaram reticulócitos infectados pelo *P. vivax* apresentaram uma maior frequência de colocalização entre a mitocôndria e o fagossomo do que os monócitos que não fagocitaram. Esses resultados condizem com dados da literatura que demonstram a migração de mitocôndrias para áreas contendo PAMPs de parasitos (WEST *et al.*, 2009). É importante ressaltar que além de migrar para o lisossomo, a mitocôndria está produzindo ROS mitocondrial, indicando um papel do mesmo no controle do parasito. Interessantemente, foi demonstrado que os monócitos inflamatórios fagocitam e controlam melhor o *P. vivax* do que os demais subtipos (ANTONELLI *et al.*, 2014), porém o mecanismo pelo qual isso acontece ainda não tinha sido elucidado. O presente trabalho demonstrou que essa subpopulação de monócitos produz mais ROS mitocondrial do que as demais e considerando o papel desse mediador inflamatório do controle de parasitos, pode ser uma possível explicação para esse controle diferenciado do parasito.

Os receptores da imunidade inata desempenham um papel essencial na resposta imune contra parasitos, sendo responsáveis pelo reconhecimento de moléculas presentes nos microrganismos (COBAN *et al.*, 2007). Devido a essa grande importância, um grande esforço vem sendo realizado com o intuito de desvendar os PAMPs do plasmódio e seus receptores do sistema imune inato. Nesse contexto, foi demonstrado que âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) são capazes de ativar heterodímeros de TLR1-TLR2, TLR2-TLR6 e TLR4 e a hemozoína carregando DNA do parasito consegue ativar TLR9 (GAZZINELLI *et al.*, 2014).

O presente trabalho demonstrou que há colocalização entre TLR2, TLR3, TLR4 e TLR9 e reticulócitos infectados pelo *P. vivax* em monócitos circulantes de pacientes, sugerindo o envolvimento desses receptores na resposta imune do monócito contra o plasmódio. É importante destacar que não existem trabalhos demonstrando o papel de TLR3 na malária humana.

West e colaboradores (2009) demonstraram que a ativação de TLRs de superfície ocasiona um aumento na produção de ROS mitocondrial. Sendo assim, foi avaliada a colocalização entre TLR2, TLR3, TLR4 e TLR9 e mitocôndrias em monócitos circulantes que fagocitaram reticulócitos infectados (iRET+) e que não fagocitaram (iRET-). Foi demonstrado que há uma maior colocalização entre TLR2, TLR3 e TLR9 com mitocôndrias em monócitos que fagocitaram do que nos que não fagocitaram, sugerindo a participação desses receptores na produção de ROS mitocondrial por monócitos durante a malária *vivax*.

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 (WEINBERG; SENA; CHANDEL, 2015). Nesse contexto, é de suma importância entender o funcionamento da mitocôndria em células do sistema imune durante a malária *vivax*.

Embora possua seu próprio material genético, o DNA mitocondrial, o mesmo codifica uma pequena porcentagem das proteínas mitocondriais, sendo essas principalmente enzimas que atuam no CAC e na CTE. Dessa maneira, a grande maioria das proteínas encontradas nas mitocôndrias é derivada do DNA genômico e traduzida no citosol celular (NEUPERT; HERRMANN, 2007). 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 por proteínas do complexo TOM, responsável por reconhecer as proteínas precursoras no citosol e transportá-las através dos poros da membrana externa da mitocôndria (VARABYOVA; STOJANOVSKI; CHACINSKA, 2013). 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, exceto pelo gene *TOMM70A*, cuja proteína codificada funciona como um receptor de reconhecimento de proteínas precursoras no citosol celular. Entretanto, é importante ressaltar que o receptor Tom20 sobrepõe as funções de Tom70 (VARABYOVA; STOJANOVSKI; CHACINSKA, 2013), sendo que o primeiro não foi avaliado no presente trabalho. Esses resultados sugerem que o transporte pela membrana mitocondrial externa funciona normalmente em monócitos durante a infecção pelo *P. vivax*.

A segunda etapa de transporte de proteínas para a mitocôndria é efetuada por proteínas do complexo TIM, responsável pelo transporte de proteínas do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial (NEUPERT; HERRMANN, 2007). Todos os genes analisados apresentaram um número de transcritos diminuídos em monócitos de pacientes em comparação aos monócitos de indivíduos saudáveis (Figura 9B), sugerindo que esse transporte encontra-se alterado durante a malária. Na matriz mitocondrial encontram-se várias moléculas, incluindo todas as enzimas necessárias para a realização do CAC (VARABYOVA; STOJANOVSKI; CHACINSKA, 2013), sendo assim esses resultados sugerem que há uma diminuição na atividade do CAC. Condizente com esse resultado, foi demonstrado que também ocorre uma diminuição no número de transcritos de genes relacionados a montagem do complexo da citocromo c oxidase, indicando que a atividade do complexo IV da CTE, último passo para a produção de ATP, também encontra-se diminuída em monócitos durante a malária *vivax*.

Em conjunto esses resultados sugerem que as mitocôndrias dos monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax* não estão programadas para produzir altos níveis de ATP, uma vez que a transcrição de proteínas do CAC quanto da CTE estão diminuídas. Esses resultados estão de acordo com a ativação dessas células durante a resposta imunológica (LEORATTI *et al.*, 2012; ANTONELLI *et al.*, 2014),

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 (WEINBERG; SENA; CHANDEL, 2015), incluindo a produção de ROS.

Nesse contexto, Murphy (2009) descreveu três modos de operação mitocondrial que estão relacionados com a produção de superóxido. No modo 1, há uma grande quantidade de NADH que ocasionará uma alta produção de superóxido pelo complexo I da CTE, independente do potencial de membrana mitocondrial. No modo 2, também ocorre uma grande produção de superóxido pelo complexo I, mas a mesma é dependente do potencial de membrana mitocondrial. Durante esses dois modos de operação, a produção de ATP encontra-se diminuída. No modo 3, no qual a mitocôndria desempenha sua função normal, a taxa de respiração celular é relativamente alta em comparação aos modos anteriores, ocasionando a produção de altos níveis de ATP e baixos níveis de ROS mitocondrial pelos complexos I e III. Nesse contexto, os resultados do presente trabalho sugerem que as mitocôndrias dos monócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax* estão operando no modo 1 ou 2, produzindo mais ROS do que ATP, com um destaque para a população de monócitos inflamatórios.

Devido à importância de ROS na sinalização celular, 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 (SENA; CHANDEL, 2012). As enzimas superóxido dismutase se destacam nesse cenário, uma vez que catalisam a dismutação do superóxido em oxigênio a peróxido de hidrogênio, atuando, portanto na defesa ao estresse oxidativo (NOJIMA *et al.*, 1988).

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 (NOJIMA *et al.*, 1988). Esses resultados sugerem que o controle antioxidante mitocondrial encontra-se aumentado em monócitos de

paciente, o que condiz com a maior produção de ROS mitocondrial durante a malária *vivax*. É interessante notar que o controle antioxidante que ocorre nos monócitos inflamatórios é o mesmo que nas demais subpopulações, mesmo que esse seja o maior produtor de ROS mitocondrial. Além disso, esse resultado destaca a importância da colocalização do sítio produtor de ROS e seu foco de ação.

7 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que a malária induz uma alta produção de espécies reativas de oxigênio, com destaque para as subpopulações de monócitos. Além disso, os dados sugerem que durante a malária *vivax*, as mitocôndrias dos monócitos migram para o fagolisossomo contendo o plasmódio e estão programadas para atuar de maneira a produzir baixos níveis de ATP e altos níveis de ROS mitocondrial. É interessante destacar que os monócitos CD14^{high}CD16⁺ de pacientes infectados apresentaram maior produção de ROS mitocondrial do que os demais subtipos, sugerindo uma atividade metabólica diferenciada durante a infecção pelo *P. vivax*.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. *et al.*, **Biologia Molecular da Célula**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, p.767-781, 2004.
- ALEXANDRE, M.A. *et al.* Severe Plasmodium vivax malaria, Brazilian Amazon. **Emerging infectious diseases**, v. 16, n. 10, p. 1611–1614, out. 2010.
- AMINO R. *et al.* Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. **Nat Med**. 12: 220–224. 2006.
- ANDRADE, B.B. *et al.* Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance. **Malaria Journal**, v. 9, p. 13, 2010.
- ANTONELLI, L.R. *et al.* The CD14⁺CD16⁺ inflammatory monocyte subset displays increased mitochondrial activity and effector function during acute *Plasmodium vivax* malaria. **PLoS Pathog**. 10(9), 2014.
- ARSENIJEVIC, D. *et al.* Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. **Nat. Genet**. 26, 435-439, 2000.
- BELGE K.U. *et al.* The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. **J Immunol**. Apr 1;168(7):3536-42, 2002.
- BOUSEMA, T.; DRAKELEY, C. Epidemiology and infectivity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax gametocytes in relation to malaria control and elimination. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 2, p. 377–410, 1 abr. 2011.
- CASTELLI, F. *et al.* Malaria in migrants. **Parassitologia**. 41(1-3):261-5, 1999.
- CEH-PAVIA, E. *et al.* Folding and biogenesis of mitochondrial small TIM proteins. **Int J Mol Sci**. 14(8):16685-705, 2013.
- CHANDEL, N.S. *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. **Proc. Natl. Acad. Sci**. 11715-11720, 1998.
- CHANDEL, N.S. *et al.* Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. **J. Immunol**. 165, 1013-1021, 2000.
- CLARK, I.A. *et al.* Pathogenesis of malaria and clinically similar conditions. **Clin Microbiol Rev**. 17(3):509–539, 2004.
- COBAN, C. *et al.* Manipulation of host innate immune responses by the malaria parasite. **Trends Microbiol**. 15:271–278, 2007.
- COSTA, F.T.M.F. *et al.* On the pathogenesis of Plasmodium vivax malaria: Perspectives from the Brazilian field. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 12, p. 1099–1105, 1 nov. 2012

CROPTON, P.D. *et al.* Malaria Immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease. **Annu Rev Immunol.** 32:157-87, 2014.

CROS J *et al.* Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. **Immunity.** 24;33(3):375-86, 2010.

DEY, S. *et al.* Malarial infection develops mitochondrial pathology and mitochondrial oxidate stress to promote hepatocyte apoptosis. **Free Radic Biol Med.** 15;46(2)271-81, 2009.

ECHTAY, K.S. *et al.* Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side. Studies using targeted antioxidants. **J. Biol. Chem.** 277, 47129-47135, 2002.

ERECINSKA, M; SILVER, I.A. Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. **Respir Physiol.** 128(3):263-76, 2001.

FABRINO, D.L. *et al.* Peripheral blood monocytes show morphological pattern of activation and decreased nitric oxide production during acute Chagas' disease in rats. **Nitric Oxide.** 11(2): 166-74, 2004.

FAOU, P; HOOGENRAAD, N.J. TOM34: A cytosolic cochaperone of the Hsp90/Hsp70 protein complex involved in mitochondrial protein import. **Biochim Biophys Acta.** 1823(2):348-57, 2012.

FINKEL, T. Oxygen radicals and signaling. **Curr. Opin. Cell Biol.** 10, 248-253, 1998.

FRANKLIN, B.S. *et al.* Therapeutical targeting of nucleic acid-sensing Toll-like receptors prevents experimental cerebral malaria. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 108:3689–3694, 2011.

GAISNE, M; BONNEFOY, N. The COX18 gene involved in mitochondrial biogenesis, is functionally conserved and tightly regulated in humans and fission yeast. **FEMS Yeast Rev.** 6(6):869-82, 2006.

GARABEDIAN, M. *et al.* Generating a knockdown transgene against *Drosophila* heterochromatic TIM17B gene encoding mitochondrial translocase subunit, **PLoS One**, 6(10), 2011.

GAZZINELLI, R.T. *et al.* Innate sensing of malaria parasites. **Nat. Rev. Immunol.** 14(11): 744-57, 2014.

GEISS, G.K.G. *et al.* Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. **Nature Biotechnology**, 26(3), 317–325, 2008.

GONÇALVES, R. *et al.* Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of Leishmania major infection. **J. Exp. Med.** 208: 1253–1265, 2011.

GOPALAKRISHNAN, A.M; KUMAR, N. Antimalarial action of artesunate involves DNA damage mediated by reactive oxygen species. **Antimicrob Agents Chemother.** 59(1):317-25, 2015.

GUERMONPREZ P. *et al.*, Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.** **20**, 621–667, 2002.

HALL, N.N. *et al.* A comprehensive survey of the Plasmodium life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. **Science**, v. 307, n. 5706, p. 82–86, 7 jan. 2005.

HANSEN, D.S. *et al.* The role of leukocytes bearing natural killer complex receptors and killer immunoglobulin-like receptors in the immunology of malaria. **Curr Opin Immunol.** 19(4):416-23, 2007.

HASCHEMI, A. *et al.* The sedoheptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. **Cell Metab.** 15, 813-826, 2012.

HUANG, S.C. *et al.* Cellintrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. **Nat. Immunol.** 2014.

JELINEK, T. *et al.* Imported falciparum malaria in Europe: sentinel surveillance data from the European network on surveillance of imported infectious diseases. **Clin. Infect. Dis.** 34(9), 572-576, 2002.

JIN, Z. *et al.* Mitochondrial complex I activity suppresses inflammation and enhances bone resorption by shifting macrophage-osteoclast polarization. **Cell Metab.** 20, 483-498, 2014.

KATSURAGAWA, T.H. *et al.* The dynamics of transmission and spatial distribution of malaria in riverside areas of Porto Velho, Rondônia, in the Amazon region of Brazil. **PLoS ONE**, v. 5, n. 2, p. e9245, 2010.

KAWAI, A. *et al.* Loss of mitochondrial Hsp70 functions causes aggregation of mitochondria in yeast cells. **J Cell Sci**, 2001.

KEBAIER C. *et al.* Kinetics of Mosquito-Injected Plasmodium Sporozoites in Mice: Fewer Sporozoites Are Injected into Sporozoite-Immunized Mice. **PLoS Pathog**, 2009.

LACERDA, M.V.G. *et al.* Understanding the clinical spectrum of complicated Plasmodium vivax malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. **Malaria journal**, 11:12, 2012

LAMBETH, J.D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nat Rev Immunol.** 4(3):181-9, 2004.

LANGHORNE, J. *et al* Dendritic cells, pro-inflammatory responses, and antigen presentation in a rodent malaria infection. **Immunol Rev.** 201(1):35-47, 2004.

LEORATTI, F.M. *et al.* Neutrophil paralysis in *Plasmodium vivax* malaria. **PLoS Negl Trop Dis.** 6(6), 2012.

LOIOLA, C.C. *et al.* Malaria control in Brazil: 1965 to 2001. **Rev Panam Salud Publica.** 11:235–44, 2002.

- LYKE, B.R. *et al.* Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1 β), 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.** 72:5630–37, 2004.
- MAILLOUX, R.J; HARPER, M.E. Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. **Free Radic. Biol. Med.** 51, 1106-1115, 2011.
- MARSH, K; KINYANJUI, S. Immune effector mechanisms in malaria. **Parasite Immunol.** 28(1-2):51-60, 2006.
- MATTEELLI, A. *et al.* Epidemiological features and case management practices of imported malaria in northern Italy 1991-1995. **Trop. Med. Int. Health.** 4(10), 653-657, 1999.
- MENARD, R. *et al.* Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. **Nat Rev Microbiol.** 11, 701-712, 2013.
- MILLER, L.H. *et al.* The pathogenic basis of malaria. **Nature.** 415:673–679, 2002.
- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de diagnóstico laboratorial da malária** – Brasília : Ministério da Saúde, 2014.
- MORGENSTERN, D.E. *et al.* 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(2):207-18, 1997.
- MUELLER I. *et al.* Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. **Lancet Infect Dis** 9: 555–566, 2009.
- MUELLER, I. *et al.* Natural acquisition of immunity to *Plasmodium vivax*: epidemiological observations and potential targets. **Adv. Parasitol.** 81:77/131, 2013.
- MURPHY, M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochem J.** 417(1):1-13, 2009.
- NEUPERT, W; HERRMANN, J.M. Translocation of proteins into mitochondria. **Annu Rev Biochem.** 76:723-49, 2007.
- NOJIMA, Y. *et al.* Superoxide dismutases, SOD1 and SOD2, play a distinct role in the fat body during pupation in silkworm *Bombyx mori*. **PLoS One.** 10(2), 2015.
- OLIVEIRA-FERREIRA, J. *et al.* Malaria in Brazil: an overview. **Malar J** 9: 115., 2010
- PORCHERIE, A. *et al.* Critical role of the neutrophil-associated high-affinity receptor for IgE in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. **J Exp Med.** 208(11):2225-36, 2011.

- POTTER, S.M. *et al.* Phagocyte-derived reactive oxygen species do not influence the progression of murine blood-stage malaria infections. **Infect Immun.** 73(8):4941-7, 2005.
- RHEE, S.G. *et al.* Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. **Sci. STKE**, 2000.
- RIZZUTO, R. *et al.* Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 13, 566-578, 2012.
- SCHOFIELD, L; GRAU, G.E. Immunological processes in malaria pathogenesis. **Nat Rev Immunol** 5: 722–735, 2005.
- SCHULZ, C. *et al.* TIM50's presequence receptor domain is essential for signal driven transport across the TIM23 complex. **J Cell Biol.** 195(4):643-56, 2011.
- SENA, L.A; CHANDEL, N.S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. **Mol Cell.** 26:48(2)158-67, 2012.
- SERBINA, N.V. *et al.* Distinct responses of human monocyte subsets to *Aspergillus fumigatus* conidia. **J Immunol.** 15;183(4):2678-87, 2009.
- SHEEL, M; ENGWERDA, C.R. The diverse roles of monocytes in inflammation caused by protozoan parasitic diseases. **Trends Parasitol.** 28(10):408-16, 2012.
- SHILON, M.U. *et al.* Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. **Immunity.** 10(1):29-38, 1999.
- SINGH, B. *et al.* A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. **Lancet**, v. 363, n. 9414, p. 8–8, 27 mar. 2004.
- SKRZECZYNSKA-MONCZNIK J. *et al.* Peripheral blood CD14^{high}CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. **Scand J Immunol.** 67(2):152-9, 2008.
- SPONAAS, A.M. *et al.* Migrating monocytes recruited to the spleen play an important role in control of blood stage malaria. **Blood** 114: 5522–5531, 2009.
- STEVENSON, M.M; RILEY, E.M. Innate immunity to malaria. **Nat Rev Immunol** 4: 169–180, 2004.
- ST-PIERRE, J. *et al.* Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. **Cell.** 127, 397-408, 2006.
- STRUIK, S.S; RILEY, E.M. Does malaria suffer from lack of memory? **Immunol. Rev.** 201, 268-290, 2004.
- STURM, A. *et al.* Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, 313:1287–1290, 2006.
- STURM, A. *et al.* Alteration of the parasite plasma membrane and the parasitophorous vacuole membrane during exo-erythrocytic development of malaria parasites. **Protist.** 160, 51-63, 2009.

TAKEUCHI, O; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**. 140, 805-820, 2010.

TAUIL, P.L. Perspectives of vector borne diseases control in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**. 39(3): 275-277, 2006.

TRIPATHY, S; ROY, S. REDOX sensing and signaling by malaria parasite in vertebrate host. **J Basic Microbiol**. 55(9): 1053-1063, 2015.

URBAN, B.C; STEVENSON, M.M. Early interactions between blood-stage *Plasmodium* parasites and the immune system. **Curr. Top. Microbiol. Immunol**. 297:25-70, 2005.

VARABYOVA, A. *et al.* Mitochondrial protein homeostasis. **IUBMB Life**. 65(3):191-201, 2013.

VON DER WEID T. *et al.* Gene-targeted mice lacking B cells are unable to eliminate a blood stage malaria infection. **J Immunol** 156: 2510–2516, 1996.

WALTHER, M. *et al.* Innate immune responses to human malaria: heterogeneous cytokine responses to blood-stage *Plasmodium falciparum* correlate with parasitological and clinical outcomes. **J. Immunol**. 177:5736–45, 2006.

WEINBERG, S.E. *et al.* Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity. **Immunity**. 17;42(3):406-17, 2015.

WEST, A.P. *et al.* TLR signaling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. **Nature**. 28;472(7344):476-80, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2014**. Tradução. [s.l: s.n.].