

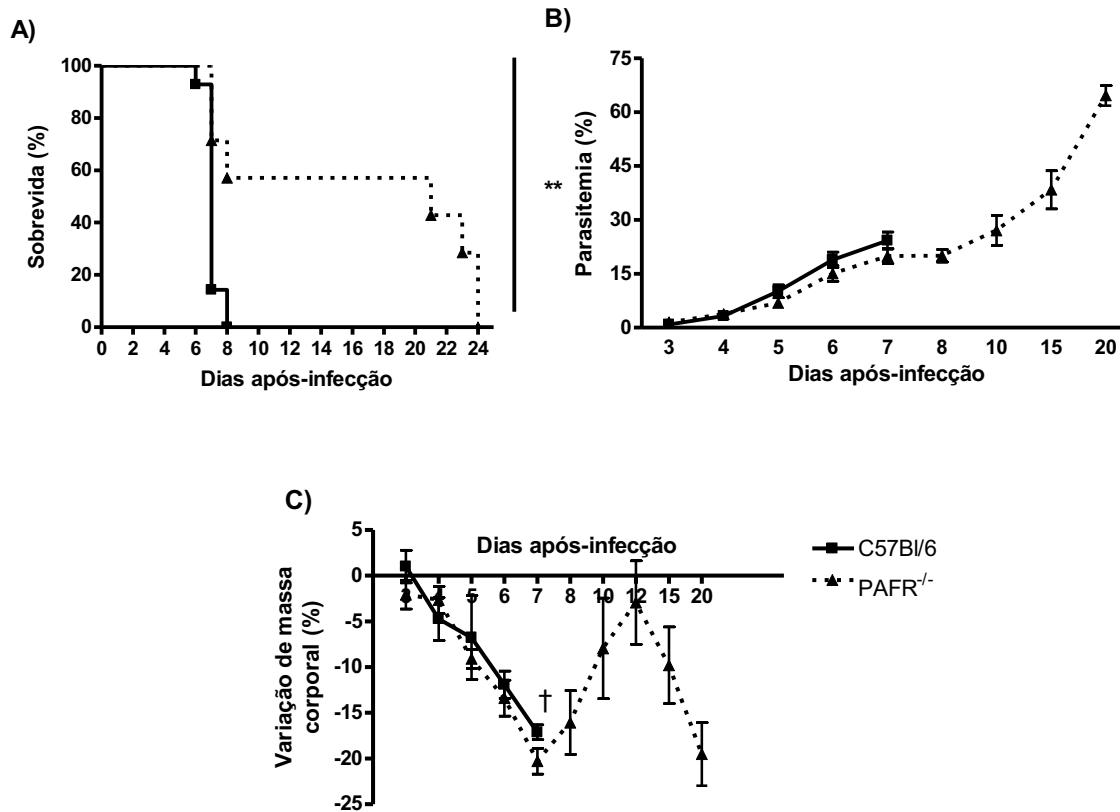
## 5. Resultados

### 5.1 - Mortalidade, parasitemia e variação de massa corporal em camundongos C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados com *P. berghei* ANKA

A infecção por PbA em camundongos C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> foi monitorada diariamente, determinando um curso letal para as duas linhagens. Entretanto, a mortalidade apresentou um perfil diferente para as duas linhagens, com animais PAFR<sup>-/-</sup> resistindo à infecção por um maior período (21 dias) em relação a animais C57Bl/6 WT (sete dias), representando uma proteção significativa ( $p < 0,01$ ) (Figura 7A). A parasitemia foi acompanhada diariamente, a partir do terceiro dia pós-infecção, através de esfregaços sanguíneos. A observação microscópica dos esfregaços sanguíneos confirmou a infecção em todos os animais que desenvolveram um aumento progressivo da parasitemia. Através de análise estatística, verificamos que não houve diferença significativa entre os grupos durante os dias em que coexistiram (3-7dpi) (Figura 7B).

A análise de variação da massa corporal dos animais de cada linhagem foi realizada em animais infectados, ao longo do tempo (Figura 7C). Os animais infectados, de ambos os grupos experimentais, apresentaram uma perda de massa corporal, porém não houve diferença entre os grupos durante os dias 3-7 p.i. Adicionalmente, animais PAFR<sup>-/-</sup>, a partir do sétimo dpi, recuperaram massa corporal até 12dpi, mas não mantiveram esse padrão e tiveram uma segunda onda de perda corpórea, que coincide com o óbito. Esses animais apresentaram hiperparasitemia, com média superior a 60%.

A ausência de PAFR previne a mortalidade associada a MCE.



**Figura 7 - Sobrevida, parasitemia e variação da massa corporal de camundongos C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.**

Camundongos infectados com um inóculo padronizado de  $10^6$  hemácias parasitadas pela via intraperitoneal. Os animais de ambas as linhagens foram monitorados diariamente. **A:** Sobrevida de camundongos C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup>. \*\* indica diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,01$ ). Os resultados foram obtidos de dois experimentos independentes. **B:** Média das parasitemias diárias a partir do terceiro dia pós-infecção, sem diferenças significativas nos níveis entre as linhagens. **C:** Variação da massa corporal (%) ao longo da infecção. † representa a morte dos animais. Dados de parasitemia, e variação de massa corporal foram expressos como média  $\pm$  EPM e avaliados através do teste Two-way ANOVA. Para análise estatística da sobrevivência, foi utilizado o teste Log-rank qui-quadrado.

## 5.2 - Contagem total e diferencial de leucócitos

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaços sanguíneos corados com Panótico Rápido, o que permitiu a identificação e quantificação dos diferentes tipos celulares presentes no sangue periférico dos animais infectados e controles. A média de leucócitos no sangue periférico dos diferentes grupos experimentais demonstrou um aumento destas células nos animais infectados (6dpi) em relação aos respectivos controles. Entretanto, não houve diferença dos valores entre as linhagens, exceto pela contagem de neutrófilos, maior em PAFR<sup>-/-</sup> controle, com  $p < 0,05$  (Tabela 4).

**Tabela 4.** Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue periférico de camundongos C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> ( $\times 10^6$  células/mL).

|             | WT          |             | PAFR <sup>-/-</sup> |              |
|-------------|-------------|-------------|---------------------|--------------|
|             | PBS         | PbA         | PBS                 | PbA          |
| Total       | 6,14 ± 0,82 | 9,72 ± 1,00 | 7,80 ± 0,62         | 10,10 ± 1,52 |
| Mononuclear | 4,82 ± 0,68 | 7,38 ± 0,91 | 5,11 ± 0,34         | 8,18 ± 1,25  |
| Neutrófilos | 1,15 ± 0,20 | 2,33 ± 0,36 | 2,68 ± 0,48*        | 1,92 ± 0,41  |
| Eosinófilos | 0,03 ± 0,02 | 0,00 ± 0,00 | 0,01 ± 0,01         | 0,00 ± 0,00  |

Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue periférico de camundongos C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup>. Animais controle (PBS) e infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (6dpi), com aumento do número de leucócitos quando comparado com respectivo controle. Entretanto, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos, exceto pelo número de neutrófilos entre os animais controle dos dois grupos, em que \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram submetidos à análise one-way ANOVA com pós-teste Newman-Keuls.

Camundongos PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentaram modificação nas médias dos tipos celulares ao longo da infecção (Tabela 5). A partir do oitavo dia de infecção ocorre um aumento significativo no número de leucócitos totais no sangue periférico desses animais, caracterizando uma leucocitose. O quadro de leucocitose perdura no décimo dpi, seguida por diminuição de leucócitos para níveis basais no 15dpi e no 20dpi. Mononucleares,

incluindo macrófagos, monócitos e linfócitos, são o tipo celular predominante na leucocitose.

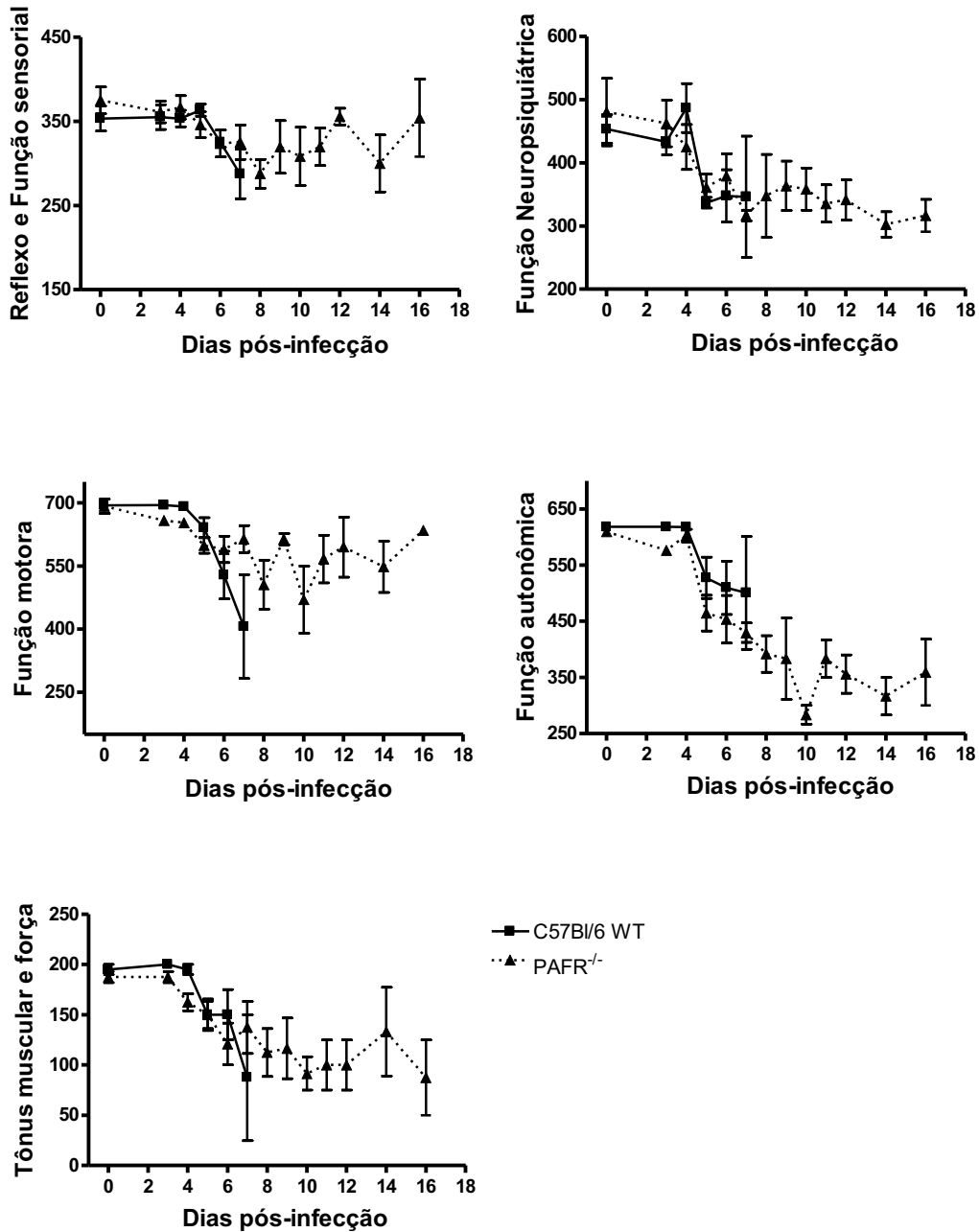
**Tabela 5.** Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue periférico de camundongos PAFR<sup>-/-</sup> (x 10<sup>6</sup> células/mL).

|       | Total                      | Mononuclear                | Neutrófilos               | Eosinófilos |
|-------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|-------------|
| 0dpi  | 7,80 ± 0,62                | 5,11 ± 0,34                | 2,68 ± 0,48               | 0,01 ± 0,01 |
| 3dpi  | 5,80 ± 0,81                | 3,08 ± 0,53                | 2,79 ± 0,59               | 0,00 ± 0,00 |
| 6dpi  | 10,10 ± 1,52               | 8,18 ± 1,25                | 1,92 ± 0,41               | 0,00 ± 0,00 |
| 8dpi  | 31,65 ± 4,04 <sup>a</sup>  | 27,42 ± 2,66 <sup>b</sup>  | 4,23 ± 1,55               | 0,00 ± 0,00 |
| 10dpi | 77,00 ± 16,75 <sup>b</sup> | 61,74 ± 14,19 <sup>b</sup> | 15,55 ± 4,89 <sup>b</sup> | 0,00 ± 0,00 |
| 15dpi | 16,25 ± 2,84               | 7,42 ± 2,13                | 8,83 ± 2,33               | 0,00 ± 0,00 |
| 20dpi | 9,75 ± 2,49                | 5,08 ± 0,82                | 4,67 ± 1,74               | 0,00 ± 0,00 |

Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue periférico de camundongos PAFR<sup>-/-</sup> ao longo da infecção. Animais infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, com aumento do número de leucócitos totais e mononucleares, quando comparado com respectivos controles no oitavo e décimo dpi. onde <sup>a</sup> e <sup>b</sup> indicam diferenças significativas, p<0,05 e p<0,01 respectivamente. Os resultados foram submetidos à análise one-way ANOVA com pós-teste Dunnett.

### 5.3 - Alterações comportamentais durante o curso da infecção

Para análise dos sinais clínicos, os animais foram submetidos à bateria SHIRPA, que confirmou alterações comportamentais durante o curso da infecção (Figura 8). A análise confirmou prejuízo cognitivo nos animais C57Bl/6 WT ao longo da infecção, quando comparados a eles mesmos antes da infecção. Especificamente, houve prejuízo na função neuropsiquiátrica no 5dpi (p<0,05), função motora no 6dpi e 7dpi (p<0,01), reflexo e função sensorial no 7dpi (p<0,05), tônus muscular e força no 7dpi (p<0,01). A função autonômica permaneceu inalterada nesses animais.



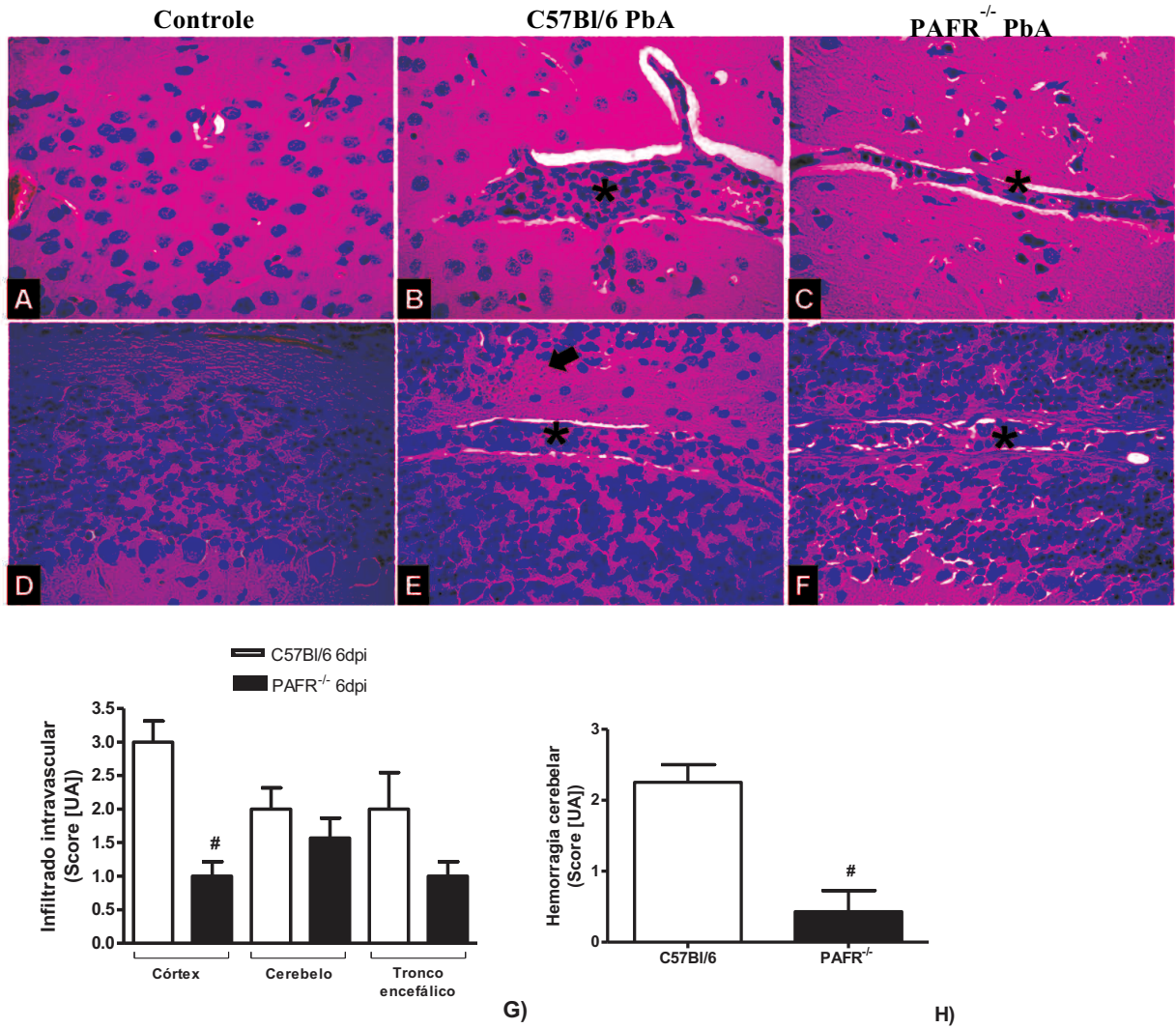
**Figura 8 - Alterações cognitivas em camundongos C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.**

Camundongos infectados com um inóculo padronizado de  $10^6$  hemácias parasitadas pela via intraperitoneal. Houve prejuízo cognitivo nos parâmetros avaliados ao longo da infecção, especialmente para camundongos C57Bl/6 WT. Entretanto, enquanto os animais dos diferentes grupos coexistiram, não houve diferença significativa entre eles. Dados da bateria SHIRPA foram expressos como média  $\pm$  EPM e avaliados através do teste Two-way ANOVA.

Animais PAFR<sup>-/-</sup> também apresentaram alterações comportamentais durante o curso da infecção. O parâmetro reflexo e função sensorial apresentou alteração significativa apenas no 8dpi ( $p<0,05$ ) e a função neuropsiquiátrica nos dias 7dpi e 14dpi. A função motora foi distinta no 8dpi e 10dpi ( $p<0,01$ ) e 14dpi ( $p<0,05$ ), enquanto o parâmetro tônus muscular e força apresentou essa diferença no intervalo 10-16dpi ( $p<0,05$ ). Vale ressaltar a alteração significativa na função autonômica no grupo PAFR<sup>-/-</sup>, no período de 5-16dpi ( $p<0,01$ ). Entretanto, enquanto os animais dos diferentes grupos coexistiram, não houve diferença significativa entre eles.

#### **5.4 - Histologia**

Uma vez que o comprometimento cognitivo foi diagnosticado, buscou-se investigar alterações histopatológicas no tecido cerebral através de análises morfológicas no córtex cerebral e cerebelo de animais infectados. Os animais não-infectados, juntamente com aqueles sacrificados no terceiro dia pós-infecção (dado não mostrado), apresentaram aspecto histológico cerebral compatível com quadro de normalidade (Figura 9A e 9D). No sexto dpi, animais C57Bl/6 WT apresentam alterações teciduais moderadas, apresentando obstrução vascular, com sequestro intravascular de leucócitos em diferentes regiões e focos de hemorragia parenquimal, especialmente na região cerebelar (Figura 9B e 9E). Essas alterações, apesar de presentes nos animais PAFR<sup>-/-</sup>, eram menos frequentes e de menor intensidade quando comparado com animais selvagens (Figura 9C e 9F), como demonstrado através de análise semi-quantitativa pelo escore histopatológico. A obstrução vascular foi analisada nas diferentes áreas, córtex, cerebelo e tronco encefálico, com diferença significativa entre os grupos na região cortical do cérebro, com  $p<0,05$  (Figura 9G). Adicionalmente, a hemorragia cerebelar foi avaliada, e animais PAFR<sup>-/-</sup> exibiram menos focos hemorrágicos quando comparado com animais C57Bl/6 WT infectados, com  $p<0,05$  (Figura 9H).



**Figura 9 - Fotomicrografias representativas e escore histopatológico de tecido cerebral.**

Animais controles (A, D), C57Bl/6 WT (B, E) e PAFR<sup>-/-</sup> (C, F) infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, com um inóculo padronizado de  $10^6$  hemácias, após seis dias de infecção. Escore histopatológico do infiltrado inflamatório intravascular no córtex, cerebelo e tronco encefálico (G) e hemorragia cerebelar (H). Aspecto histológico normal do cérebro (A) e cerebelo (D). Camundongos C57Bl/6 WT infectados (6dpi), apresentando denso infiltrado inflamatório intravascular (asterisco) no cérebro (B) e cerebelo (E). Destaque ao foco de hemorragia (seta) no cerebelo (E). Em contraste, animais PAFR<sup>-/-</sup> exibindo infiltrado inflamatório intravascular (asterisco) menos intenso no cérebro (C) e focos hemorrágicos no cerebelo virtualmente ausentes (F). Análise semi-quantitativa demonstra que animais PAFR<sup>-/-</sup> apresentaram infiltrado inflamatório intravascular no córtex e hemorragia cerebelar menos intensos, quando comparado com animais C57Bl/6 WT, <sup>#</sup>  $p < 0,05$ . A-F: H&E, em aumento de 40X.

De forma geral, o comprometimento cerebral decorrente da infecção é extenso, caracterizado por hemorragias parenquimais e infiltrado intravascular de leucócitos, ocasionalmente levando a obstrução vascular. Através da análise semi-quantitativa, demonstrou-se que animais C57Bl/6 WT apresentaram alterações cerebrais mais intensas em relação aos animais da linhagem PAFR<sup>-/-</sup>.

Uma vez que a patogenia induzida pela infecção não é limitada ao SNC, houve a análise de outros órgãos, como pulmão, fígado e baço. O edema pulmonar a síndrome respiratória aguda são complicações comuns no modelo experimental de malária. No modelo utilizando PbA, animais C57Bl/6 WT apresentam sinais de edema pulmonar e inflamação. Desta forma, a patologia pulmonar foi avaliada em animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> controles e infectados, no sexto dpi (Figura 10). Os pulmões de animais infectados apresentaram um discreto edema intersticial, infiltrado inflamatório nos septos alveolares, caracterizando uma pneumonite, e redução do tamanho alveolar. Através de análise semi-quantitativa, por escore histopatológico de edema pulmonar e alterações pulmonares gerais, como descrito por Fauconnier *et al.* (2011), notou-se diferenças entre os grupos. Animais PAFR<sup>-/-</sup> apresentam escore para edema intersticial, espessamento do septo interalveolar e redução do tamanho alveolar significativamente menores quando comparado com animais selvagens, com  $p < 0,001$  (Figura 10D e E).

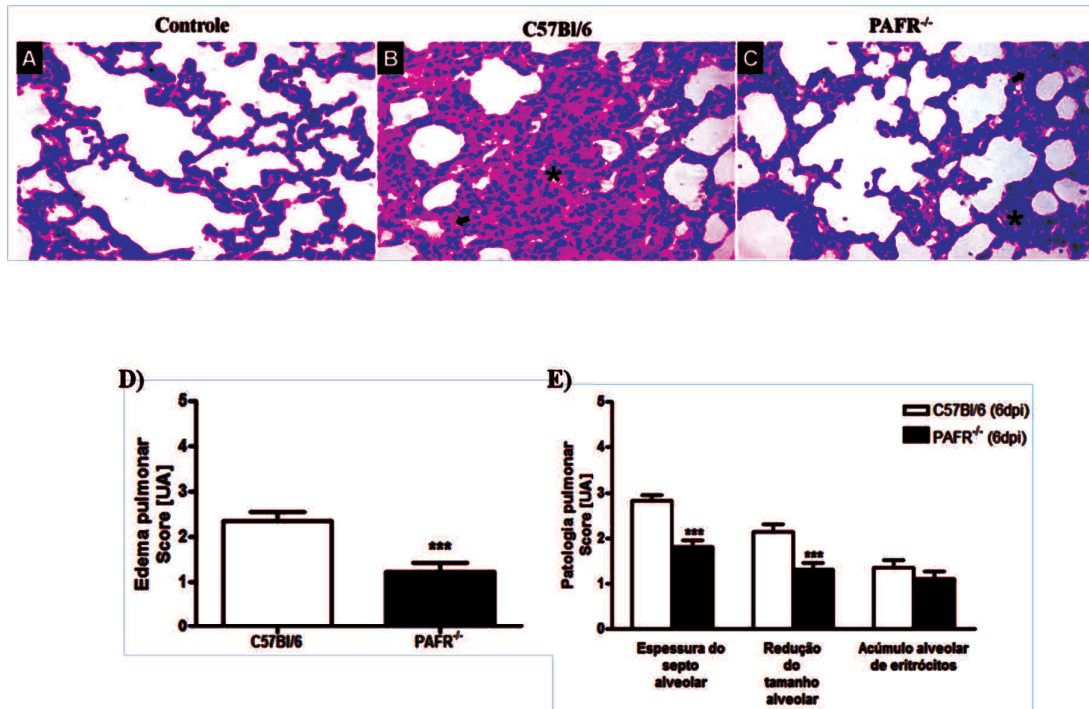
Lesões histopatológicas são frequentemente descritas no baço e fígado de modelos experimentais de malária utilizando roedores (SILVA *et al.*, 2011). O baço é um local privilegiado de resposta imunitária por macrófagos e linfócitos T e B, com a polpa branca e polpa vermelha bem delimitadas em animais controle (Figura 11). O baço exerce um papel crucial na eliminação de eritrócitos alterados durante o curso da doença. Em animais C57Bl/6 WT no sexto dpi, a arquitetura do órgão sofre alterações significativas, com hiperplasia e intensa atividade fagocitária de macrófagos da polpa vermelha, evidenciada pela presença de hemozoína, e os folículos linfóides da polpa branca apresentam perda da arquitetura. A coloração Azul da Prússia revela o aumento da marcação para pigmento malárico na polpa vermelha de animais infectados (Figura 11E). Em animais PAFR<sup>-/-</sup>, a intensidade das alterações no baço foi semelhante aos animais C57Bl/6 WT, no tempo representado. Adicionalmente, o baço é precoce e frequentemente acometido pela doença, com aumento expressivo do volume e da massa relativa (relação massa do órgão/massa



corporal do animal, em %). Camundongos C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentaram aumento significativo da massa relativa do baço em decorrência da infecção, quando comparado com o grupo não infectado, com  $p < 0,001$  (Figura 11F). Entretanto, animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentam peso relativo significativamente menor quando comparado com animais C57Bl/6 WT, com  $p < 0,01$ . A hiperplasia de células, a retenção de eritrócitos parasitados e de pigmento malárico neste órgão podem explicar esse quadro.

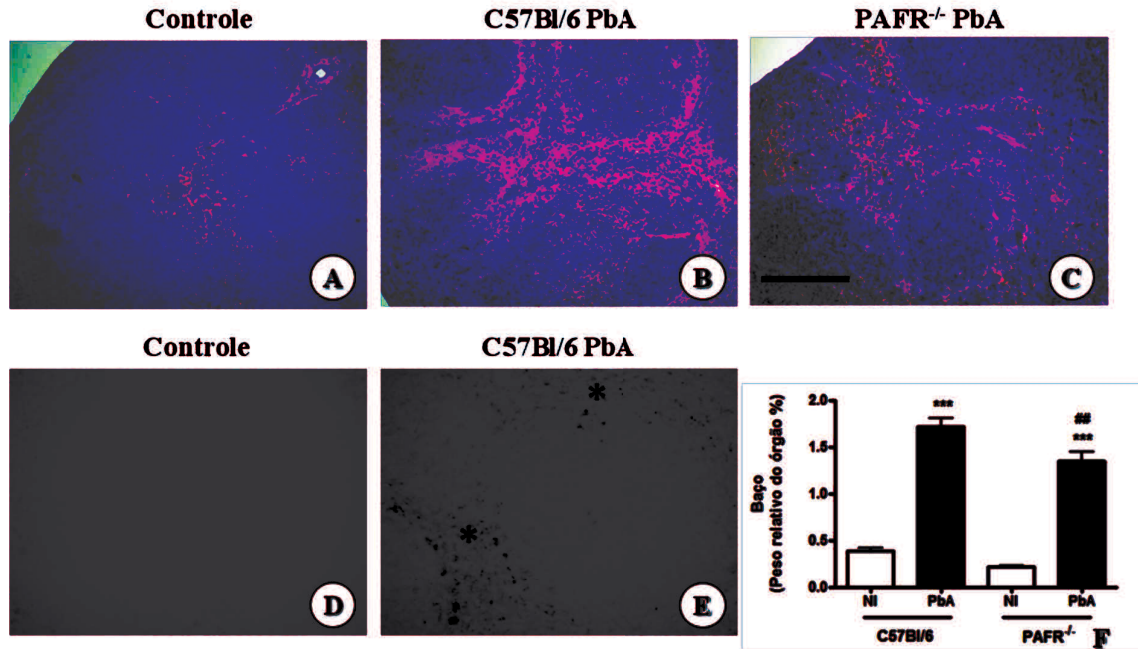
No fígado, o comprometimento hepático é decorrente da fase eritrocitária da infecção. A adesão de células mononucleares na superfície endotelial em veias centro lobulares é um evento comum em animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> com 6dpi, como demonstrado nas Figura 12 B e C (seta). Adicionalmente, os capilares sinusóides apresentam acúmulo de eritrócitos, seguido de deposição do pigmento malárico/hemozoína em células de Kupffer, que podem apresentar hipertrofia e hiperplasia. Para confirmar que o pigmento no interior das células era o pigmento malárico, os tecidos foram também avaliados através da coloração Azul da Prússia (Figura 12D e E). A coloração Azul da Prússia permitiu a identificação da marcação para íon  $Fe^{3+}$ , sugestivo de pigmento malárico fagocitado por células de Kupffer (Figura 12E). A intensidade da deposição foi semelhante entre os grupos, no tempo representado. Esses eventos tornam-se mais evidentes ao longo da infecção, mas não caracterizaram um dano hepático proeminente.

Dessa forma, a ausência da sinalização de PAFR é capaz de prevenir a intensidade de algumas alterações histopatológicas no tecido cerebral e pulmonar, em um perfil PAFR dependente. Entretanto, as alterações hepáticas e esplênicas, que foram identificadas nesses animais, não apresentaram um comprometimento extensivo nos tempos representados, que possa ser responsável pelo óbito.



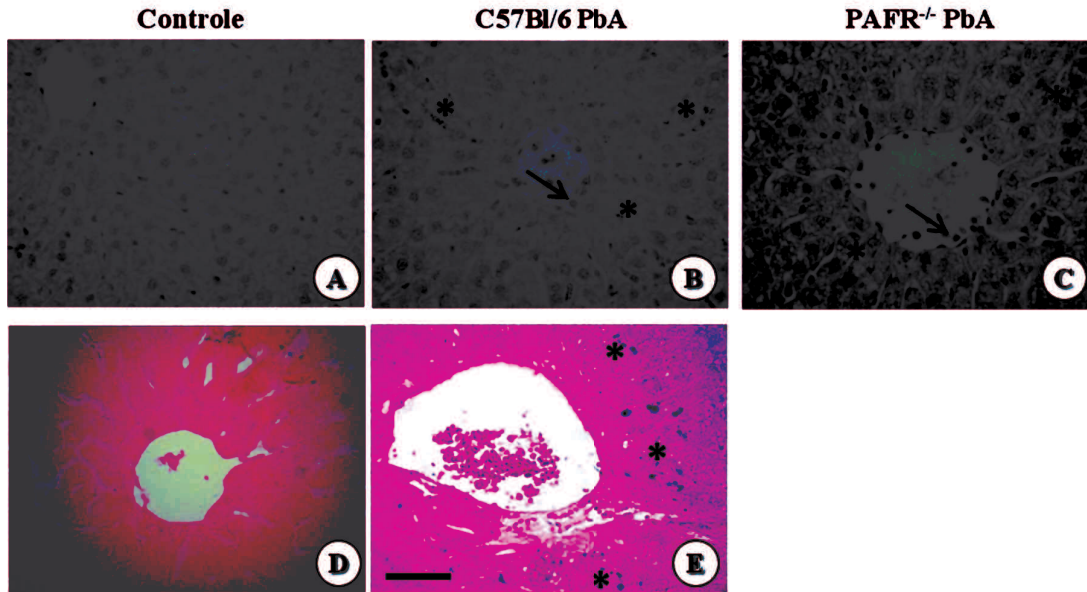
**Figura 10 - Fotomicrografias representativas e escore histopatológico de tecido pulmonar.**

Animais controles (A), C57Bl/6 WT (B) e PAFR<sup>-/-</sup> (C) infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, com um inóculo padronizado de 10<sup>6</sup> hemácias, após seis dias de infecção. Escore histopatológico de edema pulmonar (D) e alterações pulmonares (E), como descrito por Fauconnier *et al.* (2011). A: Parênquima pulmonar com aspecto histológico normal. B: Animais C57Bl/6 WT infectados (6dpi) apresentam espessamento dos septos interalveolares, com acúmulo de células inflamatórias mononucleares e fibroplasia (asterisco). Notar ainda, redução acentuada dos alvéolos pulmonares e deposição de edema proteináceo intra-alveolar (seta). C: Animais PAFR<sup>-/-</sup> (6dpi) apresentam espessamento moderado dos septos interalveolares (seta) e edema intra-alveolar. As alterações são similares em animais infectados, porém animais PAFR<sup>-/-</sup> apresentam escore significativamente menor para edema intersticial, espessamento dos septos interalveolares e redução do tamanho alveolar, quando comparado com animais selvagens (D e E), \*\*\* p<0,001. A-C: H&E, em aumento de 20X.



**Figura 11 - Fotomicrografias representativas de baço.**

Animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, com um inóculo padronizado de  $10^6$  hemácias parasitadas pela via intraperitoneal. **A:** Aspecto normal da arquitetura do tecido em animais controle, com a polpa branca e polpa vermelha bem delimitadas. **B:** Alterações da arquitetura do órgão em animais C57Bl/6 WT infectados (6dpi), com hiperplasia da polpa branca e perda estrutural da polpa vermelha. Moderada atividade fagocitária de macrófagos da polpa vermelha, evidenciada pela presença de hemozoína. **C:** Alterações discretas da arquitetura do órgão, com hiperplasia da polpa branca e perda estrutural da polpa vermelha. Moderada atividade fagocitária de macrófagos da polpa vermelha, evidenciada pela presença de hemozoína. **D:** Aspecto normal do tecido em animais controle, com a polpa vermelha apresentando fraca marcação para íon  $Fe^{3+}$ . **E:** Animais C57Bl/6 WT infectados (6dpi), apresentando marcação para íon  $Fe^{3+}$  (asterisco), sugestivo de hemozoína fagocitada por macrófagos da polpa vermelha. A intensidade das alterações em animais infectados foi semelhante entre animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup>, nos tempos representados. **F:** Aumento expressivo da massa relativa do baço (relação massa do órgão/massa corporal do animal, em %) em camundongos C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados, \*\*\* $p < 0,001$ . Animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentam peso relativo menor quando comparado com animais C57Bl/6 WT infectados, ### $p < 0,01$ . A-C: H&E, em aumento de 10X, com barra representando 500  $\mu$ m. D e E: Azul da Prússia, em aumento de 20X, com barra representando 100  $\mu$ m. F: Resultado expresso como média  $\pm$  EPM e submetido à análise one-way ANOVA com pós-teste Newman-Keuls.

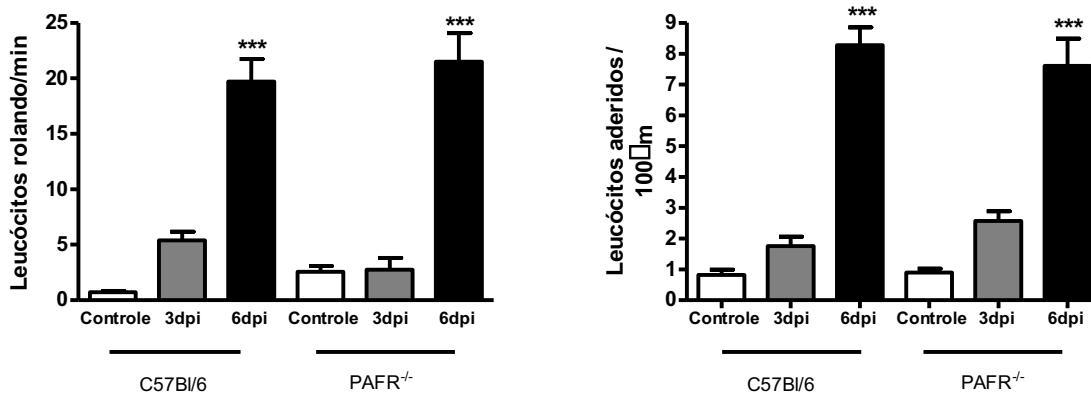


**Figura 12 - Fotomicrografias representativas de fígado.**

Animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, com um inóculo padronizado de 10<sup>6</sup> hemácias parasitadas pela via intraperitoneal. **A** Animal controle, com aspecto normal da arquitetura do tecido, demonstrando região de veia centro lobular e parênquima hepático, sem deposição de hemozoína. **B**: Acúmulo focal de células mononucleares no endotélio da veia centro lobular (seta), em animais C57Bl/6 WT infectados (6dpi) e discreta deposição do pigmento malárico (hemozoína) em células de Kupffer (asterisco). **C**: Acúmulo focal de células mononucleares no endotélio da veia centro lobular de animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados (6dpi). No fígado, a intensidade das alterações em animais infectados foi semelhante entre os grupos nos tempos representados. **D**: Aspecto normal do tecido em animais controle, sem marcação para íon Fe<sup>3+</sup>. **E**: Animais C57Bl/6 WT infectados (6dpi), apresentando marcação para íon Fe<sup>3+</sup> (asterisco), sugestivo de hemozoína fagocitada por células de Kupffer. A intensidade das alterações em animais infectados foi semelhante entre animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup>, nos tempos representados. A-C: H&E; D e E: Azul da Prússia. Aumento de 40X, com barra representando 50µm.

### 5.5 - Interação leucócito-endotélio

As interações leucócito-endotélio na microvasculatura da pia-máter foram avaliadas através da visualização de leucócitos marcados com o fluorocromo rodamina 6G, utilizando a técnica de microscopia intravital. Com o objetivo de caracterizar a resposta inflamatória decorrente da infecção por PbA, animais controle, infectados com três e seis dias de infecção foram submetidos à técnica. Animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> apresentaram, no sexto dpi, aumento significativo (\*\*p<0,001) nos processos de rolamento e adesão leucocitária no endotélio cerebral em comparação com os respectivos controles. Porém, esses eventos apresentaram o mesmo perfil entre animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> (Figura 13).

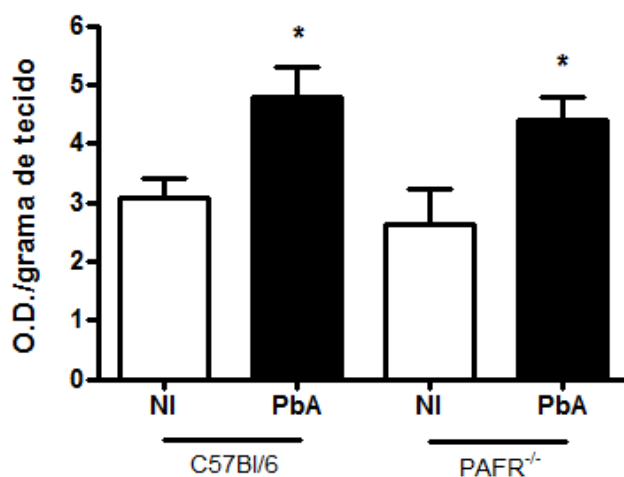


**Figura 13 - Interações leucócito-endotélio na microvasculatura da pia-máter, utilizando a técnica de microscopia intravital, com o objetivo de avaliar os processos de rolamento e adesão leucocitária no endotélio cerebral.**

O protocolo inclui camundongos C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> controle e infectados (3dpi e 6dpi) com *Plasmodium berghei* ANKA, com um inóculo padronizado de 10<sup>6</sup> hemácias parasitadas pela via intraperitoneal. Animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> apresentam, no sexto dpi, aumento significativo no número de células rolando e aderidas, em comparação com os respectivos controles (\*\*p<0,001). Porém, esses eventos apresentaram o mesmo perfil entre animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> (6dpi). Os resultados foram expressos como média ± EPM e submetidos à análise one-way ANOVA com pós-teste Newman-Keuls.

### 5.6 - Atividade de N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG) no tecido cerebral

Para avaliar a presença de monócitos/macrófagos no tecido cerebral de camundongos C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup>, avaliamos a atividade da enzima NAG, como ensaio indireto para presença desse tipo celular. Os animais WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados (6dpi) apresentaram um aumento significativo da enzima no tecido cerebral ( $4,79 \pm 0,49$  OD/grama de tecido e  $4,40 \pm 0,37$  OD/grama de tecido; respectivamente), quando comparado com animais controle, não-infectados (NI) ( $3,08 \pm 0,31$  OD/grama de tecido e  $2,62 \pm 0,62$  OD/grama de tecido; respectivamente), com  $p < 0,05$ . O aumento da enzima no tecido sugere a presença de monócitos sequestrado no compartimento cerebral, em decorrência da infecção (Figura 14). Entretanto, não houve diferença significativa dos níveis da atividade da enzima entre animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup>.



**Figura 14 - Avaliação da enzima NAG no tecido cerebral.**

Camundongos C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, com um inóculo padronizado de  $10^6$  hemácias parasitadas pela via intraperitoneal. A presença de monócitos/macrófagos no tecido cerebral foi avaliada através da atividade da enzima, como ensaio indireto para presença desse tipo celular. Os resultados foram expressos em densidade óptica (OD) da reação enzimática por grama de tecido cerebral. Camundongos C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentaram um aumento significativo da concentração de NAG, quando comparado com animais controle ( $*p < 0,05$ ), sem diferença significativa entre animais infectados. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e submetidos à análise one-way ANOVA com pós-teste Newman-Keuls. NI: não-infectado.

## 5.7 - Produção de citocinas e quimiocinas

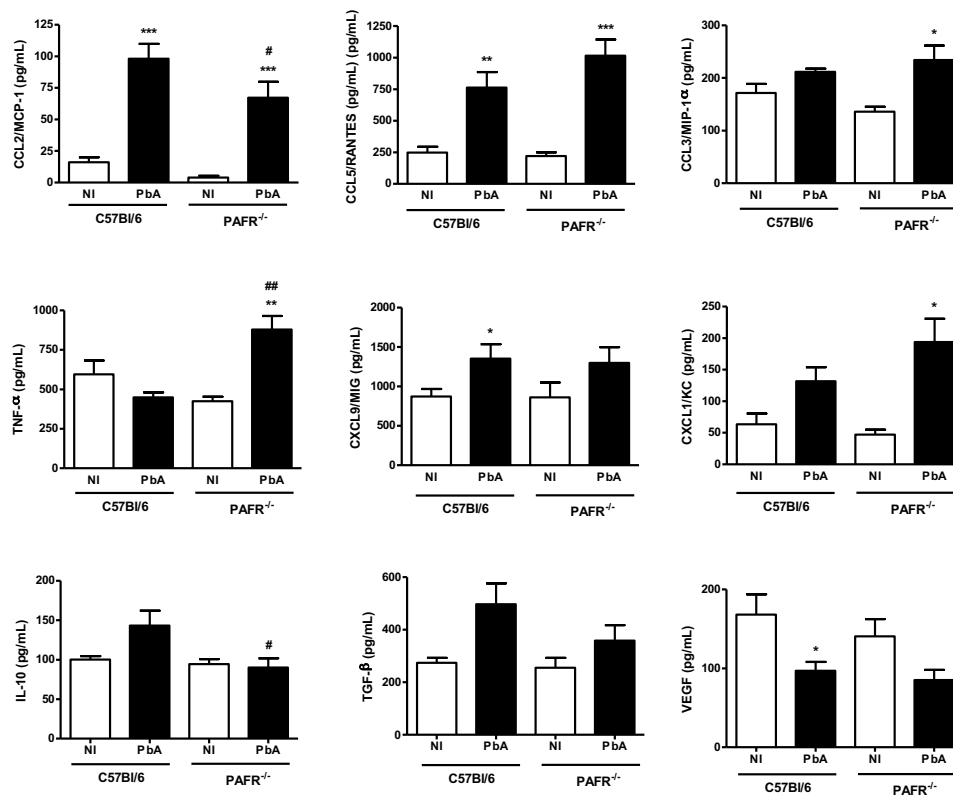
Para a caracterização da resposta inflamatória desencadeada pela infecção, foram mensuradas quimiocinas e citocinas no tecido cerebral, pulmão, baço e no soro, através da técnica de ELISA.

### 5.7.1 - Citocinas e quimiocinas no tecido cerebral

As concentrações de TNF- $\alpha$ , MIG/CXCL9, MCP-1/CCL2, Kc/CXCL1, RANTES/CCL5, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, IL-10, TGF- $\beta$  e VEGF foram avaliadas no homogenato de tecido cerebral de animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> controle e infectados (Figura 15).

A quimiocina CCL2/MCP-1 apresentou aumento dos níveis em animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados ( $98,20 \pm 11,61$  pg/mL e  $67,28 \pm 12,60$  pg/mL; respectivamente) quando comparados com o grupo controle ( $16,10 \pm 3,92$  pg/mL e  $4,03 \pm 1,36$  pg/mL; respectivamente), com  $p < 0,001$ . Entretanto, animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentaram uma concentração menor dessa quimiocina quando comparado com animais C57Bl/6 WT, com  $p < 0,05$ . Para CCL5/RANTES, a infecção acarretou no aumento da concentração dessa quimiocina no tecido cerebral dos animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> ( $763,50 \pm 122,80$  pg/mL e  $1015 \pm 128,30$  pg/mL; respectivamente) quando comparados com os respectivos grupos controle ( $246,90 \pm 46,17$  pg/mL e  $220,00 \pm 28,29$  pg/mL) com  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente. A quimiocina CCL3/MIP-1 $\alpha$  permaneceu com níveis inalterados em animais C57Bl/6 WT infectados ( $211,90 \pm 6,16$  pg/mL) quando comparados com o grupo controle ( $171,80 \pm 17,10$  pg/mL). Entretanto, os níveis dessa quimiocina aumentaram nos animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados ( $234,2 \pm 27,67$  pg/mL) quando comparados com o grupo controle ( $136,1 \pm 9,13$  pg/mL), com  $p < 0,05$ .

A citocina TNF- $\alpha$  apresentou um perfil similar, com níveis semelhantes nos animais C57Bl/6 WT infectados ( $449,1 \pm 32,29$  pg/mL) e grupo controle ( $595,2 \pm 86,68$  pg/mL). Já nos animais PAFR<sup>-/-</sup>, houve um aumento na concentração em animais infectados ( $878,6 \pm 87,18$  pg/mL) quando comparados com o grupo controle ( $424,5 \pm 28,34$  pg/mL), com  $p < 0,01$ . Adicionalmente, os níveis em animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados eram significativamente superiores quando comparados com camundongos C57Bl/6 WT infectados, com  $p < 0,01$ .



**Figura 15 - Citocinas/quimiocinas em homogenato de tecido cerebral.**

Animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> controle e infectados (6dpi) com *Plasmodium berghei* ANKA, com um inóculo padronizado de  $10^6$  hemácias parasitadas pela via intraperitoneal. O homogenato de tecido cerebral foi avaliado através de ELISA, para dosagem de TNF- $\alpha$ , CXCL9, CCL2, CXCL1, CCL5, CCL3, IL-10, TGF- $\beta$  e VEGF. As quimiocinas CCL2 e CCL5 apresentaram aumento dos níveis em animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados quando comparados com controle (\*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001), com animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentaram uma concentração menor quando comparado com animais WT, #p<0,05. Aumento na concentração de TNF- $\alpha$  e CCL3 em animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados quando comparados com o controle, \*p<0,05 e \*\*p<0,01. Os níveis de TNF- $\alpha$  em animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados foram significativamente superiores quando comparados com camundongos WT infectados, ##p<0,01. A concentração de CXCL9 aumentou no tecido cerebral de animais WT infectados (\*\*p<0,01), enquanto os níveis dessa quimiocina permaneceram inalterados em animais PAFR<sup>-/-</sup>. CXCL1 apresentou valores inalterados em animais WT infectados e um acréscimo em animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados, \*p<0,05. A citocina IL-10 apresenta um perfil inalterado em animais WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados, quando comparados com os controles. Entretanto, os níveis entre animais infectados apresentaram diferenças significativas, #p<0,05. Os níveis de VEGF diminuíram em animais C57Bl/6 WT infectados quando comparados com controle, \*p<0,05, e permaneceram inalterados em animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM e submetidos à análise one-way ANOVA com pós-teste Newman-Keuls. NI: não-infectado.



A concentração de CXCL9/MIG apresentou um aumento no tecido cerebral de animais C57Bl/6 WT infectados ( $1354 \pm 183,9$  pg/mL) em relação ao controle ( $872,0 \pm 95,06$  pg/mL), com  $p < 0,01$ . Enquanto os níveis dessa quimiocina permaneceram inalterados em animais PAFR<sup>-/-</sup> controle e infectados ( $862,4 \pm 189,2$  pg/mL e  $1299 \pm 198,8$  pg/mL; respectivamente). A quimiocina CXCL1/KC apresentou um perfil contrário, com valores inalterados entre animais C57Bl/6 WT infectados ( $131,8 \pm 22,14$  pg/mL) e controles ( $63,54 \pm 16,98$  pg/mL). Enquanto em animais PAFR<sup>-/-</sup>, a concentração apresentou um acréscimo em animais infectados ( $193,8 \pm 36,97$  pg/mL) quando comparado com animais não-infectados ( $47,08 \pm 7,94$  pg/mL), com  $p < 0,05$ .

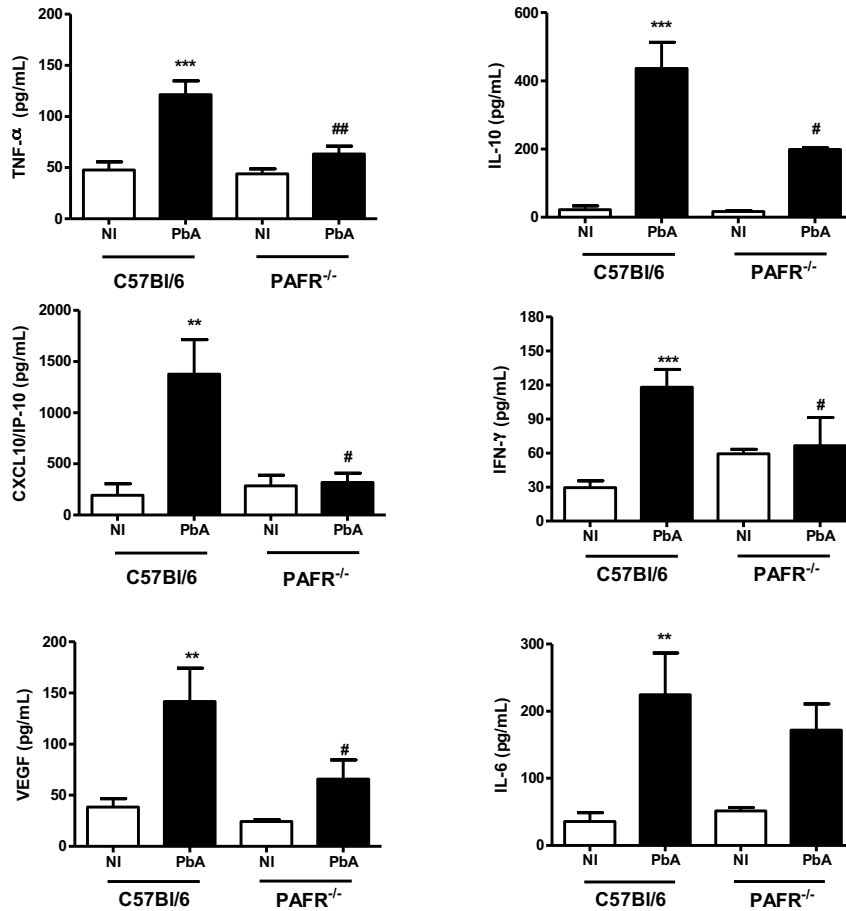
A citocina IL-10 apresenta um perfil inalterado em animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados ( $143,2 \pm 18,92$  pg/mL e  $90,18 \pm 11,78$  pg/mL) quando comparados com os controles ( $100,3 \pm 4,26$  pg/mL e  $94,56 \pm 6,17$  pg/mL). Entretanto, o nível entre animais infectados apresentou diferença significativa, com  $p < 0,05$ . De maneira particular, os níveis de VEGF diminuíram em animais C57Bl/6 WT infectados ( $96,92 \pm 11,09$  pg/mL) quando comparados com o grupo controle ( $168,2 \pm 25,71$  pg/mL), com  $p < 0,05$ . Para animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados, os valores para essa citocina ( $85,14 \pm 12,70$  pg/mL) permaneceram inalterados quando comparados com PAFR<sup>-/-</sup> não infectados ( $140,5 \pm 22,01$  pg/mL).

### 5.7.2 - Citocinas e quimiocinas sistêmicas

Em decorrência do perfil sistêmico da doença, o soro de animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> controles (NI: não infectado) e infectados (6dpi) foi avaliado através de ELISA, para dosagem das seguintes citocinas e quimiocinas: TNF- $\alpha$ , IL-10, IP-10/CXCL10, IFN- $\gamma$ , IL-6 e VEGF (Figura 16). Verificou-se um aumento da concentração de TNF- $\alpha$  em animais C57Bl/6 WT infectados ( $121,50 \pm 13,40$  pg/mL) em relação ao controle ( $47,82 \pm 8,00$  pg/mL), com  $p < 0,001$ . Em adição, animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentaram níveis similares com o grupo controle ( $63,41 \pm 7,71$  pg/mL;  $44,02 \pm 4,76$  pg/mL) e significativamente menores que animais C57Bl/6 WT infectados, com  $p < 0,01$ . Os valores de IP-10/CXCL10 seguem um padrão semelhante, com maior concentração em animais C57Bl/6 WT infectados ( $1378,00 \pm 336,80$  pg/mL), que animais controle ( $191,80 \pm 112,80$  pg/mL),  $p < 0,01$ ; enquanto PAFR<sup>-/-</sup> controle e infectados apresentam valores similares

(283,70 ± 104,90 pg/mL e 317,50 ± 92,09 pg/mL). Para IL-10, animais C57Bl/6 WT infectados (436,90 ± 76,32 pg/mL) apresentaram uma concentração superior que C57Bl/6 WT controle (22,34 ± 10,77 pg/mL), com  $p < 0,001$ ; enquanto PAFR<sup>-/-</sup> controle e infectados mantiveram o mesmo perfil (16,89 ± 2,96 pg/mL e 198,90 ± 5,07 pg/mL). Os níveis de IP-10/CXCL10 e IL-10 em animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentaram significativamente menores quando comparado com camundongos C57Bl/6 WT infectados, com  $p < 0,05$ .

Houve um incremento dos valores citocina IFN- $\gamma$  em animais C57Bl/6 WT infectados (118,0 ± 15,65 pg/mL) quando comparados com o grupo controle (29,69 ± 5,86 pg/mL), com  $p < 0,01$ . Os níveis da citocina em animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados permaneceram inalterados quando comparados com PAFR<sup>-/-</sup> não infectados (59,04 ± 4,042 pg/mL e 66,54 ± 24,04 pg/mL). A concentração de IFN- $\gamma$  em animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentaram significativamente menores quando comparado com camundongos C57Bl/6 WT infectados, com  $p < 0,05$ . De maneira similar, os níveis de VEGF aumentaram em animais C57Bl/6 WT infectados (141,70 ± 32,31 pg/mL) quando comparados com o grupo controle (38,56 ± 8,04 pg/mL), com  $p < 0,05$ . Para animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados, o valor da citocina (65,86 ± 18,70 pg/mL) permaneceu inalterado quando comparados com PAFR<sup>-/-</sup> não infectados (24,48 ± 1,71 pg/mL), mas significativamente menor quando comparado com camundongos C57Bl/6 WT infectados, com  $p < 0,05$ . A citocina IL-6 apresentou níveis maiores nos animais C57Bl/6 WT infectados (224,6 ± 36,17 pg/mL) quando comparados com o grupo controle (35,63 ± 5,86 pg/mL), com  $p < 0,01$ ; enquanto a concentração em animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados permaneceu inalterada quando comparada com PAFR<sup>-/-</sup> não infectados (171,50 ± 39,23 pg/mL e 51,30 ± 17,15 pg/mL).



**Figura 16 - Níveis séricos de citocinas/quimiocinas.**

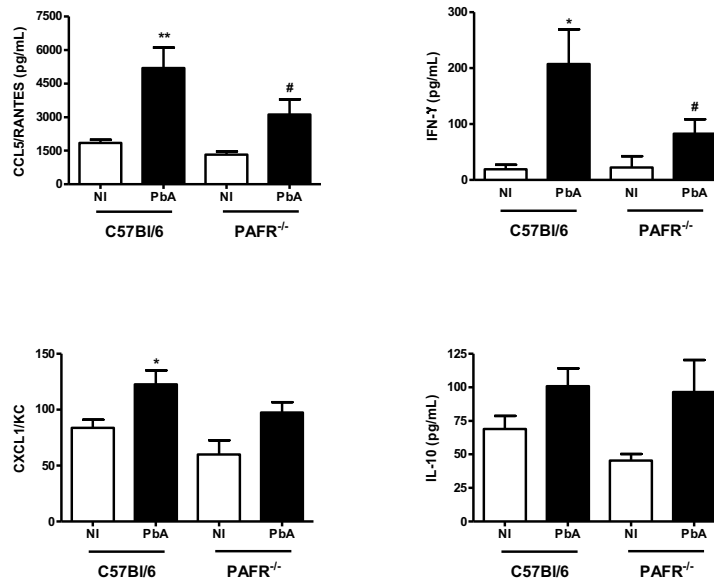
Animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> controle e infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, com um inóculo padronizado de  $10^6$  hemácias parasitadas pela via intraperitoneal. O soro de animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> controles e infectados (6dpi) foi avaliado através de ELISA, para dosagem de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IP-10/CXCL10, IL-10, VEGF e IL-6. Verificou-se um aumento da concentração de TNF- $\alpha$ , IP-10/CXCL10, IL-10, IFN- $\gamma$  e VEGF em animais C57Bl/6 WT infectados em relação ao grupo controle, \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*  $p < 0,01$ . Em adição, animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentaram níveis similares com o grupo controle e significativamente menores que animais C57Bl/6 WT infectados, ##  $p < 0,01$  e #  $p < 0,05$ . A citocina IL-6 apresentou valores superiores nos animais C57Bl/6 WT infectados quando comparados com o grupo controle, \*\*  $p < 0,01$ . Entretanto, os níveis dessa citocina permaneceram inalterados quando comparado com PAFR<sup>-/-</sup> controle e animais WT infectados. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e submetidos à análise one-way ANOVA com pós-teste Newman-Keuls. NI: não-infectado.

### 5.7.3 - Citocinas e quimiocinas no tecido pulmonar

As concentrações de RANTES/CCL5, IFN- $\gamma$ , Kc/CXCL1, IL-10 e VEGF foram avaliadas no homogenato de tecido pulmonar de animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> controle e infectados (Figura 17).

Verificou-se um aumento da concentração de RANTES/CCL5 em animais selvagens infectados ( $5192 \pm 915,2$  pg/mL) em relação ao grupo controle ( $1849 \pm 135,5$  pg/mL), com  $p < 0,01$ . Em adição, animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentaram níveis similares com o grupo controle ( $3114 \pm 678,4$  pg/mL;  $1314 \pm 153,2$  pg/mL) e significativamente menores que animais C57Bl/6 WT infectados, com  $p < 0,05$ . A citocina IFN- $\gamma$  apresentou um incremento dos valores nos animais C57Bl/6 WT infectados ( $207,40 \pm 61,91$  pg/mL) quando comparados com o grupo controle ( $18,82 \pm 8,07$  pg/mL), com  $p < 0,05$ . Para animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados, apesar do aumento nos níveis dessa citocina ( $82,71 \pm 25,99$  pg/mL), os valores não foram significativamente diferentes quando comparados com PAFR<sup>-/-</sup> não infectados ( $22,46 \pm 19,85$  pg/mL). Adicionalmente, animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentaram níveis significativamente menores que animais C57Bl/6 WT infectados, com  $p < 0,05$ .

A quimiocina CXCL1/KC apresentou um acréscimo nos valores em animais C57Bl/6 WT infectados ( $122,7 \pm 12,44$  pg/mL) em relação ao grupo controle ( $83,64 \pm 7,468$  pg/mL). Enquanto em animais PAFR<sup>-/-</sup>, a concentração em animais infectados ( $97,42 \pm 9,22$  pg/mL) permaneceu inalterada quando comparado com animais não-infectados ( $59,91 \pm 12,74$  pg/mL). Os valores de IL-10 e VEGF permaneceram inalterados no tecido pulmonar de animais infectados (dados não mostrados).



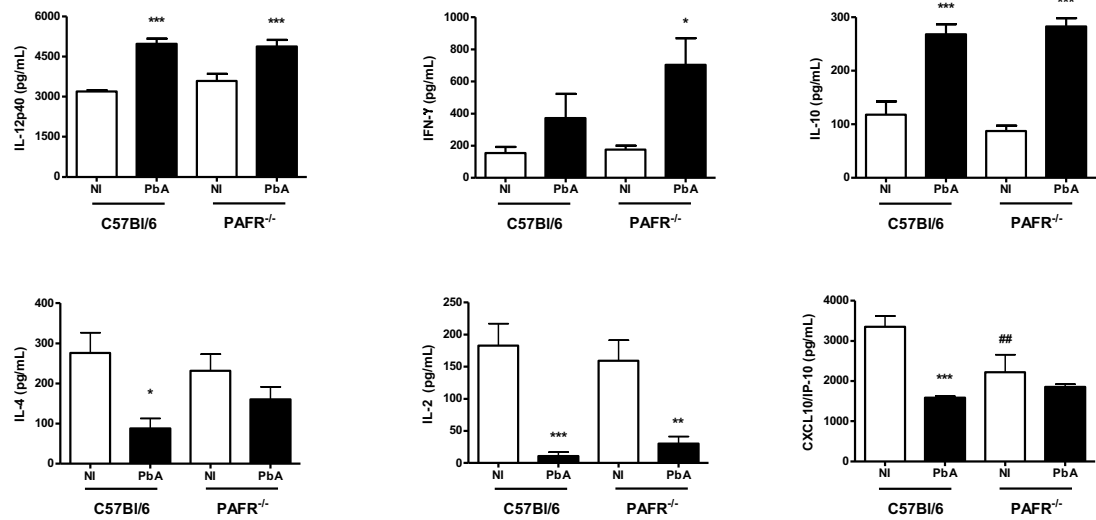
**Figura 17 - Concentração de citocinas/quimiocinas em homogenato de tecido pulmonar.**

Animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> controle e infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, com um inóculo padronizado de  $10^6$  hemácias parasitadas pela via intraperitoneal. O homogenato de tecido pulmonar de animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> controles e infectados (6dpi) foi avaliado através de ELISA, para dosagem de RANTES/CCL5, IFN- $\gamma$ , Kc/CXCL1 e IL-10. Verificou-se um aumento da concentração de RANTES/CCL5 e IFN- $\gamma$  em animais selvagens infectados em relação ao grupo controle, \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$ , respectivamente. Em adição, animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentaram níveis similares com o grupo controle e significativamente menores que animais C57Bl/6 WT infectados, # $p < 0,05$ . A quimiocina CXCL1/KC apresentou um acréscimo nos valores em animais C57Bl/6 WT infectados em relação ao grupo controle \* $p < 0,05$ . Enquanto em animais PAFR<sup>-/-</sup>, os níveis dessa quimiocinas permaneceram inalterados quando comparados com PAFR<sup>-/-</sup> controle e animais C57Bl/6 WT infectados. Os valores de IL-10 permaneceram inalterados no tecido pulmonar de animais infectados. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e submetidos à análise one-way ANOVA com pós-teste Newman-Keuls.

#### 5.7.4 - Citocinas e quimiocinas no baço

Adicionalmente, o baço exerce importante papel na resposta imune durante a malária. Dessa forma, a concentração das citocinas/quimiocinas IL-12p40, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4, IL-2, IP/CXCL10, MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5 foi avaliada no baço de animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> controles e infectados (Figura 18). Verificou-se um aumento da concentração de IL-12p40 em animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados ( $4978 \pm 188,0$  pg/mL e  $4877 \pm 238,2$  pg/mL; respectivamente) em relação aos controles ( $3190 \pm 51,4$  pg/mL e  $3589 \pm 261,4$  pg/mL; respectivamente), com  $p < 0,001$ . Animais infectados de ambos os grupos apresentaram níveis similares entre si. Os níveis de IFN- $\gamma$  permaneceram inalterados em animais C57Bl/6 WT infectados ( $372,8 \pm 151,0$  pg/mL) em relação ao grupo controle ( $154,5 \pm 38,6$  pg/mL). Entretanto, houve um incremento significativo na concentração dessa citocina em animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados ( $703,7 \pm 166,6$  pg/mL) quando comparado com animais controle ( $175,6 \pm 24,7$  pg/mL), com  $p < 0,05$ .

A concentração de IL-10 em animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados foi maior ( $268,2 \pm 18,4$  pg/mL e  $282,6 \pm 15,6$  pg/mL; respectivamente) em relação ao grupo controle ( $118,1 \pm 24,5$  pg/mL e  $87,1 \pm 10,1$  pg/mL; respectivamente), com  $p < 0,001$ , enquanto animais infectados apresentaram níveis similares entre si. A concentração de IL-4 sofreu declínio em decorrência da infecção em animais C57Bl/6 WT ( $87,7 \pm 25,3$  pg/mL), em relação aos animais não-infectados ( $276,2 \pm 50,7$  pg/mL), com  $p < 0,05$ . Os níveis de IL-4 mantiveram o mesmo padrão em animais PAFR<sup>-/-</sup> (NI:  $231,5 \pm 42,2$  pg/mL e PbA:  $160,4 \pm 31,4$  pg/mL). Houve redução da concentração de IL-2 no baço de animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados ( $10,97 \pm 5,9$  pg/mL e  $30,3 \pm 10,9$  pg/mL; respectivamente) em relação aos animais controle ( $182,9 \pm 34,3$  pg/mL e  $159,5 \pm 31,5$  pg/mL; respectivamente), com  $p < 0,001$ . Os níveis de CXCL10/IP-10 decaíram em animais C57Bl/6 WT infectados ( $1583 \pm 38,9$  pg/mL) em relação ao grupo controle ( $3351 \pm 271,4$  pg/mL), com  $p < 0,001$ . Animais PAFR<sup>-/-</sup> controle e infectados apresentaram valores similares entre si ( $2221 \pm 440,5$  pg/mL e  $1859 \pm 63,5$  pg/mL; respectivamente). Adicionalmente, a quimiocina CXCL10/IP-10 apresentou um perfil basal distinto em animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> não-infectados, com  $p < 0,01$ . Os níveis das quimiocinas CCL5/RANTES e CCL2/MCP-1 apresentaram níveis similares em animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> controle e infectados (dados não mostrados)



**Figura 18 - Níveis de citocinas/quimiocinas em homogenato de baço.**

Animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> controle e infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, com um inóculo padronizado de 106 hemácias parasitadas pela via intraperitoneal. O homogenato tecidual de animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> controles e infectados (6dpi) foi avaliado através de ELISA, para dosagem de IL-12p40, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4, IL-2, IP/CXCL10, MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5. Verificou-se aumento da concentração de IL-12p40 e IL-10 em animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados em relação aos controles, \*\*\* $p < 0,001$ . Animais infectados de ambos os grupos apresentaram níveis similares entre si. Os níveis de IFN- $\gamma$  permaneceram inalterados em animais C57Bl/6 WT infectados em relação ao grupo controle. Entretanto, houve um incremento significativo na concentração dessa citocina em animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados quando comparado com animais controle, \* $p < 0,05$ . A concentração de IL-4 e IL-2 sofreu declínio em decorrência da infecção em animais, em relação aos animais não-infectados, \* $p < 0,05$ . Os níveis das citocinas mantiveram o mesmo padrão em animais PAFR<sup>-/-</sup>. Os níveis de CXCL10/IP-10 decaíram em animais C57Bl/6 WT infectados (\*\*\* $p < 0,001$ ), enquanto animais PAFR<sup>-/-</sup> controle e infectados apresentaram valores similares. A quimiocina CXCL10/IP-10 apresentou um perfil basal distinto em animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> não-infectados, com  $p < 0,01$ . Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e submetidos à análise one-way ANOVA com pós-teste Newman-Keuls.

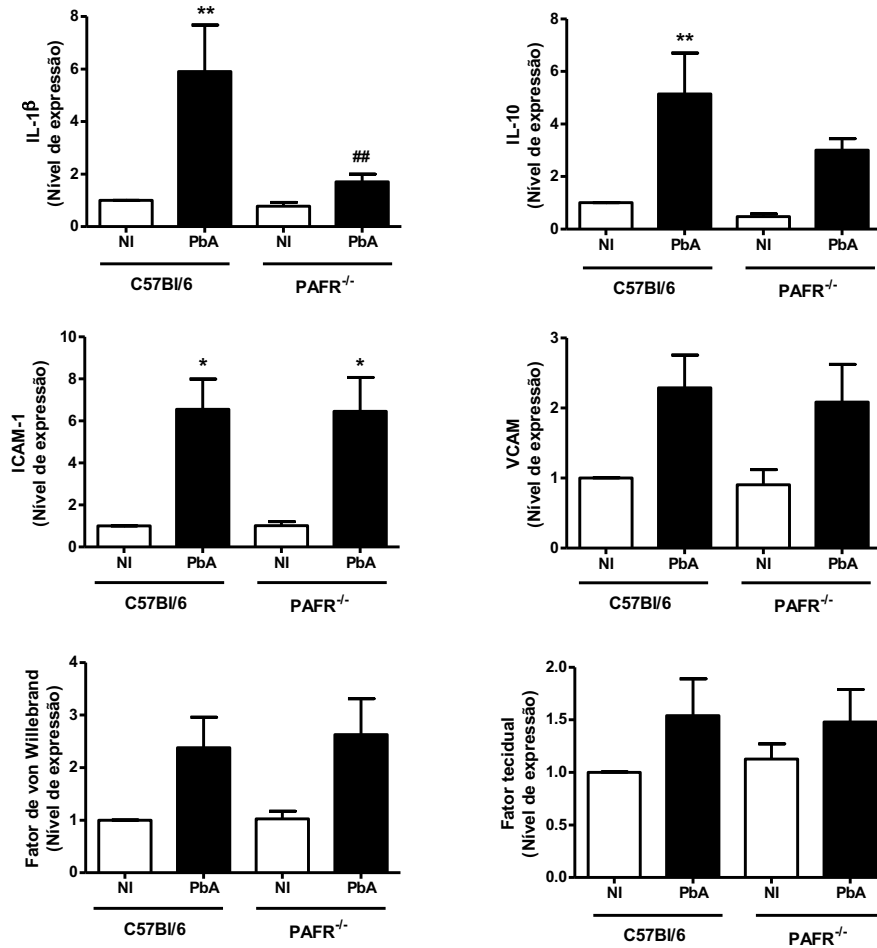
## 5.8 - Perfil de expressão de moléculas no tecido cerebral

Uma vez que IL-10 é capaz de modular o desenvolvimento da MCE induzida por PbA, e IL-1 $\beta$  é capaz de contribuir para o dano da BHE (ALLAN *et al.*, 2005), os níveis de expressão dessas duas moléculas foram analisadas por qPCR (Figura 19A e B). A expressão de IL-1 $\beta$  apresentou níveis de expressão significativamente maiores em animais C57Bl/6 WT infectados quando comparados com o grupo controle, com  $p < 0,01$ . Para animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados, os níveis para essa citocina permaneceram inalterados quando comparados com PAFR<sup>-/-</sup> não infectados, mas significativamente menores quando comparado com C57Bl/6 WT infectados, com  $p < 0,01$ . A citocina IL-10 apresenta um perfil similar, com níveis maiores nos animais C57Bl/6 WT infectados quando comparados com o grupo controle, com  $p < 0,01$ . Animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados permaneceram com a expressão dessa citocina inalterada quando comparada com PAFR<sup>-/-</sup> não infectados. Porém, os valores entre os grupos infectados não apresentaram diferença significativa.

Uma vez que estudos experimentais demonstram que moléculas de adesão estão envolvidas nas interações leucócito-endotélio, a expressão de ICAM-1 e VCAM foram analisadas no tecido cerebral de animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> (Figura 19C e D). A expressão de ICAM-1 apresentou um aumento significativo em animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados em relação aos respectivos controles, com  $p < 0,05$ . Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos infectados. Para a molécula VCAM, houve um aumento da expressão em animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados em relação aos controles, entretanto esse aumento não foi significativo.

Diferentes componentes das vias de coagulação parecem desempenhar papéis importantes em mecanismos inflamatórios, criando uma interdependência destes sistemas (YOSHIDA & GRANGER, 2009). Essa característica, somada a detecção de hemorragia no tecido cerebral através de análise histopatológica, levou a análise da expressão do fator tecidual e fator de von Willebrand nesse tecido (Figura 19E e F). Entretanto, os níveis da expressão de mRNA para essas proteínas permaneceram inalterados no tecido cerebral de animais infectados e controles.





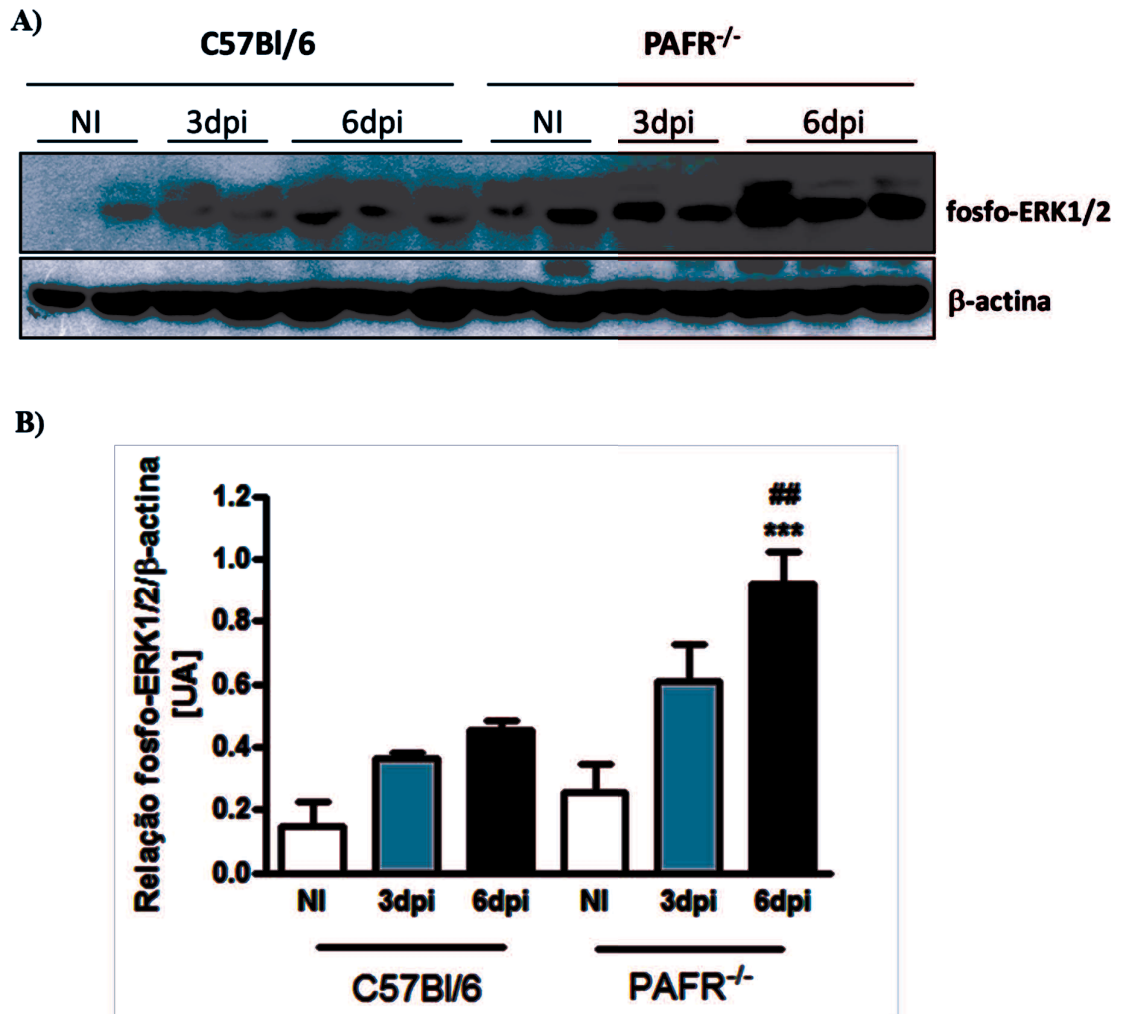
**Figura 19 - Níveis da expressão de IL-1 $\beta$ , IL-10, ICAM-1, VCAM, fator de von Willebrand e fator tecidual no tecido cerebral.**

Animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> controle (NI: não infectado) e infectados (6dpi) com *Plasmodium berghei* ANKA, com um inóculo padronizado de 10<sup>6</sup> hemácias parasitadas pela via intraperitoneal. A expressão de IL-1 $\beta$  apresentou níveis de expressão maiores em animais C57Bl/6 WT infectados quando comparados com o grupo controle, \*\*p<0,01. Os níveis dessa citocina permaneceram inalterados em animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados, mas significativamente menores quando comparado com C57Bl/6 WT infectados, ##p<0,01. A citocina IL-10 apresentou níveis maiores nos animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados quando comparados com o grupo controle, \*\*p<0,01 e \*p<0,05. Adicionalmente, os valores entre os grupos infectados não apresentaram diferença significativa. A expressão de ICAM-1 apresentou um aumento significativo em animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados em relação aos respectivos controles, \*p<0,05. Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos infectados. Os níveis da expressão de mRNA para VCAM, o fator de von Willebrand e do fator tecidual permaneceram inalterados no tecido cerebral de animais infectados e controles. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e submetidos à análise one-way ANOVA com pós-teste Newman-Keuls.

### 5.9 - Perfil da fosforilação de ERK1/2 e da clivagem da caspase-3 durante a infecção

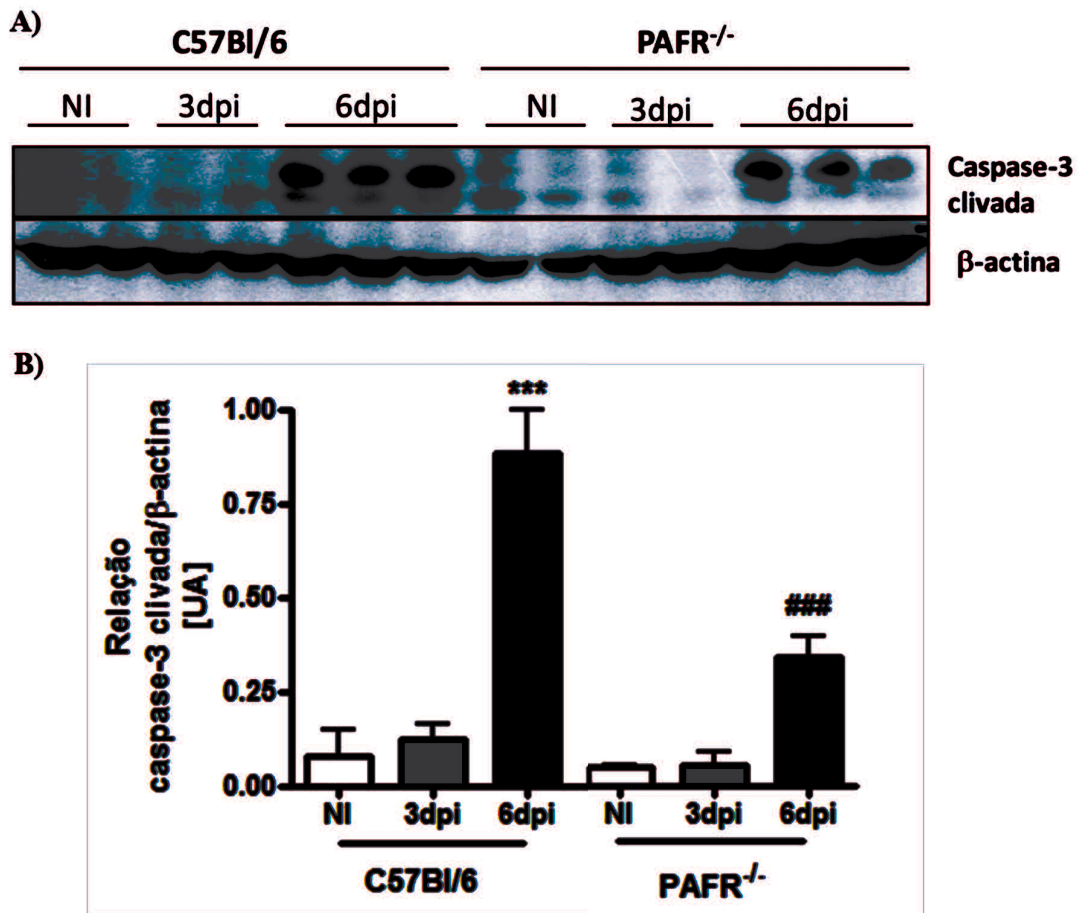
Diante do perfil de citocinas e quimiocinas no tecido cerebral de animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup>, buscou-se analisar o perfil de fosforilação de ERK1/2 (p42/p44), como um indicador na transdução de sinais durante o curso da infecção. A fosforilação de ERK1/2 gera dois fragmentos (42/44kDa), utilizados para a análise funcional para diversas vias de sinalização. A fosforilação de ERK1/2 foi analisada através de Western Blot, em paralelo com a expressão de  $\beta$ -actina, em grupos controle e infectados, após três e seis dias de infecção (Figura 20A). Através da análise de densitometria (Figura 20B), nota-se que animais C57Bl/6 WT apresentam níveis de expressão inalterados das subunidades em animais infectados (3dpi:  $0,363 \pm 0,022$  UA; 6dpi:  $0,454 \pm 0,031$  UA), quando comparado ao grupo controle ( $0,145 \pm 0,084$  UA). Entretanto, animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados (6dpi) ( $0,922 \pm 0,102$  UA), apresentaram um aumento significativo em relação aos animais controle ( $0,255 \pm 0,089$  UA), com  $p < 0,001$ . Adicionalmente, a expressão de ERK1/2 foi significativamente maior em animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados (6dpi) quando comparados com animais C57Bl/6 WT infectados (6dpi), com  $p < 0,01$ .

Para avaliar se PAFR regula a ativação de caspase-3 durante a infecção, extratos protéicos do tecido cerebral de animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> foram examinados para a presença da caspase-3 clivada. A ativação da caspase-3 gera a clivagem da proteína em dois fragmentos (17/19kDa), indicativo de eventos pró-apoptóticos. A clivagem de caspase-3 foi analisada através de Western Blot, em paralelo com a expressão de  $\beta$ -actina, em grupos controle e infectados, após três e seis dias de infecção (Figura 21A). Através da análise de densitometria (Figura 21B), nota-se um aumento significativo da expressão dessas subunidades em animais selvagens no 6dpi ( $0,883 \pm 0,113$  UA), quando comparado ao grupo controle ( $0,077 \pm 0,0695$  UA), com  $p < 0,001$ . Animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados (6dpi) ( $0,343 \pm 0,054$  UA), não apresentaram um aumento significativo em relação aos animais controle ( $0,049 \pm 0,002$  UA). Adicionalmente, a ativação da caspase-3 foi significativamente menor em animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados (6dpi) quando comparados com animais C57Bl/6 WT infectados (6dpi), com  $p < 0,001$ . Dessa forma, a ausência de PAFR atenua a ativação de caspase-3, que pode indicar uma preservação de células endoteliais no tecido cerebral de animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados.



**Figura 20 - Níveis da fosforilação de ERK1/2 (p42/p44), em extratos protéicos do tecido cerebral através de Western Blot.**

Camundongos C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> controle (não infectados: NI) e infectados (3dpi e 6dpi) com *Plasmodium berghei* ANKA, com um inóculo padronizado de 10<sup>6</sup> hemácias parasitadas pela via intraperitoneal. **A:** A fosforilação de ERK1/2 gera dois fragmentos (42/44kDa), que foi analisada através do fracionamento de proteínas (25 µg) do tecido cerebral de grupos controle e infectados (3dpi e 6dpi) em 10% SDS-PAGE, em paralelo com a expressão de β-actina. **B:** Através da análise de densitometria da membrana através do software ImageJ, nota-se que animais WT apresentam níveis de expressão inalterados da expressão de fosfo-ERK1/2 em animais infectados (3dpi e 6dpi), quando comparado ao grupo controle. Entretanto, animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados (6dpi), apresentaram um aumento da expressão de fosfo-ERK1/2 em relação aos animais controle (\*\*p<0,001), que foi significativamente maior quando comparados com animais C57Bl/6 WT infectados (6dpi), <sup>##</sup>p<0,01. Os resultados foram expressos como média ± EPM e submetidos à análise one-way ANOVA com pós-teste Newman-Keuls.

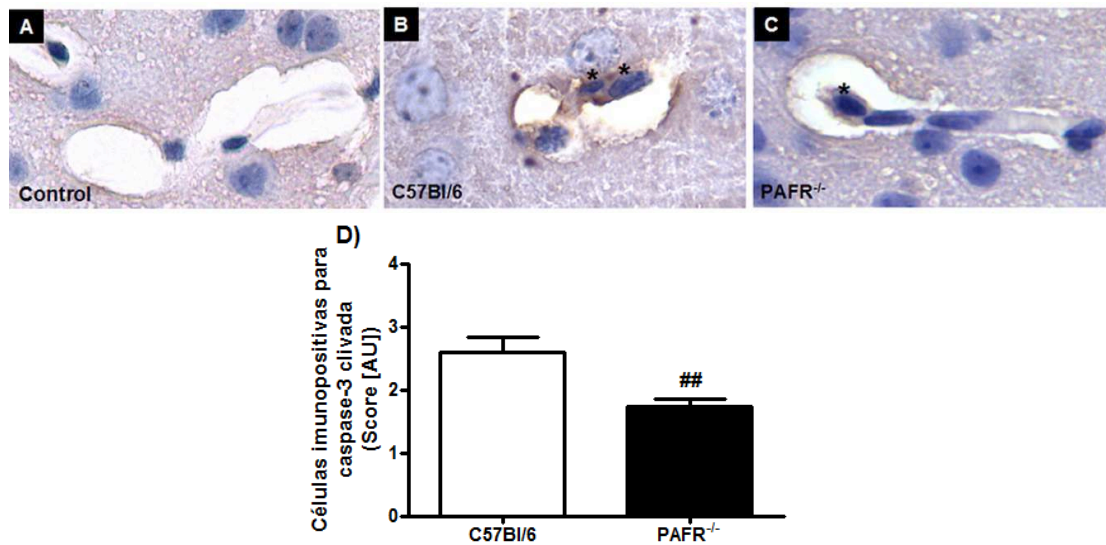


**Figura 21** - Níveis de expressão da caspase-3 clivada em extratos protéicos do tecido cerebral através de Western Blot.

Camundongos C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> controle (não infectados: NI) e infectados (3dpi e 6dpi) com *Plasmodium berghei* ANKA, com um inóculo padronizado de 10<sup>6</sup> hemácias parasitadas pela via intraperitoneal. A ativação da caspase-3 gera a clivagem dessa proteína em dois fragmentos (17/19kDa) e a presença desses fragmentos, com anticorpos específicos, é indicativo de eventos pró-apoptóticos. **A:** A clivagem de caspase-3 foi analisada através do fracionamento de proteínas (25  $\mu$ g) do tecido cerebral de grupos controle e infectados (3dpi e 6dpi) em 15% SDS-PAGE, em paralelo com a expressão de  $\beta$ -actina. **B:** Através da análise de densitometria da membrana através do software ImageJ, nota-se um aumento significativo da expressão desses fragmentos em animais C57Bl/6 WT no 6dpi, quando comparado ao grupo controle, \*\*\*p<0,001. Animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados (6dpi), não apresentaram um aumento significativo em relação aos animais controle. Adicionalmente, a ativação da caspase-3 foi significativamente menor em animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados (6dpi) quando comparados com animais C57Bl/6 WT infectados (6dpi), ###p<0,001. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e submetidos à análise one-way ANOVA com pós-teste Newman-Keuls.

### 5.10 – Expressão de caspase-3 clivada no tecido cerebral

A imunopositividade para caspase-3 clivada em tecido cerebral foi analisada através de imunohistoquímica, para avaliar o tipo celular que pode expressar caspase-3 clivada em decorrência da infecção (Figura 22). A marcação foi ausente no tecido cerebral de animais controles (Figura 22A) enquanto animais C57Bl/6 WT infectados apresentaram marcação em células endoteliais, frequentemente associada com a marcação de leucócitos sequestrados (Figura 22B, asteriscos). Em camundongos PAFR<sup>-/-</sup>, a imunopositividade para a caspase-3 clivada foi menos intensa (Figura 22C, asterisco) quando comparados com animais C57Bl/6 WT infectados, como comprovado pela análise semi-quantitativa, com  $p < 0,01$  (Figura 22D).



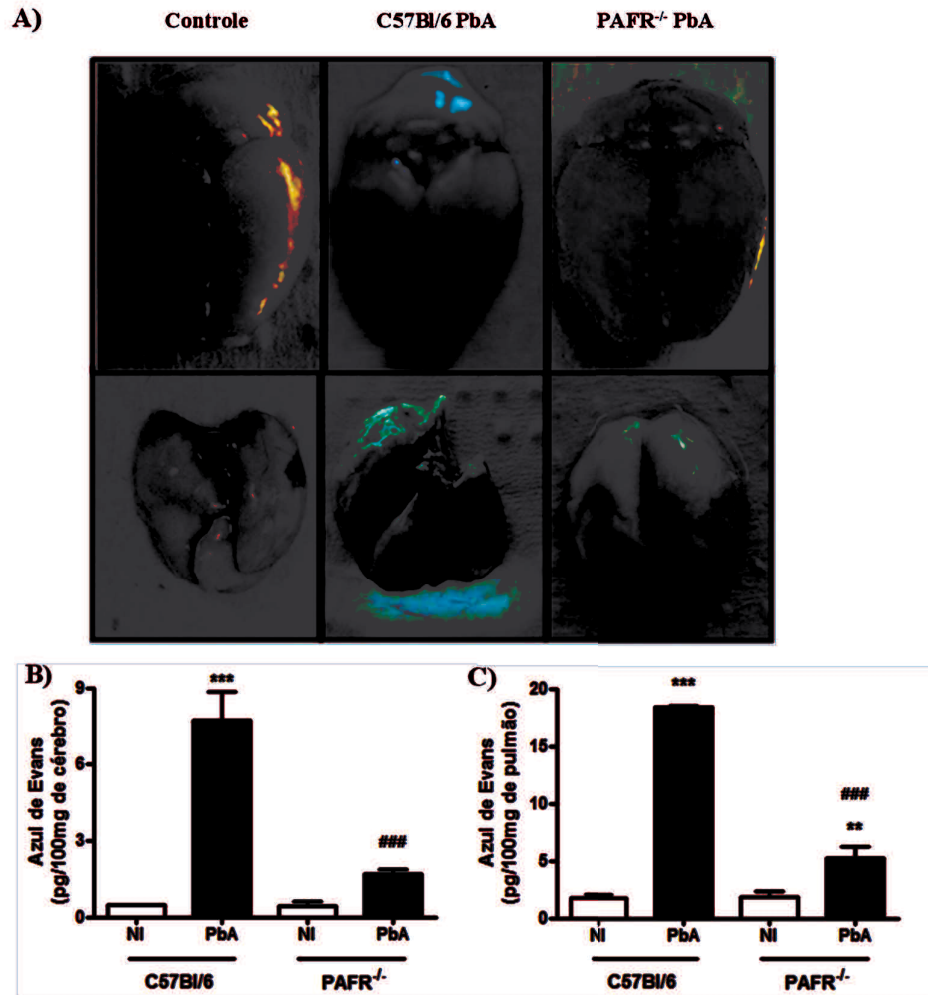
**Figura 22 - Fotomicrografias representativas de imunohistoquímica para caspase-3 clivada em tecido cerebral.**

Animais controles (A), C57Bl/6 WT infectados (B) e PAFR<sup>-/-</sup> infectados (C) com *Plasmodium berghei* ANKA, com um inóculo padronizado de  $10^6$  hemácias. Imunohistoquímica para caspase-3 clivada, com animais controle apresentando ausência de imunomarcagem. Camundongos C57Bl/6 WT infectados (6dpi) apresentando imunoreatividade em leucócitos sequestrados e associados com células endoteliais também marcadas (asteriscos). Em contraste, animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados (6dpi) exibindo imunomarcagem celular menos intensa (asterisco). D: Análise semi-quantitativa para intensidade de células imunopositivas para caspase-3 clivada, com animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentando imunoreatividade celular reduzida, quando comparado com animais C57Bl/6 WT, ##  $p < 0,05$ .

### 5.11 - Avaliação da permeabilidade vascular

Uma vez que a administração de PAF tem sido associada com aumento da permeabilidade vascular, a integridade vascular no tecido cerebral e pulmonar foi avaliada. Através da determinação qualitativa, nota-se um forte extravasamento de Azul de Evans para o parênquima cerebral e pulmonar de animais C57Bl/6 WT infectados (Figura 23A). Através da quantificação do corante extravasado para o parênquima cerebral, pode-se avaliar indiretamente alterações na permeabilidade da BHE. A análise espectrofotométrica do Azul de Evans presente no tecido cerebral comprovou, em animais WT infectados (6dpi), o aumento significativo da concentração do corante no parênquima cerebral ( $7,73 \pm 2,26$  pg de azul de Evans/100mg de tecido), em relação ao grupo controle ( $0,46 \pm 0,02$  pg de azul de Evans/100mg de tecido), com  $p < 0,001$  (Figura 23B). Camundongos PAFR<sup>-/-</sup> infectados permaneceram com níveis inalterados do corante no parênquima cerebral ( $1,71 \pm 0,17$  pg de azul de Evans/100mg de tecido) em relação ao grupo controle ( $0,45 \pm 0,14$  pg de azul de Evans/100mg de tecido). Adicionalmente, animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentaram uma concentração significativamente menor de Azul de Evans no tecido cerebral quando comparado com animais WT infectados ( $p < 0,001$ ). Desta forma, há indícios de modificações na permeabilidade da BHE em animais selvagens, em decorrência da infecção, enquanto animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentam a integridade da BHE preservada.

A integridade vascular do parênquima pulmonar foi quantificada por análise espectrofotométrica (Figura 23C). Animais selvagens infectados apresentaram uma concentração elevada para esse corante ( $18,43 \pm 0,11$  pg de azul de Evans/100mg de tecido) em relação aos animais controles ( $1,78 \pm 0,32$  pg de azul de Evans/100mg de tecido), com  $p < 0,001$ . Animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentaram um incremento nos níveis de Azul de Evans no parênquima pulmonar ( $5,26 \pm 1,02$  pg de azul de Evans/100mg de tecido), quando comparado com animais não-infectados ( $1,86 \pm 0,46$  pg de azul de Evans/100mg de tecido), com  $p < 0,01$ . Entretanto, animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados exibiram um extravasamento do corante menor quando comparado com animais selvagens ( $p < 0,01$ ). De forma resumida, os dados demonstram que a ausência da sinalização de PAFR apresenta um efeito protetor na integridade vascular do pulmão.



**Figura 23** - Avaliação da permeabilidade vascular no parênquima cerebral e pulmonar.

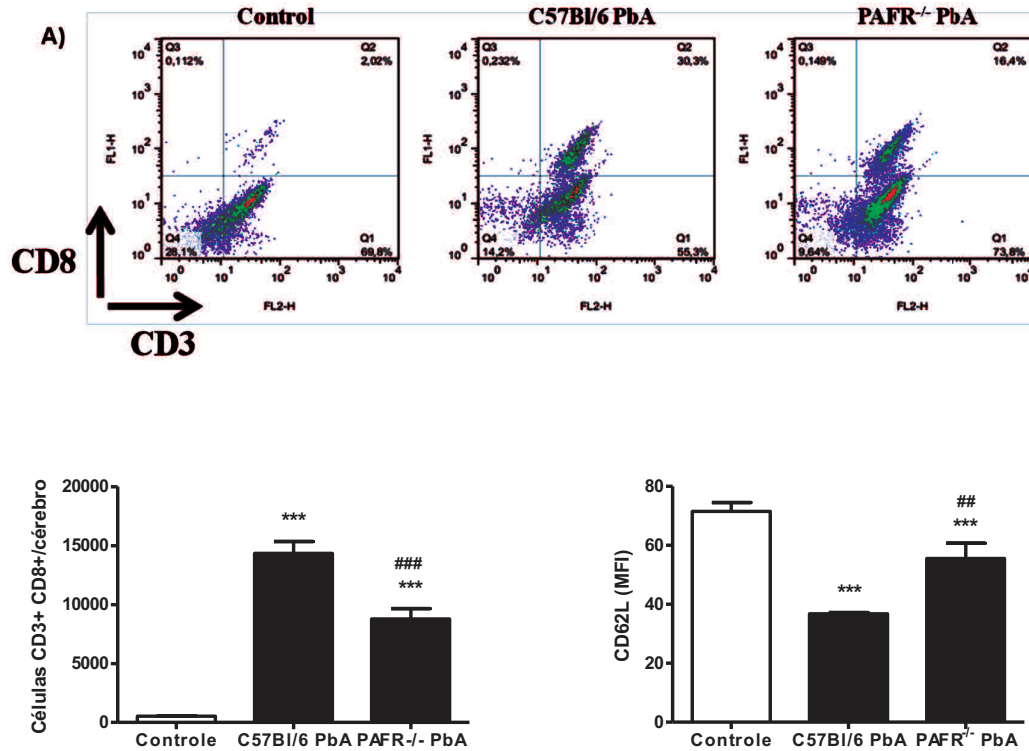
Camundongos C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> controle e infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, com um inóculo padronizado de 10<sup>6</sup> hemácias parasitadas. **A**: Imagem qualitativa do extravasamento de Azul de Evans para o parênquima cerebral e pulmonar em animais controle e animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados. **B** e **C**: Avaliação quantitativa por absorbância do Azul de Evans no parênquima cerebral e pulmonar **B**: Animais C57Bl/6 WT infectados apresentaram um aumento significativo da concentração do corante no parênquima cerebral em relação ao controle, \*\*\*p<0,001. Camundongos PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentaram níveis inalterados do corante no parênquima cerebral, e uma concentração menor quando comparado com animais WT infectados, ####p<0,001. **C**: Animais infectados apresentaram níveis elevados de Azul de Evans no parênquima pulmonar, em relação aos controles, \*\*\*p<0,001 e \*\*p<0,01. Entretanto, animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados exibiram um menor extravasamento do corante quando comparado com animais selvagens, ## p<0,01. Os resultados foram expressos como média ± EPM e submetidos à análise one-way ANOVA com pós-teste Newman-Keuls.

### 5.12 - Análise do perfil celular por citometria de fluxo (FACS)

Após marcação com anticorpos específicos, foi possível avaliar o perfil de linfócitos T CD8<sup>+</sup> recrutados e ativados no tecido cerebral de animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup>, através da técnica de citometria de fluxo (Figura 24A). No tecido cerebral, houve um aumento significativo de células T CD8<sup>+</sup> em animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados ( $143,34 \pm 10,29 \times 10^2$  células/cérebro e  $87,68 \pm 8,85 \times 10^2$  células/cérebro; respectivamente) em relação ao grupo controle ( $5,39 \pm 0,19 \times 10^2$  células/cérebro), com  $p < 0,001$  (Figura 24B). Entretanto, animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentaram um número reduzido dessas células, quando comparado com camundongos C57Bl/6 WT infectados, com  $p < 0,01$ .

A expressão de CD62L foi avaliada como indicador de ativação de células T CD8<sup>+</sup>, uma vez que uma menor expressão dessa molécula está associada com ativação celular. A intensidade de fluorescência média (MFI) de CD62L em linfócitos T CD8<sup>+</sup> diminuiu em animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados ( $36,80 \pm 0,44$  MFI e  $55,53 \pm 5,24$  MFI; respectivamente), em relação ao grupo controle ( $71,50 \pm 3,05$  MFI), com  $p < 0,01$  (Figura 24C). Porém animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentaram uma expressão significativamente maior em relação a camundongos C57Bl/6 WT infectados, com  $p < 0,01$ . Dessa forma, o sequestro e a ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no tecido cerebral, em decorrência da infecção, ocorreu de forma reduzida em animais PAFR<sup>-/-</sup>.





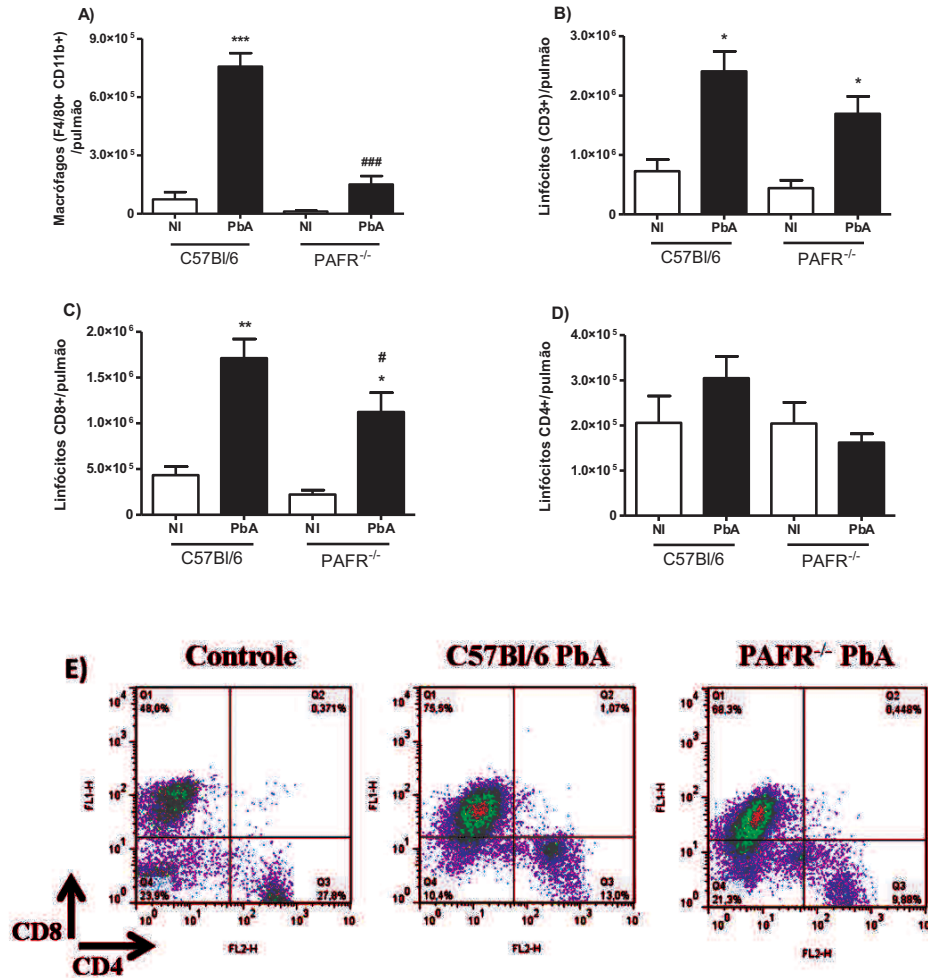
**Figura 24 - Recrutamento e ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no tecido cerebral.**

Análise do perfil de linfócitos T CD8<sup>+</sup> através da técnica de citometria de fluxo em animais controle e C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, com um inóculo padronizado de 10<sup>6</sup> hemácias parasitadas pela via intraperitoneal. **A:** Dot plots representativos de células CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> no tecido cerebral. **B:** Número absoluto de células T CD8<sup>+</sup>, com aumento significativo de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no cérebro de animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados em relação ao grupo controle, \*\*\*p<0,001. Camundongos PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentaram um número reduzido dessas células, quando comparado com camundongos C57Bl/6 WT infectados, ###p<0,001. **C:** Intensidade de fluorescência média (MFI) de CD62L em linfócitos T CD8<sup>+</sup>, como indicador de ativação celular nessa população. Animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentaram diminuição de MFI de CD62L em linfócitos T CD8<sup>+</sup>, em relação ao grupo controle, \*\*\*p<0,001. Porém animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentaram uma expressão significativamente maior em relação a camundongos C57Bl/6 WT infectados, ##p<0,01. Os resultados foram expressos como média ± EPM e submetidos à análise one-way ANOVA com pós-teste Newman-Keuls. MFI: Intensidade de fluorescência média.

A população de macrófagos (F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>) foi avaliada no tecido pulmonar de camundongos C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> (Figura 25A). Animais C57Bl/6 WT infectados apresentaram um aumento significativo de macrófagos ( $75,67 \pm 6,97 \times 10^4$  células/pulmão) em relação ao grupo controle ( $7,36 \pm 3,76 \times 10^4$  células/pulmão), com  $p < 0,001$ . De forma contrária, animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentaram valores de macrófagos ( $15,04 \pm 3,76 \times 10^4$  células/pulmão) semelhantes ao grupo controle ( $1,13 \pm 0,47 \times 10^4$  células/pulmão). Adicionalmente, camundongos PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentaram um número significativamente menor de macrófagos no tecido pulmonar, quando comparado com animais selvagens infectados, com  $p < 0,001$ .

Em decorrência da infecção, houve um aumento de células T CD3<sup>+</sup> no tecido pulmonar de animais infectados (7dpi), (C57Bl/6 WT PbA:  $24,05 \pm 3,39 \times 10^5$  células/pulmão; e PAFR<sup>-/-</sup> PbA:  $16,90 \pm 2,94 \times 10^5$  células/pulmão) em relação aos respectivos grupos controles (C57Bl/6 WT NI:  $7,26 \pm 1,96 \times 10^5$  células/pulmão e PAFR<sup>-/-</sup> NI:  $4,42 \pm 1,33 \times 10^5$  células/pulmão), com  $p < 0,05$  (Figura 25B). A comparação entre os grupos infectados não revelou diferença significativa entre eles. Entretanto, a análise das populações CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> nos pulmões revelou um padrão diferente entre os grupos. A população de CD8<sup>+</sup> no tecido pulmonar (Figura 25C) teve um aumento em decorrência da infecção, (C57Bl/6 WT PbA:  $17,13 \pm 2,10 \times 10^5$  células/pulmão; e PAFR<sup>-/-</sup> PbA:  $11,23 \pm 2,14 \times 10^5$  células/pulmão) em relação aos respectivos grupos controles (C57Bl/6 WT NI:  $4,32 \pm 0,93 \times 10^5$  células/pulmão e PAFR<sup>-/-</sup> NI:  $2,21 \pm 0,47 \times 10^5$  células/pulmão), com  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respectivamente. Porém, PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentaram um número significativamente reduzido de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, quando comparado com animais selvagens infectados ( $p < 0,05$ ). Os níveis de células T CD4<sup>+</sup> nos pulmões não sofreu mudanças em decorrência da infecção (Figura 25D), com C57Bl/6 WT NI =  $2,06 \pm 0,59 \times 10^5$  células/pulmão; PAFR<sup>-/-</sup> NI =  $2,05 \pm 0,47 \times 10^5$  células/pulmão; C57Bl/6 WT PbA =  $3,05 \pm 0,48 \times 10^5$  células/pulmão; e PAFR<sup>-/-</sup> PbA =  $1,62 \pm 0,19 \times 10^5$  células/pulmão.

De forma resumida, as populações de macrófagos e de células T CD8<sup>+</sup> foram recrutadas para o tecido pulmonar em decorrência da infecção, como pode ser notado pelo aumento dessas populações após 7 dias de infecção nos grupos infectados em relação aos seus controles.

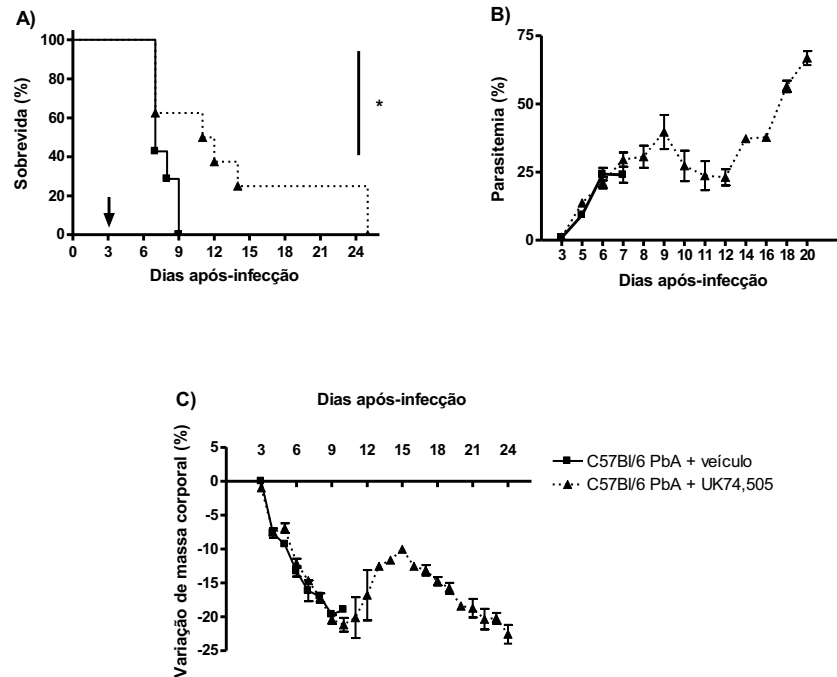


**Figura 25 - Subpopulações de macrófagos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no tecido pulmonar.**

Análise através da técnica de citometria de fluxo em animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> controle e infectados com *Plasmodium berghei* ANKA. **A:** Número absoluto de macrófagos por pulmão, com aumento significativo em animais WT infectados em relação ao controle, \*\*\* $p < 0,001$ . A população de macrófagos permanece inalterada em camundongos PAFR<sup>-/-</sup> infectados, e significativamente menor quando comparado com animais WT infectados, ### $p < 0,001$ . **B:** Aumento de células T CD3<sup>+</sup> no tecido pulmonar de animais infectados, em relação aos respectivos grupos controles, \* $p < 0,05$ . **C:** Aumento da população de CD8<sup>+</sup> no tecido pulmonar em animais infectados em relação aos controles, \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$ . Porém, animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentaram um número menor de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, quando comparado com animais WT infectados, # $p < 0,05$ . **D:** O número de células T CD4<sup>+</sup> nos pulmões, sem alterações em decorrência da infecção. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e submetidos à análise one-way ANOVA com pós-teste Newman-Keuls. **E:** Dot plots representativos de populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no tecido pulmonar de animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup>.

### 5.13 - Tratamento com antagonista de PAFR

O tratamento com antagonistas de PAFR foi realizado para verificar se os efeitos deste fármaco eram semelhantes aos efeitos da deleção gênica desse receptor na malária. Sobrevida, parasitemia e variação de massa corporal foram os parâmetros avaliados nestes animais. O antagonista UK-74,505 foi administrado por via oral (10 mg/kg de peso) em animais C57Bl/6 WT infectados com PbA. O tratamento com este antagonista de PAFR, a partir do terceiro dpi, desencadeou um atraso na letalidade em decorrência da infecção pelo PbA (12 dias) quando comparados a animais que receberam veículo (sete dias), com  $p < 0,05$  (Figura 26A). Não houve diferença na parasitemia enquanto os grupos coexistiram (Figura 26B), porém animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados, que sobreviveram a um período superior a 14 dias de infecção, desenvolveram hiperparasitismo, culminando com o óbito. Quanto à perda de peso, não houve diferença entre os grupos infectados (Figura 26C). Adicionalmente, o perfil da variação de massa corporal apresentou um perfil semelhante quando comparados com animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados, inclusive com recuperação de massa. Resumidamente, esta estratégia terapêutica desencadeou um perfil de proteção semelhante ao encontrado em animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados.



**Figura 26 - Tratamento com antagonista de PAFR previne parcialmente o desenvolvimento da MCE.**

O antagonista de PAFR, UK-74,505, foi administrado oralmente em camundongos C57Bl/6 WT infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, com dose diária 10 mg/kg, a partir do terceiro dia de infecção. **A:** Os animais foram monitorados diariamente e o tratamento de animais C57Bl/6 WT desencadeou um atraso na letalidade (12 dias) quando comparados a animais que receberam veículo (sete dias), \* $p < 0,05$ . **B:** Média das parasitemias diárias a partir do terceiro dia pós-infecção, sem diferença significativa entre as linhagens. **C:** Variação da massa corporal (%) ao longo da infecção, sem diferença enquanto os grupos coexistiram. Dados de parasitemia, e variação de massa corporal foram expressos como média  $\pm$  EPM e avaliados através do teste Two-way ANOVA. Para análise estatística da sobrevivência, foi utilizado o teste Log-rank qui-quadrado.

## 6. Discussão

Nesse trabalho, foi analisado o papel do PAFR no curso da infecção por PbA, usando animais deficientes para PAFR e através do tratamento do antagonista seletivo de PAFR, UK74,505. Com base nos resultados significativos de proteção contra a infecção por PbA em animais PAFR<sup>-/-</sup> ou submetidos a tratamento com o antagonista UK-74,505, podemos sugerir que o bloqueio desse receptor é capaz de prevenir parcialmente o desenvolvimento da MCE.

PAF é um mediador lipídico envolvido no recrutamento de leucócitos, permeabilidade vascular (CHAO & OLSON, 1993) e também tem sido capaz de induzir alterações na permeabilidade da BHE *in vitro* (FANG *et al.*, 2011). Adicionalmente, a inflamação excessiva e a ativação de PAFR durante a infecção pelo vírus da dengue pode acarretar aumento da permeabilidade vascular, aumento dos níveis de citocinas, hemorragias e choque nessa condição (SOUZA *et al.*, 2009).

No presente estudo, a deleção gênica ou o antagonismo de PAFR foi capaz de prolongar a sobrevivência de camundongos infectados com PbA. Diversos estudos consideram que 12 dias de infecção é o tempo máximo no qual o animal infectado poderá desenvolver a MCE. Dessa forma, animais PAFR<sup>-/-</sup> que sobreviveram após esse período são considerados protegidos da MCE. De forma geral, animais infectados desenvolveram uma redução da massa corporal ao longo da infecção. Entretanto, animais PAFR<sup>-/-</sup> protegidos da MCE, a partir do sétimo dpi, apresentaram flutuação de massa corporal, com recuperação parcial desta, que está relacionada com o aumento expressivo do número de leucócitos totais no sangue periférico. Posteriormente, os animais PAFR<sup>-/-</sup> desenvolvem uma segunda queda de massa corpórea, que coincide com o quadro de leucopenia, hiperparasitemia, seguida de óbito.

Vale destacar que a ausência desse receptor não modificou o perfil da parasitemia periférica, sugerindo que PAFR não é relevante para o controle da replicação do parasito e não apresenta propriedade anti-malárica. De forma interessante, trabalhos recentes demonstram que a parasitemia no sangue periférico é indicador ruim da biomassa do parasito, uma vez que mensura somente parasitos circulantes e não é capaz de identificar a presença em tecidos periféricos, em decorrência do sequestro tecidual (AMANTE *et al.*,

2007; AMANTE *et al.*, 2010; BAPTISTA *et al.*, 2010). Amante *et al.*, 2010, em um estudo com PbA transgênico expressando luciferase, compararam a parasitemia no sangue periférico (em esfregaço sanguíneo) com a biomassa total do parasito (através de bioluminescência). Nesse trabalho, identificou-se um crescimento linear da parasitemia periférica em contraste com o crescimento exponencial da biomassa do parasito, indicando o acúmulo de parasitos na microvasculatura, que está fortemente associado com a indução da MCE (AMANTE *et al.*, 2010; BAPTISTA *et al.*, 2010).

Em humanos, a MC manifesta-se principalmente por alterações do nível de consciência, episódios de crises epiléticas, diferentes sinais neurológicos focais, além de alterações cognitivas e comportamentais (NEWTON *et al.*, 2000; IDRO *et al.*, 2005). Adicionalmente, estudos têm demonstrado que a MC causa déficits neurológicos e comportamentais que persistem por longos períodos após a resolução da infecção e a eliminação do parasito com drogas anti-maláricas, especialmente em crianças (HOLDING & SNOW, 2001; BOIVIN, 2002; CARTER *et al.*, 2005b; IDRO *et al.*, 2005; JOHN *et al.*, 2008).

Animais que sucumbem a infecção com um quadro de MCE desenvolvem uma condição neurológica caracterizada por paralisia, ataxia, crise epilética e coma, resultando em uma alta taxa de mortalidade (HUNT *et al.*, 2006). A caracterização de função cognitiva e motora em animais tem sido explorada através de uma gama de testes que exploram fenótipos comportamentais distintos, com diferentes aplicações experimentais (BROOKS & DUNNETT, 2009). A bateria SHIRPA constitui um paradigma dos estudos comportamentais em animais, em uma escala de observações quantitativas e semiquantitativas de reflexos e funções sensoriais básicas (ROGERS *et al.*, 2001; LALONDE *et al.*, 2005).

Lackner *et al.* (2006) avaliaram alterações comportamentais através da bateria SHIRPA em animais C57Bl/6 WT infectados com PbA. Esse foi o primeiro trabalho a utilizar a bateria SHIRPA para o estudo das alterações comportamentais no curso da infecção. O trabalho revelou alterações comportamentais durante a evolução da doença, com prejuízo significativo em todas as categorias analisadas, 36 horas anteriormente ao óbito. O reflexo e função sensorial e estado neuropsiquiátrico foram os primeiros domínios afetados, enquanto função autonômica e tônus muscular e força foram afetados exclusivamente em animais com o quadro de MCE. O estudo também demonstrou um paralelo entre as alterações cognitivas e análises histopatológicas, com correlação negativa

entre escore de animais com o quadro de MCE e área de hemorragia. Em estudo posterior, Lackner *et al.* (2009) estudaram o efeito da droga acetato de glatiramer no modelo de MC, com camundongos C57Bl/6 WT infectados com PbA. O tratamento com o composto foi capaz de reduzir o desenvolvimento da MCE, porém não alterou o curso clínico da doença, com análise através da bateria SHIRPA. Adicionalmente, esse trabalho não demonstrou diferenças em área de hemorragia, através de análise histopatológica, e expressão de caspase-3 clivada no parênquima cerebral de animais tratados com acetato de glatiramer e animais tratados com veículo. Outro estudo com animais C57Bl/6 WT infectados com PbA, demonstrou que animais com baixo escore total da bateria SHIRPA (escore total <15) e com quadro de MCE apresentaram déficits auditivos significativos (SCHMUTZHARD *et al.*, 2010). O trabalho de Reis *et al.* (2010) revelou que animais C57Bl/6 WT infectados com PbA e submetidos a bateria SHIRPA apresentaram prejuízo cognitivo no 6º dpi nos domínios da função motora, função autonômica e reflexo e função sensorial. No sétimo dpi, houve também alterações no tônus muscular e força.

A hipotermia é um achado comum em animais com quadro de MCE e a desregulação da temperatura corporal, abaixo de 30<sup>o</sup>C, em estágios avançados da doença, tem sido utilizada como preditor seguro para o óbito dos animais (CURFS *et al.*, 1989; AMALI *et al.*, 1998; LACKNER *et al.*, 2006). Entretanto, no presente trabalho, essa avaliação não foi realizada. De forma geral, os trabalhos demonstram prejuízos cognitivos em domínios específicos, com pequenas variações de resultados, que podem ser decorrentes de pequenas variações da metodologia empregada, mesmo utilizando um protocolo padrão. No presente trabalho, o perfil das alterações comportamentais nos animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> não diferiu significativamente entre os grupos, enquanto eles coexistiram. Tal fato pode ser decorrente da sensibilidade do teste, uma vez que a bateria SHIRPA é uma excelente ferramenta para a obtenção inicial de fenótipos relativamente amplos. No entanto, não fornece informações suficientemente sensíveis para a discriminação em análises quantitativas específicas (BROOKS & DUNNETT, 2009).

Desruisseaux *et al.* (2008) demonstraram que durante a infecção experimental por PbA, camundongos com MCE apresentavam alterações comportamentais evidentes, com prejuízo da memória visual. A disfunção cognitiva correlaciona-se com processos inflamatórios e hemorrágicos que, na ausência de tratamento, culmina em óbito. Um



trabalho posterior deste grupo demonstrou também comprometimento da atividade locomotora em animais C57Bl/6 WT infectados com PbA (DAI *et al.*, 2010), que corrobora trabalhos anteriores (BALL *et al.*, 2004). De forma complementar, o tratamento com cloroquina nesse modelo é capaz de erradicar os parasitos e prevenir o óbito. Entretanto, mesmo após tratamento, os animais podem apresentar alterações motoras e cognitivas persistentes (DAI *et al.*, 2010; REIS *et al.*, 2010).

A obstrução vascular em decorrência do acúmulo de eritrócitos, plaquetas e leucócitos desempenha importante papel na patogênese da MC (BERENDT *et al.*, 1994; VAN DER HEYDE *et al.*, 2006). A obstrução vascular, hemorragia e dano endotelial são achados histopatológicos comuns no tecido cerebral de animais com o quadro de MCE (BELNOUE *et al.*, 2003; TOGBE *et al.*, 2008; SRIVASTAVA *et al.*, 2008; FAUCONNIER *et al.*, 2011), comum no modelo de infecção por PbA em animais C57Bl/6 (HERMSEN *et al.*, 1997; ENGWERDA *et al.*, 2002). De forma interessante, estudos associam a obstrução vascular com diminuição do fluxo sanguíneo, hipóxia e hemorragia (CABRALES *et al.*, 2010). A ressonância magnética é uma técnica não invasiva que permite a análise de alterações no fluxo vascular e tem sido empregada para estudos de MC. Dados obtidos de estudos que aplicaram a técnica no cérebro de animais infectados com PbA revelaram hemorragia, edema, obstrução vascular e isquemia focal (PENET *et al.*, 2005; TOGBE *et al.*, 2008; FAUCONNIER *et al.*, 2011). As perturbações no fluxo sanguíneo apresentam um paralelo com as lesões observadas através de análise histopatológica no tecido cerebral.

Os dados presentes nesse estudo apresentam paralelo com dados da literatura envolvendo essa manifestação, como o infiltrado inflamatório intravascular e hemorragias mais intensas no cerebelo. Relativo ao acúmulo intravascular de leucócitos em animais infectados com PbA, é válido salientar que esse sequestro não é acompanhado de transmigração para o parênquima perivascular (HEARN *et al.*, 2000), como ocorre na encefalomielite autoimune experimental (EAE) (GLABINSKI *et al.*, 1995). Quanto a hemorragia, trabalhos têm demonstrado que este evento é mais comum no cerebelo e no bulbo olfatório (GRAU *et al.*, 1987) e um quadro de hemorragia cerebelar intensa já foi descrito em um modelo de MCE em animais deficientes em IL-10 e infectados com *Plasmodium chabaudi* (SANNI *et al.*, 2004). Animais protegidos da MCE apresentam formas sutis e até mesmo ausente dessas manifestações histopatológicas (NITCHEU *et al.*,

2003; COBAN *et al.*, 2007; TOGBE *et al.*, 2008; SRIVASTAVA *et al.*, 2008; FAUCONNIER *et al.*, 2011). De forma geral, a proteção à MCE tem sido associada a ausência de alterações histopatológicas e dano a BHE (MIU *et al.*, 2008). Entretanto, as alterações histopatológicas devem ser cuidadosamente avaliadas, uma vez que uma dada característica pode não ser suficiente para prever o dano cerebral. Nitcheu *et al.* (2003), avaliando o tecido cerebral de animais C57Bl/6 WT com quadro de MCE e animais deficientes em perforina e resistentes à manifestação, encontraram similaridades em algumas características histopatológicas. Porém, lesões vasculares com apoptose de células endoteliais foram observadas apenas em animais selvagens com MCE. Em diversos estudos, o sequestro de leucócitos na microvasculatura tem sido considerado um fator que acarreta a obstrução vascular e a patogênese da MC. Mas, embora necessário, o fenômeno de citoaderência não é suficiente para induzir a patologia da MCE, envolvendo interações complexas de leucócitos com o endotélio (NITCHEU *et al.*, 2003).

A patologia induzida por PbA em animais C57Bl/6 WT não é limitada ao SNC e também envolve pulmão, resultando em inflamação pulmonar moderada (PIGUET *et al.*, 2001; LOVEGROVE *et al.*, 2008; TOGBE *et al.*, 2008). Entretanto, o edema pulmonar agudo é um evento raro em animais com MCE, e nunca extensivo ou grave suficientemente para constituir a causa da morte. Vale destacar que a patologia pulmonar associada a malária tem sido uma área negligenciada no estudo das complicações dessa doença. O desenvolvimento de novos modelos de patologia pulmonar associada a malária (dependente da combinação entre parasito e hospedeiro) pode ser útil para o estudo dos eventos e fatores que determinam o progresso do comprometimento pulmonar em diversas condições (EPIPHANIO *et al.*, 2010; VAN DEN STEEN *et al.*, 2010).

Trabalhos anteriores descreveram o modelo com animais DBA/2 infectados com PbA como resistentes a MCE (DELAHAYE *et al.*, 2006) ou com um quadro leve e transitório de MCE (NEILL & HUNT, 1992). Entretanto, o estudo patológico detalhado do cérebro e pulmão, realizado por Epiphanio *et al.* (2010) em animais DBA/2 indicou que a causa da morte foi falência respiratória. As principais alterações histopatológicas no pulmão em animais DBA/2 incluem perda significativa da integridade vascular, edema, hemorragia e infiltrado inflamatório alveolar (EPIPHANIO *et al.*, 2010). Outro modelo, utilizando *P. berghei* K173, descreve animais C57Bl/6 com edema pulmonar associado a infiltrado

inflamatório intersticial, na ausência de sintomatologia cerebral (HEE *et al.*, 2011). Isso demonstra que as síndromes podem ser distintas, uma vez que o cérebro é o órgão primariamente afetado na MCE, enquanto o pulmão é o órgão chave na patogênese em animais DBA/2 infectados com PbA (EPIPHANIO *et al.*, 2010).

O edema pulmonar tem sido correlacionado com a perda da integridade da barreira capilar alveolar (LUH & CHIANG, 2007), com alteração na permeabilidade vascular no tecido (EPIPHANIO *et al.*, 2010). Além disso, trabalhos têm identificado o espessamento dos septos alveolares e congestão de vasos (HEE *et al.* 2011). No presente estudo, o perfil histopatológico em animais C57Bl/6 WT infectados foi caracterizado pela presença de edema intersticial e infiltrado inflamatório nos septos alveolares, compatível com pneumonite. Entretanto, nesse modelo não ocorre infiltrado inflamatório representativo no alvéolo, como demonstrado em estudo anterior (VAN DEN STEEN *et al.*, 2010). Através de análise semi-quantitativa, animais PAFR<sup>-/-</sup> apresentam menor edema intersticial, menor espessamento de septos alveolares e redução do tamanho alveolar, quando comparado com animais selvagens. Dessa forma, a ausência de PAFR também desempenhou efeito na patologia pulmonar associada à malária. Adicionalmente, estudos revelam que PAF medeia a permeabilidade vascular no pulmão e está envolvido na indução de edema nesse órgão (UHLIG *et al.*, 2005). Entretanto, é válido ressaltar que a doença pulmonar pode ser dissociada da MCE, como demonstrado por Fauconnier *et al.* (2011).

Lesões histopatológicas são frequentemente descritas no fígado e no baço de modelos experimentais de malária utilizando roedores (SILVA *et al.*, 2011). O dano hepático já foi demonstrado durante a MCE (FAVRE *et al.* 1999; TOGBE *et al.*, 2007; LOVEGROVE *et al.*, 2008) com hipertrofia e hiperplasia das células de Kupffer, contendo hemozoína, porém sem dano hepático proeminente. A infecção por PbA está associada com a deposição progressiva de hemozoína em células de Kupffer e acúmulo focal de células mononucleares (TOGBE *et al.*, 2007). De forma complementar, Amante *et al.* (2010) demonstraram que o acúmulo de parasitos ocorre especialmente no fígado, um dos sítios de maior sequestro de parasitos. O recrutamento de células T CD8<sup>+</sup> para o tecido cerebral durante os sintomas neurológicos da MCE é um evento amplamente descrito na literatura (YANEZ *et al.*, 1996; HERMSEN *et al.*, 1997; BELNOUE *et al.*, 2002.). Entretanto, Haque *et al.* (2011) demonstraram o acúmulo de células CD8<sup>+</sup> no fígado de animais C57Bl/6 WT infectados

com PbA, embora esse tipo celular não seja responsável pelo dano hepático. De forma geral, ocorre a deposição de pigmento malárico, sem dano hepático proeminente ou áreas de dano necrótico ou lesão granulomatosa. Tal fato ocorre, uma vez que as células CD8<sup>+</sup> recrutadas no fígado permanecem confinadas no lúmen de vasos e não infiltram significativamente no parênquima hepático. De forma contrária, trabalhos demonstram que a cepa PbNK65 é capaz de induzir dano hepático intenso (YOSHIMOTO *et al.* 1998; ADACHI *et al.*, 2001; ADACHI *et al.*, 2004). Os dados obtidos no presente trabalho não distinguiram diferenças significativas nas lesões hepáticas entre animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados.

O baço é precocemente acometido pela doença, com descrição de congestão e macrófagos contendo hemozoína (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 1991; SILVA *et al.*, 2011). Além disso, a hiperplasia da polpa branca é associada com a redução de áreas da bainha linfóide periarteriolar (PALS) e aumento de áreas foliculares e centros germinativos em modelos de malária (ACHTMAN *et al.*, 2003; HELMBY *et al.*, 2000). Adicionalmente, a hematopoiese pode acarretar o aumento no baço de animais infectados, como demonstrado por Villeval *et al.* (1990) utilizando *P. chabaudi adami*. A hiperplasia de células, a retenção de eritrócitos parasitados e de pigmento malárico neste órgão podem explicar aumento do volume do baço. Mudanças na arquitetura esplênica são menos intensas em animais resistentes à infecção (STEVENSON & KRAAL, 1989), uma vez que resposta imune excessiva contribui para mudanças na estrutura do órgão. Entretanto, a intensidade das alterações foi semelhante nos animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup>, no tempo representado. A coloração Azul da Prússia revela o aumento da marcação para pigmento malárico na polpa vermelha de animais infectados, com macrófagos apresentando intensa atividade fagocitária. Entretanto, a identificação do pigmento malárico por Azul da Prússia é similar a coloração H&E, como demonstrado por Silva *et al.* (2011).

A microscopia intravital é uma ferramenta útil para o estudo *in vivo* do tráfego de leucócitos, através do paradigma dos eventos de recrutamento. Em tecidos translúcidos, a microscopia permite a avaliação dos eventos de migração. A investigação do recrutamento de leucócitos por microscopia intravital em órgãos não translúcidos, como o tecido cerebral, é viável com a utilização da epifluorescência, que permite a visualização dos processos de rolamento e adesão (LEY, 2001). Com essa metodologia, leucócitos podem ser

marcados com corantes, como a rodamina (BAATZ *et al.*, 1995) ou através de anticorpos conjugados a fluorocromos (MCDONALD *et al.*, 2008; CABRALES *et al.*, 2010). Uma limitação da técnica empregando rodamina é a incapacidade de distinguir as populações de leucócitos (VILLRINGER *et al.*, 1991). Entretanto, o estudo da população de linfócitos T CD8<sup>+</sup> sequestrados no tecido cerebral foi avaliado através de técnica de citometria de fluxo.

Através de análise histopatológica, nota-se um padrão de sequestro intravascular de leucócitos mais extenso em animais C57Bl/6 WT em relação aos animais da linhagem PAFR<sup>-/-</sup>. Os eventos de rolamento e adesão foram avaliados através de microscopia intravital na microvasculatura cerebral de animais selvagens e PAFR<sup>-/-</sup> infectados. Surpreendentemente, camundongos PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentaram níveis similares de rolamento e adesão de leucócitos quando comparados a animais WT. Essa observação aparentemente discrepante, tráfego de leucócitos similar na microscopia intravital e uma intensidade distinta de infiltrado inflamatório pela análise histopatológica, pode ser explicada, pelo menos em parte, pelo conceito que os sinais que guiam leucócitos através da BHE podem diferir quando consideramos a meninge em contraste com vasos do parênquima cerebral (ENGELHARDT, 2008). Nesse sentido, Rodrigues *et al.* (2011) demonstraram que a ausência de PAFR foi capaz de atenuar o modelo experimental de esclerose múltipla, a encefalomielite autoimune experimental (EAE). Entretanto, a doença moderada em animais PAFR<sup>-/-</sup> era independente dos eventos de rolamento e adesão de leucócitos na microvasculatura cerebral, avaliada por microscopia intravital.

O rolamento e adesão de leucócitos são passos do recrutamento celular que dependem da expressão de uma série de moléculas de adesão e são influenciados pela presença de quimiocinas no tecido (SCHENKEL *et al.*, 2004). O aumento de moléculas de adesão, como ICAM-1 e VCAM, tem sido relacionado com a MC humana e ao modelo experimental, devido seu papel na adesão de eritrócitos infectados e células T em células endoteliais (CHAKRAVORTY & CRAIG, 2005; TRIPATHI *et al.*, 2006; TRIPATHI *et al.*, 2007; HERBAS *et al.*, 2010). A ativação endotelial durante a malária também é capaz de acarretar o aumento da expressão de moléculas de adesão, como ICAM-1 e VCAM (MOXON *et al.*, 2009). No presente trabalho, a infecção por PbA acarretou o aumento da expressão de ICAM-1 no tecido cerebral, entretanto, a ausência de PAFR não foi capaz de prevenir a

expressão dessas moléculas. Dados similares foram encontrados em trabalhos comparativos entre animais com MCE e resistentes (MIU *et al.*, 2008; AMANTE *et al.*, 2007).

Nesse contexto, as quimiocinas são mediadores críticos da migração celular que se ligam a receptores acoplados a proteína G (ALLEN *et al.*, 2007). IP-10/CXCL10 e MIG/CXCL9 são as quimiocinas induzidas precocemente no tecido cerebral de animais C57Bl/6 infectados com PbA, bem como RANTES/CCL5, MCP-1/CCL2 e MIP-1 $\alpha$ /CCL3 (CAMPANELLA *et al.*, 2008). Adicionalmente, esse trabalho demonstrou que CXCR3 é requerido para o recrutamento inicial de células T CD8<sup>+</sup> para o tecido cerebral e desenvolvimento da MCE nesses animais, enquanto animais deficientes em IP-10/CXCL10 ou MIG/CXCL9 foram parcialmente protegidos da MCE. Vale ressaltar que diversos outros trabalhos demonstraram o papel de CXCR3 no desenvolvimento da MCE (HANSEN *et al.*, 2007; VAN DEN STEEN *et al.*, 2008; SRIVASTAVA *et al.*, 2008; MIU *et al.*, 2008). Entretanto, nossos resultados não mostraram diferenças entre animais selvagens e camundongos PAFR<sup>-/-</sup>, para a maioria das quimiocinas avaliadas no tecido cerebral. Entretanto, a quimiocina MCP-1/CCL2 apresentou níveis significativamente menores em animais deficientes em PAFR. É válido salientar que esta quimiocina tem sido associada com alterações da expressão de proteínas envolvidas na composição da BHE e aumento da permeabilidade vascular (TURNER *et al.*, 1994; SONG & PACHTER, 2004).

A citocina IL-10 desempenha papel imunoregulatório em modelos de infecção, como demonstrado por Ho *et al.* (1995), que mostrou que IL-10 é capaz de anular a produção de TNF- $\alpha$  induzida por antígenos de *P. falciparum* em ensaio *in vitro*. Ainda, trabalhos relatam que IL-10 é capaz de reduzir patogenicidade associada ao modelo de MCE com PbA (KOSSODO *et al.*, 1997) ou *Plasmodium chabaudi* (LI *et al.*, 1999; SANNI *et al.*, 2004). Entretanto, no presente trabalho a detecção dessa citocina foi superior em animais susceptíveis à MCE, quando comparado com animais PAFR<sup>-/-</sup>. Esse resultado foi encontrado na avaliação sistêmica através de ELISA e no tecido cerebral através de ELISA e qPCR.

Os resultados séricos para IP-10/CXCL10 apresentam níveis maiores em animais C57Bl/6 WT infectados quando comparado com animais PAFR<sup>-/-</sup>. Trabalho realizado em crianças do Gana, que morreram de MC, inferiu que níveis séricos de IP-10/CXCL10 representam um biomarcador associado com mortalidade (ARMAH *et al.*, 2007). A MCE é

caracterizada pela inflamação cerebral, sequestro intravascular de leucócitos e aumento de citocinas/quimiocinas circulantes (HUNT & GRAU, 2003). Desta forma, o fenótipo inflamatório em animais susceptíveis a MCE é localizado no tecido cerebral, mas também sistêmico, no plasma.

Citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e LT- $\alpha$  desempenham um papel fundamental na patogenia da MC (LOU *et al.*, 1997; GIMENEZ *et al.*, 2003; PRAKASH *et al.*, 2006; WASSMER *et al.*, 2006). O aumento dos níveis séricos de TNF- $\alpha$  durante a MCE é reconhecido há longo tempo (GRAU *et al.*, 1987). Além disso, o sinergismo entre IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  circulantes atua na deterioração da BHE, particularmente ativando células endoteliais (POBER & COTRAN, 1991; GLOOR *et al.*, 2001). O trabalho de Belnoue *et al.* (2003) descreveu o aumento da concentração sérica de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em animais com MCE, enquanto animais protegidos dessa manifestação apresentaram baixos níveis de IL-10. Amante *et al.* (2010) demonstraram que a indução da MCE está fortemente associada com a produção de IFN- $\gamma$  e linfotóxina- $\alpha$ , enquanto TNF- $\alpha$  e IL-10 limita esse processo. Com exceção do dado de IL-10, os resultados apresentam similaridades com os resultados séricos de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  na presente tese. Em paralelo, altos níveis sistêmicos de citocinas podem contribuir para o dano tecidual e choque, como ocorre na sepse (BONE *et al.*, 1997). O bloqueio de PAFR foi capaz de atenuar a inflamação sistêmica em modelo de sepse, com diminuição dos níveis séricos de IL-10, IL-6 e TNF- $\alpha$  (MORENO *et al.*, 2006), um resultado bastante similar aos dados apresentados no presente trabalho.

A infecção por PbA em camundongos DBA/2 revelou que altos níveis circulantes de VEGF estão associados com o desenvolvimento da patologia pulmonar (EPIPHANIO *et al.*, 2010). O presente trabalho demonstra uma maior concentração sérica dessa citocina em animais C57Bl/6 WT infectados com PbA e menores valores em animais PAFR<sup>-/-</sup>. Vale ressaltar, que PAF pode induzir a expressão de VEGF (KO *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2011). Já o papel de IL-6 tem sido amplamente associado a processos de ativação da coagulação (VAN DEVENTER *et al.*, 1990; VAN DER POLLET *et al.*, 1994; BOERMEESTER *et al.*, 1995), perda da integridade vascular e exposição de fator tecidual (VAN DER POLL *et al.*, 1994; LEVI *et al.*, 1997) e indicador de gravidade durante a sepse (MARTIN *et al.*, 1994). No presente trabalho, foi observado um aumento significativo nos níveis séricos de IL-6 em

animais C57Bl/6 WT, entretanto, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos infectados.

No pulmão houve uma redução dos níveis de CCL5 e IFN- $\gamma$  de animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados, que pode explicar a menor patologia e o menor recrutamento de leucócitos recrutados para esse sítio. No baço, a expressão de quimiocinas não foi tão intensa, enquanto a citocina pró-inflamatória (IL-12) e a regulatória (IL-10) foram estimuladas em animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados. De forma interessante, de Souza *et al.* (1997) demonstraram a cinética de produção de IFN- $\gamma$  no baço, com pico de produção maior em linhagens de camundongos resistentes.

Através de qPCR, a expressão de mRNA de IL-1 $\beta$  e IL-10 foi significativamente maior no tecido cerebral de animais selvagens infectados, em contraste com níveis inalterados em animais PAFR<sup>-/-</sup>. Células endoteliais do tecido cerebral expressam IL-1R funcionais que podem ser um sítio importante no qual IL-1 $\beta$  pode exercer diversos efeitos, como a indução de ICAM-1 e dano à BHE, através do comprometimento de proteínas das junções intercelulares (SONG & PACTER, 2004). Além disso, IL-1 $\beta$  induz a expressão de quimiocinas do tipo CXC, que podem contribuir para a passagem de leucócitos da circulação para o parênquima cerebral (ALLAN *et al.*, 2005). Paralelamente, plaquetas podem induzir a secreção de IL-1  $\beta$  (HAWRYLOWICZ *et al.*, 1991; ZIMMERMAN & WEYRICH, 2008), que pode ativar leucócitos e células endoteliais (GRAWAZ *et al.*, 2005; COMBES *et al.*, 2006).

O papel da IL-10 tem sido relatado como protetor durante a malária murina. Em uma linhagem de camundongo susceptível a MCE, a administração de IL-10 foi capaz de conferir um grau de proteção contra a MCE, induzida por PbA (KOSSODO *et al.*, 1997). Embora a IL-10 possa ser crítica na modulação da MCE, os altos níveis encontrados no cérebro de animais selvagens podem contrabalancear com a alta expressão de IL-1 $\beta$  nesses animais. Entretanto, esta explicação é meramente especulativa.

Em 1916, Dudgeon e Clarke, analisando o cérebro de pacientes fatais de MC, sugeriram que um estado de coagulação contribui para a doença (MOXON *et al.*, 2009). Nos últimos anos, a interação entre o sistema de coagulação e a resposta inflamatória, tem sido amplamente estudada. A interdependência da interação entre coagulação e inflamação cria um potente ciclo vicioso, no qual cada processo propaga e intensifica o outro (ESMON *et al.*,



1999; YOSHIDA & GRANGER, 2009), e dá-se em sua forma mais complexa de manifestação pela coagulação intravascular disseminada (CIVD) (TEN CATE, 2003). Além disso, a relação bidirecional entre coagulação e inflamação parece desempenhar um papel importante na patogênese da malária (FRANCISCHETTI *et al.*, 2008) através do aumento da expressão de moléculas de adesão e ativação endotelial com a exposição do fator de von Willebrand e do fator tecidual (MOXON *et al.*, 2009). Em resposta à lesão vascular, plaquetas circulantes interagem com elementos da matriz subendotelial e desencadeiam uma cascata de eventos, com intuito de reparar a lesão e prevenir hemorragias (DELVAEYE & CONWAY, 2009; LOWENBERG *et al.*, 2010; MAJEK *et al.*, 2010).

O fator de von Willebrand (FvW) é uma glicoproteína multimérica, sintetizada e estocada nos corpos de Weibel-Palade de células endoteliais e megacariócitos/plaquetas ( $\alpha$ -grânulos) (SRIVASTAVA *et al.*, 2008; LOWENBERG *et al.*, 2010). Os multímeros do FvW não são encontrados normalmente no plasma, sendo sua liberação limitada aos locais de lesão endotelial (LENTING *et al.*, 2010). A infecção por PbA é capaz de desencadear uma inflamação vascular, com hemorragia e trombo vascular expressando FvW (SRIVASTAVA *et al.*, 2008). Animais deficientes em fator plaquetário 4 (PF4/CXCL4), maior constituinte de grânulos de plaquetas (LAMBERT *et al.*, 2007; SACHAIS *et al.*, 2004), apresentaram proteção para a MCE, com menor inflamação vascular e hemorragia, manutenção da integridade da BHE e menor infiltrado de células CD4 e CD8 (SRIVASTAVA *et al.*, 2008). Adicionalmente, o início do processo de coagulação é dependente da expressão de fator tecidual (OWENS & MACKMAN, 2010), uma glicoproteína que na vigência de lesão endotelial é exposta (FRANCO *et al.*, 2000; VAN DEVENTER *et al.*, 1990). Dessa forma, o fator tecidual apresenta um papel central na iniciação da interação inflamação-coagulação (MARSHALL, 2001; SLOFSTRA *et al.*, 2003; OPAL & ESMON, 2003). De forma interessante, Anthoni *et al.* (2007) demonstraram que o bloqueio deste fator foi capaz de abolir o processo inflamatório e o dano tecidual em modelo de colite, induzido por dextran sulfato de sódio (DSS). Nos últimos anos, a expressão de fator tecidual em células endoteliais vem sendo um alvo interessante no estudo do desenvolvimento de alterações na malária (FRANCISCHETTI *et al.*, 2007). Trabalhos demonstram um aumento da expressão do fator tecidual em células endoteliais de pacientes que evoluíram a óbito após quadro de MC (FRANCISCHETTI *et al.*, 2007; FRANCISCHETTI *et al.*, 2008).

Dessa forma, a expressão de fator de Von Willebrand e fator tecidual foi avaliada no tecido cerebral através de qPCR. Entretanto, não foi possível identificar um aumento significativo na expressão desses constituintes em animais infectados. Porém é válido ressaltar que a expressão do mRNA não está diretamente associada com exposição vascular e leucocitária do fator de von Willebrand e o fator tecidual, processo desencadeado pela infecção.

Devido ao perfil da expressão de citocinas e quimiocinas no tecido cerebral de animais C57Bl/6 WT e PAFR<sup>-/-</sup> infectados, a fosforilação de ERK1/2 foi analisada através de Western Blot, como um indicador na transdução de sinais durante o curso da infecção. Anand *et al.* (2011) descreveram a ativação da quinase JNK no tecido cerebral de animais C57Bl/6 WT infectados com PbA, com envolvimento em morte neuronal. Um trabalho anterior, descreveu a ativação de ERK1/2 em macrófagos após estímulo com glicosilfosfatilinositol (GPI) de *P. falciparum* (ZHU *et al.*, 2005). Estudos relacionam a ativação de ERK1/2, através de indução por LPS, com a produção de TNF- $\alpha$  e de outros mediadores inflamatórios (DUMITRU *et al.*, 2000; PEARSON *et al.*, 2001). A maior expressão de ERK1/2 fosforilado no tecido cerebral de animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados corrobora os dados de ELISA, com maior concentração de TNF- $\alpha$  no tecido cerebral desses animais. Porém, a liberação local e exacerbada de TNF- $\alpha$  é responsável pelo dano celular no ambiente cerebral, com apoptose endotelial, alterações na permeabilidade vascular, edema e hemorragias, eventos que caracterizam a patologia da MC (WASSMER *et al.*, 2006). Entretanto, como discutido a seguir, os resultados de caspase-3 e permeabilidade vascular sugerem uma proteção do endotélio vascular de animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados.

Adicionalmente, a ativação de caspase-3 correlaciona-se com a gravidade clínica da MCE, especialmente em células endoteliais, mesmo em estágios precoces da doença, quando os sinais clínicos apresentam-se moderados (LACKNER *et al.*, 2007). Ademais, células endoteliais imunoreativas para caspase-3 clivada são encontradas em vasos com extensivo sequestro de leucócitos (POTTER *et al.*, 2006). O dano vascular tem sido associado a eventos apoptóticos e parece ser dependente de caspases, uma vez que o tratamento com inibidor de caspases (zVAD-fmk) foi capaz de reduzir a apoptose a níveis basais (WASSMER *et al.*, 2006). Adicionalmente, através de análise histopatológica, áreas de apoptose vascular têm sido associadas a áreas de hemorragias (COMBES *et al.*, 2006).

No presente trabalho, animais C57Bl/6 WT apresentaram aumento da expressão de caspase-3 clivada no tecido cerebral ao longo da infecção. De forma interessante, houve uma menor expressão de caspase-3 clivada no tecido cerebral de camundongos PAFR<sup>-/-</sup> infectados. De acordo com dados de Lackner *et al.* (2007), podemos especular que esta menor expressão de caspase-3 no tecido cerebral de animais PAFR<sup>-/-</sup> pode estar associada com menor quantidade de apoptose em células endoteliais. A marcação de caspase-3 clivada, através de imunohistoquímica, auxiliou na compreensão e afirmação desse processo, com uma intensidade maior em células endoteliais associadas com leucócitos sequestrados, em animais C57Bl/6 WT infectados.

Chang *et al.* (2001) demonstraram que linfócitos CD8<sup>+</sup> medeiam alterações em células endoteliais, com modificações na permeabilidade vascular do cérebro e pulmão durante a infecção por PbA. Tal fato pode ser consequência de perturbações patológicas desencadeadas por mecanismos citotóxicos, que envolvem a participação de proteínas formadoras de poros (perforinas) e indutoras de apoptose (granzimas) (LIEBERMAN, 2003). De forma complementar, a obstrução de vasos e lesões do endotélio podem acarretar o aumento da permeabilidade vascular, que desencadeia o aumento do extravasamento de proteínas. Evidências apontam que a intensa resposta imune desencadeada pela infecção, associada a altos níveis de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores liberados, como PAF, estão envolvidos nesse processo (SRICHAIKUL & NIMMANNITYA, 2000). Historicamente, Migasena e Maegraith (1968) demonstraram o movimento de albumina através da BHE em estudo com *Macaca mulatta* infectados com *P. knowlesi*. Em 1972, Maegraith e Fletcher (1972) demonstraram um aumento excessivo de água e proteínas no tecido cerebral de camundongos infectados com *P. berghei*, criando a hipótese da permeabilidade (POLDER *et al.* 1992), que sugere que o dano a BHE pode causar edema cerebral e disfunção neurológica. Atualmente, modelos murinos de MC têm sido extensivamente estudados para avaliação da função da BHE durante a malária, através da técnica de azul de Evans, albumina marcada ou detecção do extravasamento de fibrinogênio através de IHQ (THUMWOOD *et al.* 1988; MIU *et al.*, 2008; HEE *et al.* 2011).

Uma característica da MCE é a deterioração progressiva da BHE, geralmente associadas com hemorragias perivasculares e acúmulo intravascular de leucócitos e eritrócitos (POLDER *et al.* 1992; DIETRICH 2002; SIBSON *et al.* 2002; GIMENEZ *et al.* 2003).

Em decorrência da infecção por PbA, a BHE é comprometida e esse fator tem sido considerado como o evento principal na patogênese da MCE (PIGUET *et al.*, 2000; WASSMER *et al.*, 2006; HUNT *et al.*, 2006). O dano à BHE tem sido demonstrado pelo acúmulo de Azul de Evans no parênquima cerebral de animais C57Bl/6 WT infectados com PbA. Entretanto, linhagens resistentes apresentam um extravasamento limitado, sugestivo de BHE íntegra (TOGBE *et al.*, 2008; EPIPHANIO *et al.*, 2010; FAUCONNIER *et al.*, 2011). De forma similar, o presente estudo verificou o aumento da permeabilidade vascular cerebral em animais C57Bl/6 WT após infecção por PbA, através da quantificação do corante Azul de Evans extravasado para o parênquima cerebral. De forma contrária, animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentaram níveis menores do corante no parênquima cerebral, sugerindo a integridade vascular da BHE nesses animais.

No pulmão, diversos estudos descrevem infiltrado alveolar significativo, dano ao epitélio alveolar, seguido de edema pulmonar (EPIPHANIO *et al.*, 2010; VAN DEN STEEN *et al.*, 2010). De forma semelhante, o edema pulmonar tem sido correlacionado com danos envolvendo a membrana alveolar (LUH & CHIANG, 2007), com alteração na permeabilidade vascular no tecido, como demonstrado por Epiphanio *et al.* (2010), através da técnica com Azul de Evans, em animais DBA/2. Adicionalmente, o trabalho anterior do modelo apresentou alterações na permeabilidade vascular nesses animais (NEILL & HUNT, 1992). A detecção do extravasamento de fibrinogênio através de IHQ também tem sido utilizada como um indicador de aumento da permeabilidade vascular (HEE *et al.* 2011). No presente trabalho, através da técnica de azul de Evans, o dano endotelial no parênquima pulmonar foi avaliado. O pulmão de animais selvagens apresentou uma alta permeabilidade para esse corante enquanto animais deficientes para PAFR apresentaram níveis menores, sugerindo a integridade vascular nestes animais.

Células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> têm sido implicadas no desenvolvimento da MCE (GRAU *et al.*, 1986; YANEZ *et al.*, 1996; HERMSEN *et al.*, 1997; NITCHEU *et al.*, 2003; MIU *et al.*, 2008; CLASER *et al.*, 2011), embora exerçam funções distintas. Células T CD4<sup>+</sup> desempenham um papel chave na iniciação da patogênese da MCE (GRAU *et al.*, 1986; SENALDI *et al.*, 1994; YANEZ *et al.*, 1996; YANEZ *et al.*, 1999; BOUBOU *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2000). Já o recrutamento de células T CD8<sup>+</sup> para o cérebro ocorre tardiamente, horas antes de os animais começarem a apresentar os sinais neurológicos da MCE (BELNOUE *et*

*al.*, 2002; RÉNIA *et al.*, 2006; LUNDIE *et al.*, 2008; MIYAKODA *et al.*, 2008; BAPTISTA *et al.*, 2010). Belnoue *et al.* (2002) demonstraram que o sequestro de leucócitos associa-se com o desenvolvimento da MCE, e é essencial para sintomas neurológicos e óbito. O sequestro de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no cérebro é um evento essencial para a patogênese em animais susceptíveis ao PbA, como C57Bl/6 (RÉNIA *et al.*, 2006).

Através de estudos comparativos entre modelos murinos de MCE e modelos resistentes a essa manifestação, foi possível estabelecer a correlação entre o número de células T CD8<sup>+</sup> sequestradas no cérebro e o desenvolvimento da patologia (YANEZ *et al.*, 1996; BOUBOU *et al.*, 1999; CHANG *et al.*, 2001; BELNOUE *et al.*, 2002; NITCHEU *et al.*, 2003; BAGOT *et al.*, 2004; RÉNIA *et al.*, 2006; AMANTE *et al.*, 2007; MIU *et al.*, 2008; BAPTISTA *et al.*, 2010). Baptista *et al.*, (2010), investigando a importância da presença de parasitos no tecido cerebral, demonstrou que animais BALB/c, resistentes a MCE, não sequestram células T CD8<sup>+</sup> no tecido cerebral e também não acumulam eritrócitos parasitados. A ausência de células T CD8<sup>+</sup> recrutadas nessa linhagem está associada com a baixa expressão de CXCR3 em células T esplênicas nessa linhagem de camundongos (VAN DEN STEEN *et al.*, 2008). Miu *et al.* (2008) verificaram um aumento no número de células T CD8<sup>+</sup> no cérebro de animais CXCR3<sup>-/-</sup> comparado com o controle, entretanto o número absoluto dessas células foi significativamente menor que animais C57Bl/6 infectados. A depleção de células T regulatórias foi capaz de conferir resistência a animais C57Bl/6 infectados com PbA (AMANTE *et al.*, 2007). A análise do sequestro de leucócitos no tecido cerebral, através de citometria de fluxo, demonstrou um valor similar no número total de leucócitos. Dessa forma, a inflamação cerebral não foi abolida pela depleção de células T regulatórias, mas o tipo celular recrutado foi seletivamente alterado, com redução no número absoluto de linfócitos T CD8<sup>+</sup>.

Adicionalmente, a depleção de linfócitos T CD8<sup>+</sup> é capaz de prevenir completamente os sinais neurológicos da MCE e mortalidade associada a essa manifestação (CHANG *et al.*, 2001; BELNOUE *et al.*, 2002; NITCHEU *et al.*, 2003). Animais deficientes em PKC- $\theta$ , uma proteína envolvida na ativação de linfócitos T, apresentaram resistência à MCE, com menor patologia cerebral e recrutamento e ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (FAUCONNIER *et al.*, 2011). Células CD8<sup>+</sup> acarretam mudanças na permeabilidade vascular, edema, destruição da BHE e posterior hemorragia (CHANG *et al.*, 2001; BELNOUE *et al.*,

2002), embora o mecanismo pelo qual células  $CD8^+$  medeiam a patologia cerebral é ainda pouco conhecido. Entretanto, tem sido sugerido que a via de citólise endotelial mediada por células T  $CD8^+$  é um processo dependente de perforina (NITCHEU *et al.*, 2003; POTTER *et al.*, 1999; POTTER *et al.*, 2006; WASSMER *et al.*, 2006; SUIDAN *et al.*, 2008). Uma vez iniciado, o processo é dificilmente revertido, em um evento dependente do nível de ativação de células endoteliais e do recrutamento e ativação de células  $CD8^+$  (BELNOUE *et al.*, 2002).

Ao contrário de animais C57Bl/6, camundongos deficientes em perforina são totalmente resistentes à patogênese da MCE, com ausência de lesões cerebrais (NITCHEU *et al.*, 2003). Entretanto, o acúmulo de linfócitos T  $CD8^+$  também foi observado em camundongos deficientes em perforina e totalmente resistentes à patogênese da MCE. Dessa forma, o número absoluto de células T  $CD8^+$  sequestradas não é, necessariamente, um indicativo da indução da doença, enquanto o nível de ativação e a expressão de perforina por linfócitos T  $CD8^+$  sim. A transferência adotiva de linfócitos T  $CD8^+$  citotóxicos provenientes de animais C57Bl/6 infectados para camundongos perforina<sup>-/-</sup> foi capaz de induzir o quadro de MCE. O recrutamento pode envolver a interação de quimiocinas e receptores de quimiocinas, uma vez que a susceptibilidade a MCE foi atrasada em animais CCR5<sup>-/-</sup> (NITCHEU *et al.*, 2003). Dessa forma, os resultados demonstram que a via citotóxica dependente de perforina, mas independente de Fas/FasL, está envolvida na patogênese da MCE. Uma vez que a via de perforina e granzimas e a ativação de Fas/FasL são dois mecanismos distintos de morte celular (KAGI *et al.*, 1994; LOWIN *et al.*, 1994). Entretanto, outros trabalhos sugerem que a mutação em genes Fas ou Fas ligante foi capaz de alterar a susceptibilidade a MCE (POTTER *et al.*, 1999; OHNO *et al.*, 2005).

CCR5 tem sido apontado com um receptor importante na regulação da resposta neuroimunoinflamatória (GLASS *et al.*, 2001). De forma interessante, Belnoue *et al.* (2003) demonstraram que no modelo de MCE, ocorre um aumento do sequestro de células CCR5<sup>+</sup>, especialmente células  $CD8^+$  no tecido cerebral, enquanto a deficiência de CCR5 acarreta o tráfego deficiente de linfócitos  $CD8^+$  para o tecido cerebral. Adicionalmente, foi amplamente demonstrado que animais deficientes em CXCR3 são protegidos contra a MCE, com o recrutamento reduzido de linfócitos T  $CD8^+$  no tecido cerebral (CAMPANELLA

*et al.*, 2008). Coban *et al.* (2007) demonstraram que animais MyD88<sup>-/-</sup> eram resistentes à MCE, apresentando alterações histopatológicas sutis no tecido cerebral. A expressão de granzima B foi significativamente inferior no tecido cerebral desses animais quando comparado com animais com o quadro de MCE. De forma complementar, Togbe *et al.* (2008) demonstrou uma redução significativa de células T CD8<sup>+</sup> sequestradas no cérebro de animais LTbR<sup>-/-</sup>, com diminuição de recrutamento e ativação de células CD8<sup>+</sup>, com redução na expressão de perforina, ICAM-1 e CD69.

Uma vez que o recrutamento de células T CD8<sup>+</sup> para o cérebro ocorre tardiamente, horas antes de os animais começarem a apresentar os sinais neurológicos da MCE, a investigação do perfil dessas células no tecido cerebral foi realizada no sétimo dia de infecção, quando animais C57Bl/6 WT apresentavam sinais neurológicos evidentes, como ataxia e coma. A análise das células sequestradas no tecido cerebral demonstra claramente uma significativa redução em células T CD8<sup>+</sup> em animais PAFR<sup>-/-</sup>. O receptor de alojamento linfocitário CD62L (L-selectina) é altamente expresso em células T não ativadas e expresso em níveis menores após ativação dessas células (BUTCHER & PICKER, 1996). Os resultados do trabalho de Nitcheu *et al.* (2003) revelam a ativação de linfócitos T recrutados no tecido cerebral, através da expressão de CD62L. A média de intensidade de fluorescência (MFI) de CD62L em células T CD8<sup>+</sup> foi significativamente menor em animais infectados em relação ao grupo controle, enquanto a expressão em animais PAFR<sup>-/-</sup> foi superior quando comparado com o grupo selvagem infectado. Dessa forma, o recrutamento e a ativação de células T CD8<sup>+</sup> no tecido cerebral foram significativamente menores em animais PAFR<sup>-/-</sup>, sugerindo que a ausência de PAFR prejudica o recrutamento dessas células para o SNC. Adicionalmente, a apoptose de células endoteliais mediada por caspase-3, os efeitos de células T CD8<sup>+</sup> e a sinalização de PAF/PAFR podem ser responsáveis pelo dano da BHE e hemorragias no tecido cerebral de animais infectados com PbA.

De forma interessante, estudos recentes têm demonstrado que células T CD4 e CD8 promovem o acúmulo do parasito em órgãos vitais, incluindo o cérebro (AMANTE *et al.*, 2010). Um novo estudo revelou que células T CD8<sup>+</sup> são responsáveis pelo acúmulo de eritrócitos infectados no modelo de MCE por PbA, em um processo dependente de IFN- $\gamma$  (CLASER *et al.*, 2011). Células T CD4 e CD8 apresentam papel central na MCE, mas

também no dano vascular pulmonar induzido por PbA, sendo a depleção desse tipo celular capaz de prevenir completamente sinais neurológicos da MCE e reduzir sintomas pulmonares (CHANG *et al.*, 2001).

De acordo com a combinação parasito-hospedeiro, estudos demonstram infiltrado leucocitário moderado ou grave no pulmão, com identificação específica de tipos celulares recrutados através da análise por citometria de fluxo em infiltrado leucocitário presente no BAL ou no parênquima pulmonar (CHANG *et al.*, 2001; HEE *et al.* 2011). Em consequência da infecção *Plasmodium berghei* K173, animais C57Bl/6 WT acumularam progressivamente neutrófilos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, com destaque para este último tipo celular no espaço intersticial (HEE *et al.* 2011). As principais alterações histopatológicas no pulmão em animais DBA/2 incluem infiltrado inflamatório alveolar, composto especialmente de neutrófilos e macrófagos (EPIPHANIO *et al.*, 2010). A infecção por PbNK65 desencadeia um aumento de leucócitos totais, macrófagos, neutrófilos e linfócitos no BAL, enquanto a infecção por PbA em C57Bl/6 não é capaz de induzir esse perfil (VAN DEN STEEN *et al.*, 2010). Adicionalmente, o tratamento com dexametasona durante a infecção por PbNK65 diminui o número de macrófagos, células T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> no pulmão e previne a progressão da doença, sugerindo que o infiltrado celular pode desempenhar um papel patogênico na patologia pulmonar associada a malária (VAN DEN STEEN *et al.*, 2010).

Adicionalmente, camundongos PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentaram um número significativamente menor de macrófagos no tecido pulmonar, quando comparado com animais selvagens infectados. É sabido que PAF é um potente estimulador em macrófagos (SNYDER *et al.*, 1985; PRPIC *et al.*, 1988). A população de CD8<sup>+</sup> no tecido pulmonar apresentou um aumento em decorrência da infecção, porém, animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados apresentaram um número significativamente reduzido de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, quando comparado com animais selvagens infectados. Em conjunto, a menor quantidade de macrófagos e células T CD8<sup>+</sup> no tecido pulmonar de animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados pode contribuir para a redução da patogênese pulmonar.

Entretanto, não se pode excluir o envolvimento de plaquetas, micropartículas e eritrócitos infectados na patogênese da MC (WASSMER *et al.*, 2006; AMANTE *et al.*, 2010). O sequestro de eritrócitos parasitados na microcirculação cerebral tem sido associado com a



patogênese na MCE (AMANTE *et al.*, 2010; BAPTISTA *et al.*, 2010). Amante *et al.* (2010) demonstraram que o aumento da biomassa do parasito está fortemente associado com a indução da MCE, e o trabalho de Baptista *et al.*, (2010) investigou a importância da presença de parasitos no tecido cerebral. Em linhagens susceptíveis, como C57Bl/6, as células T CD8 são recrutadas para o cérebro através de quimiocinas, notadamente ligantes de CXCR3, e aderem a células endoteliais ativadas (CAMPANELLA *et al.*, 2008; RÉNIA *et al.*, 2006). Animais protegidos da MCE, através da depleção de células T CD8, apresentaram poucos parasitos no cérebro. Dessa forma, os dados demonstraram que o sequestro de células T CD8<sup>+</sup> no cérebro não é suficiente para o desenvolvimento da MCE em animais C57Bl/6, exigindo a presença concomitante de eritrócitos parasitados para a patogênese dessa manifestação. Entretanto, camundongos tratados com anticorpo anti-IP10 foram protegidos 50-80% do desenvolvimento da MCE, apresentando baixos níveis de células T CD8<sup>+</sup> no tecido cerebral, mas sem diferença reportada para o acúmulo de eritrócitos parasitados (NIE *et al.*, 2009).

O trabalho de Baptista *et al.*, (2010) sugere que a presença de células T CD8 no estágio final da infecção é necessário para o acúmulo de eritrócitos parasitados no tecido cerebral. Dessa forma, a presença local de células CD8 pode ser crucial para modificações no ambiente cerebral, com a ativação de células endoteliais e de moléculas de adesão, que podem auxiliar no sequestro de hemácias infectadas. Entretanto, não se conhece se esse acúmulo de eritrócitos é mediado por uma interação direta com células endoteliais ou pela interação com outras células sequestradas no endotélio cerebral. Além disso, é possível que o acúmulo de eritrócitos, e não de CD8, leve ao comprometimento da BHE. Alternativamente, ambos podem agir em conjunto, sendo que o sequestro de pRBC no cérebro acarrete a reativação *in loco* de células CD8.

Micropartículas são produzidas após remodelamento e vesiculação de membranas celulares durante processos fisiológicos ou patogênicos, como apoptose (COMBES *et al.*, 2010). A formação de micropartículas deriva, em sua maioria, de plaquetas, eritrócitos, leucócitos e células endoteliais, exercendo um papel efetor no desenvolvimento da MC (COMBES *et al.*, 2006; COMBES *et al.*, 2010). A deleção gênica de ABCA1 em camundongos confere a formação mínima de vesiculação e completa proteção contra a MCE (COMBES *et al.*, 2005). Essas estruturas participam na indução da coagulação e

formação de trombos, através da exposição de fator tecidual (HRACHOVINOVA *et al.*, 2003). Além disso, o papel de micropartículas e plaquetas na alteração da BHE tem sido amplamente discutido (COMBES *et al.*, 2006).

Plaquetas potencializam a ação de eritrócitos parasitados e induzem a alterações na integridade vascular, através do aumento da permeabilidade vascular e promovendo a apoptose (WASSMER *et al.*, 2006). Diversos estudos têm demonstrado que células T CD8<sup>+</sup> e plaquetas são capazes de mediar dano endotelial na MCE, com degeneração apoptótica envolvendo dano a BHE (BELNOUE *et al.*, 2002; POTTER *et al.*, 2006; WASSMER *et al.*, 2006). Adicionalmente, plaquetas podem ser diretamente ativadas por mediadores inflamatórios, como o PAF (LEVI & VAN DER POLL, 2005). Entretanto, em contraste com as plaquetas humanas, as plaquetas de camundongos não expressam PAFR e não são responsivas ao PAF (TERASHITA *et al.*, 1985). Mas é válido salientar que esse receptor é expresso em altos níveis em leucócitos e células endoteliais murinas (PRESCOTT *et al.*, 2000).

De forma resumida, trabalhos têm demonstrado que diversas condições são necessárias para o desenvolvimento da MCE, como: 1) infiltrado de linfócitos CD8<sup>+</sup> no tecido cerebral (BELNOUE *et al.*, 2002), 2) capacidade citotóxica de linfócitos CD8<sup>+</sup> recrutados (NITCHEU *et al.*, 2003) e 3) presença de eritrócitos parasitados no cérebro (BAPTISTA *et al.*, 2010).

De forma interessante, o presente trabalho demonstrou que o curso da infecção por PbA é menos grave na ausência ou bloqueio de PAFR. Do ponto-de-vista de mecanismo, a menor patologia cerebral em animais PAFR<sup>-/-</sup> foi associada com a redução do recrutamento e ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no tecido cerebral, alterações histopatológicas menos intensas, menor expressão de caspase-3 clivada e preservação do endotélio, com menor permeabilidade vascular. Adicionalmente, a ausência de PAFR foi capaz de reduzir parâmetros inflamatórios no pulmão em decorrência da infecção por PbA. Dessa forma, o dano vascular no cérebro e pulmão parece ser PAFR-dependente. Entretanto, a proteção nesses camundongos parece não ser explicada pela menor patogenia pulmonar, uma vez que o dano pulmonar em animais C57Bl/6 infectados com PbA é um evento moderado em animais com MCE, e nunca extensivo ou grave suficientemente para constituir a causa da morte.

Foi também demonstrado que a administração do antagonista de PAFR a partir do terceiro dpi foi capaz de conferir uma proteção similar à observada em camundongos PAFR<sup>-/-</sup>. Esses resultados podem ser explicados pelo papel central desempenhado por PAFR através de importantes vias de sinalização na resposta inflamatória. Em conclusão, esses resultados suportam fortemente o papel do PAFR durante a MCE e, pela primeira vez, demonstram que a sinalização através de PAFR é crítica para o desenvolvimento da MCE. Além disso, os resultados também sugerem que o antagonismo de PAFR pode ser uma estratégia terapêutica complementar, associada com o tratamento anti-malárico, na MC humana.

## 7. Conclusões

Os resultados do trabalho sugerem que PAFR desempenha um importante papel na patogênese da infecção experimental por PbA, uma vez que animais deficientes para este receptor apresentaram maior sobrevida à infecção quando comparados a animais C57Bl/6 WT. A ausência desse receptor é capaz de prevenir parcialmente o desenvolvimento da MCE, reduzindo as alterações histopatológicas, ativação de caspase-3 no tecido cerebral, preservando a integridade vascular e o sequestro e ativação de linfócitos CD8<sup>+</sup> no tecido cerebral.

O tratamento com o antagonista de PAFR, UK-74,505, reforçam o efeito protetor, mesmo com a infecção já estabelecida em animais C57Bl/6 WT infectados, com um perfil de proteção semelhante a encontrada em animais PAFR<sup>-/-</sup> infectados. Esta é a primeira demonstração da importância da sinalização de PAFR no desenvolvimento da MCE. Esses resultados também sugerem que o antagonismo de PAFR pode representar uma estratégia terapêutica complementar, associada com o tratamento anti-malárico, e promissora em pacientes com MC.

## 8. Referências

- ACHTMAN, A.H.; KHAN, M.; MACLENNAN, I.C.; LANGHORNE, J. *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice induces strong B cell responses and striking but temporary changes in splenic cell distribution. *J Immunol.* 171:317-324, 2003.
- ADACHI, K.; TSUTSUI, H.; KASHIWAMURA, S.; SEKI, E.; NAKANO, H.; TAKEUCHI, O.; TAKEDA, K.; OKUMURA, K.; VAN KAER, L.; OKAMURA, H.; AKIRA, S.; NAKANISHI, K. *Plasmodium berghei* infection in mice induces liver injury by an IL-12- and Toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88-dependent mechanism. *J Immunol.* 167:5928-5934, 2001.
- ADACHI, K.; TSUTSUI, H.; SEKI, E.; NAKANO, H.; TAKEDA, K.; OKUMURA, K.; VAN KAER, L.; NAKANISHI, K. Contribution of CD1d-unrestricted hepatic DX5+ NKT cells to liver injury in *Plasmodium berghei*-parasitized erythrocyte-injected mice. *Int Immunol.* 16:787-798, 2004.
- ADAM, E.; PIERROT, C.; LAFITTE, S.; GODIN, C.; SAOUDI, A.; CAPRON, M.; KHALIFE J. The age-related resistance of rats to *Plasmodium berghei* infection is associated with differential cellular and humoral immune responses. *Int J Parasitol.* 33:1067-1078, 2003.
- ADAMS, S.; TURNER, G.D.; NASH, G.B.; MICKLEM, K.; NEWBOLD, C.I.; CRAIG, A.G. Differential binding of clonal variants of *Plasmodium falciparum* to allelic forms of intercellular adhesion molecule 1 determined by flow adhesion. *Infect Immun.* 68:264-269, 2000.
- ADAMS, S.; BROWN, H.; TURNER, G. Breaking down the blood-brain barrier: signaling a path to cerebral malaria? *Trends Parasitol.* 18:360-366, 2002.
- ALABASTER, V.A.; KEIR, R.F.; PARRY, M.J.; DE SOUZA, R.N. UK-74,505, a novel and selective PAF antagonist, exhibits potent and long lasting activity in vivo. *Agents Actions Suppl.* 34: 221-227, 1991.
- ALAVI, Y.; ARAI, M.; MENDONZA, J.; TUFET-BAYONA, M.; SINHA, R.; FOWLER, K.; BILLKER, O.; FRANKE-FAYARD, B.; JANSE, C.J.; WATERS, A.; SINEDN, R.E. The dynamics of interactions between *Plasmodium* and the mosquito: a study of the infectivity of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium gallinaceum*, and their transmission by *Anopheles stephensi*, *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Int J Parasitol.* 34:245-247, 2004.

- ALLAN, S.M.; TYRRELL, P.J.; ROTHWELL, N.J. Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol.* 5:629-640, 2005.
- ALLEN, S.J.; CROWN, S.E.; HANDEL, T.M. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol.* 25:787-820, 2007.
- ALLISON, A.C. Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *Br Med J.* 1:190-192, 1954.
- ALVES, H.J.; WEIDANZ, W.; WEISS, L. The spleen in murine *Plasmodium chabaudi adami* malaria: stromal cells, T lymphocytes, and hematopoiesis. *Am J Trop Med Hyg.* 55:370-378, 1996.
- AMANI, V.; BOUBOU, M. I.; MARUSSIG, M.; WALLIKER, D.; MAIZER, D.; RENIA, L. Cloned lines of *Plasmodium berghei* ANKA differ in their abilities to induce experimental cerebral malaria. *Infect Immun.* 66:4093-4099, 1998.
- AMANTE, F.H.; STANLEY, A.C.; RANDALL, L.M.; ZHOU, Y.; HAQUE, A.; MCSWEENEY, K.; WATERS, A.P.; JANSE, C.J.; GOOD, M.F.; HILL, G.R.; ENGWERDA, C.R. A role for natural regulatory T cells in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Am J Pathol.* 171:548-559, 2007.
- AMANTE, F.H.; HAQUE, A.; STANLEY, A.C.; RIVERA, FDE L.; RANDALL, L.M.; WILSON, Y.A.; YEO, G.; PIEPER, C.; CRABB, B.S.; DE KONING-WARD, T.F.; LUNDIE, R.J.; GOOD, M.F.; PINZON-CHARRY, A.; PEARSON, M.S.; DUKE, M.G.; MCMANUS, D.P.; LOUKAS, A.; HILL, G.R.; ENGWERDA, C. R. Immune-mediated mechanisms of parasite tissue sequestration during experimental cerebral malaria. *J Immunol.* 185:3632-3642, 2010.
- AMINO, R.; THIBERGE, S.; MARTIN, B.; CELLI, S.; SHORTE, S.; FRISCHKNECHT, F.; MENARD, R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat Med.* 12:220-224, 2006.
- ANAND, S.S.; BABU, P.P. c-Jun N terminal kinases (JNK) are activated in the brain during the pathology of experimental cerebral malaria. *Neurosci Lett.* 488:118-122, 2011.
- ANDRADE JÚNIOR, H.F.; CORBETT, C.E.; LAURENTI, M.D.; DUARTE, M.I. Comparative and sequential histopathology of *Plasmodium chabaudi*-infected Balb/c mice. *Braz J Med Biol Res.* 24:1209-1218, 1991.

- ANTHONI, C.; RUSSELL, J.; WOOD, K.C.; STOKES, K.Y.; VOWINKEL, T.; KIRCHHOFFER, D.; GRANGER, D.N. Tissue factor: a mediator of inflammatory cell recruitment, tissue injury, and thrombus formation in experimental colitis. *J Exp Med.* 204:1595-1601, 2007.
- ARMAH, H.B.; WILSON, N.O.; SARFO, B.Y.; POWELL M.D.; BOND, V.C.; ANDERSON, W.; ADJEL, A.A.; GYASI R.K.; TETTEY, Y.; WIREDU, E.K.; TONGREN, J.E.; UDHAYAKUMAR, V.; STILES, J.K. Cerebrospinal fluid and serum biomarkers of cerebral malaria mortality in Ghanaian children. *Malar J.* 6:147, 2007.
- ASSOIAN, R.K.; KOMORIYA, A.; MEYERS, C.A.; MILLER, D.M.; SPORN, M.B. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem.* 258:7155-7160, 1983.
- BAATZ, H.; STEINBAUER, M.; HARRIS, A.G.; KROMBACH, F. Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of Rhodamine 6G. *Int J Microcirc.* 15:85-91, 1995.
- BABCOCK, A.A.; KUZIEL, W.A.; RIVEST, S.; OWENS, T. Chemokines expression by glial cells directs leukocytes to sites of axonal injury in the CNS. *J. Neurosci.* 23:7922-7930, 2003.
- BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines – CXC and CC chemokines. *Adv Immunol.* 55:97-179, 1994.
- BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature.* 392: 565-568, 1998.
- BAGOT, S.; NOGUEIRA, F.; COLLETTE, A.; DO ROSARIO, V.; LEMONIER, F.; CAZENAVE, P.A.; PIED, S. Comparative study of brain CD8<sup>+</sup> T cells induced by sporozoites and those induced by blood-stage *Plasmodium berghei* ANKA involved in the development of cerebral malaria. *Infect Immun.* 72:2817-2826, 2004.
- BAILEY, P.J. Sponge implants as models. *Methods Enzymol.* 162:327-334, 1988.
- BAIRD, J.K.; JONES, T.R.; DANUDIRGO, E.W.; ANNIS, B.A.; BANGS, M.J.; BASRI, H.; PURNOMO, MASBAR, S. Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 45:65-76, 1991.
- BALL, H.J.; MACDOUGALL, H.G.; MCGREGOR, I.S.; HUNT, N.H. Cyclooxygenase-2 in the pathogenesis of murine cerebral malaria. *J Infect Dis.* 189:751-758, 2004.
- BALLABH, P.; BRAUN, A.; NEDERGAARD, M. The blood-brain barrier: an overview-structure, regulation and clinical implications. *Neurobiol Dis.* 16:1-13, 2004.

- BANISOR, I.; LEIST, T.P.; KALMAN, B. Involvement of  $\beta$ -chemokines in the development of inflammatory demyelination. *J Neuroinflammation*. 2:1-14, 2005.
- BAPTISTA, F.G.; PAMPLONA, A.; PENA, A.C.; MOTA, M.M.; PIED, S.; VIGÁRIO, A.M. Accumulation of *Plasmodium berghei*-infected red blood cells in the brain is crucial for the development of cerebral malaria in mice. *Infect Immun*. 78:4033-4039, 2010.
- BARCELOS, L.S.; TALVANI, A.; TEIXEIRA, A.S.; VIEIRA, L.Q.; CASSALI, G.D., ANDRADE, S.P.; TEIXEIRA, M.M. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *J Leukoc Biol*. 78:352-358, 2005.
- BARUCHI, D.I.; GORMLEY, J.A.; HOWARD, R.J.; PASLOKE, B.L. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:3497-3502, 1996.
- BELAYEV, L.; BUSTO, R.; ZHAO, W.; GINSBERG, M.D. Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res*. 739:88-96, 1996.
- BELLAMY, R.; KWIATKOWSKI, D.; HILL, A.V. Absence of an association between intercellular adhesion molecule 1, complement receptor 1 and interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphisms and severe malaria in a West African population. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 92:312-316, 1998.
- BELLAVANCE, M.A.; BLANCHETTE, M.; FORTIN, D. Recent advances in blood-brain barrier disruption as a CNS delivery strategy. *AAPS J*. 10:166-177, 2008.
- BELNOUE, E.; KAYIBANDA, M.; VIGARIO, A.M.; DESCHEMIN, J.C.; VAN ROOIJEN, N.; VIGUIER, M., SNOUNOU, G.; RENIA, L. On the pathogenic role of brain-sequestered alphabeta CD8<sup>+</sup> T cells in experimental cerebral malaria. *J Immunol*. 169:6369-6375, 2002.
- BELNOUE, E.; KAYIBANDA, M.; DESCHEMIN, J.C.; VIGUIER, M.; MACK, M.; KUZIEL, W.A.; RENIA, L. CCR5 deficiency decreases susceptibility to experimental cerebral malaria. *Blood*. 101:4253-4259, 2003.
- BELNOUE, E.; POTTER, S.M.; ROSA, D.S.; MAUDUIT, M.; GRÜNER, A.C.; KAYIBANDA, M.; MITCHELL, A.J.; HUNT, N.H.; RENIA, L. Control of pathogenic CD8<sup>+</sup> T cell migration to the brain by IFN-gamma during experimental cerebral malaria. *Parasite Immunol*. 30:544-553, 2008.



- BENVENISTE, J.; HENSON, P.M.; COCHRANE, C.G. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets: the role of IgE, basophils and a platelet-activating factor. *J. Exp. Med.* 136: 1356-1377, 1972.
- BERENDT, A.R.; FERGUSON, D.J.; NEWBOLD, C.I. Sequestration in *Plasmodium falciparum* malaria: sticky cells and sticky problems. *Parasitol Today*. 6:247-254, 1990.
- BERENDT, A.R.; TUMER, G.D.; NEWBOLD, C.I. Cerebral malaria: the sequestration hypothesis. *Parasitol Today*. 10:412-414, 1994.
- BIBER, K.; ZUURMAN, M.W.; DIJKSTRA, I.M.; BODDKE, H. Chemokines in the brains: neuroimmunology and beyond. *Cur Opin Pharmacol*. 2:63-68, 2002.
- BOERMEESTER, M.A.; VAN LEEUWEN, P.A.; COYLE, S.M.; WOLBINK, G.J.; HACK, C.E.; LOWRY, S.F. Interleukin-1 blockade attenuates mediator release and dysregulation of the hemostatic mechanism during human sepsis. *Arch Surg*. 130:739-748, 1995.
- BOIVIN MJ. Effects of early cerebral malaria on cognitive ability in Senegalese children. *J Dev Behav Pediatr*. 23:353-364, 2002.
- BOIVIN, M.J.; BANGIRANA, P.; BYARUGABA, J.; OPOKA, R.O.; IDRO, R.; JUREK, A.M.; JOHN, C.C. Cognitive impairment after cerebral malaria in children: a prospective study. *Pediatrics*. 119:e360-e366, 2007.
- BONDI, F.S. The incidence and outcome of neurological abnormalities in childhood cerebral malaria: a long-term follow-up of 62 survivors. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 86:17-19, 1992.
- BONE, R.C.; GRODZIN, C.J.; BALK, R.A. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*. 112:235-243, 1997.
- BOUBOU, M.I.; COLLETTE, A.; VOEGTLÉ, D.; MAZIER, D.; CAZENAVE, P.A.; PIED, S. T cell response in malaria pathogenesis: selective increase in T cells carrying the TCR V(beta)8 during experimental cerebral malaria. *Int Immunol*. 11:1553-1562, 1999.
- BREWSTER, D.R.; KWIATKOWSKI, D.; WHITE, N.J. Neurological sequelae of cerebral malaria in children. *Lancet*. 336:1039-1043, 1990.
- BROOKS, S.P.; DUNNETT, S.B. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat Rev Neurosci*. 10:519-529, 2009.

- BROWN, H.; TURNER, G.; ROGERSON S.; TEMBO, M.; MWENECHANYA, J.; MOLYNEUX, M.; TAYLOR, T. Cytokine expression in the brain in human cerebral malaria. *J Infect Dis.* 180:1742-1746, 1999.
- BURGMANN, H.; HOLLENSTEIN, U.; WENSCH, C.; THALHAMMER, F.; LOOAREESUWAN, S.; GRANINGER, W. Serum concentrations of MIP-1 alpha and interleukin-8 in patients suffering from acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Immunol Immunopathol.* 76:32-36, 1995.
- BUSSOLINO, F.; CAMUSSI, G.; AGLIETTA, M.; BRAQUET, P.; BOSIA, A.; PESCARMONA, G.; SANAVIO, F.; D'URSO, N.; MARCHISIO, P.C. Human endothelial cells are target for platelet-activating factor. I. Platelet-activating factor induces changes in cytoskeleton structures. *J Immunol.* 139:2439-4246, 1987.
- BUTCHER, E.C.; PICKER, L.J. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science.* 272:60-66, 1996.
- CABRALES, P.; ZANINI, G.M.; MEAYS, D.; FRANGOS, J.A.; CARVALHO, L.J. Murine cerebral malaria is associated with a vasospasm-like microcirculatory dysfunction, and survival upon rescue treatment is markedly increased by nimodipine. *Am J Pathol.* 176:1306-1315, 2010.
- CAMPANELLA, G.S.; TAGER, A.M.; EL KHOURY, J.K.; THOMAS, S.Y.; ABRAZINSKI, T.A.; MANICE, L.A.; COLVIN, R.A.; LUSTER, A.D. Chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9 and CXCL10 are required for the development of murine cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105:4814-4819, 2008.
- CAMUSSI, G.; PAWLOWSKI, I.; TETTA, C.; ROFFINELLO, C.; ALBERTON, M.; BRENTJENS, J.; ANDRES, G. Acute lung inflammation induced in the rabbit by local instillation of 1-0-octadecyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine or of native platelet-activating factor. *Am J Pathol.* 112:78-88, 1983.
- CARROLO, M.; GIORDANO, S.; CABRITA-SANTOS, L.; CORSO, S.; VIGARIO, A.M.; SILVA, S.; LEIRIAO, P.; CARAPAU, D.; ARMAS-PORTELA, R.; COMOGLIO, P.M.; RODRIGUEZ, A.; MOTA, M.M. Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection. *Nat Med.* 9:1363-1369, 2003.
- CARTER, J.A.; ROSS, A.J.; NEVILLE, B.G.R.; OBIERO, E.; KATANA, K.; MUNG'ALA-ODERA, V.; LEES, J.A.; NEWTON, C.R.J.C. Developmental impairments following severe falciparum malaria in children. *Trop Med Int Health.* 10:3-10, 2005a.

- CARTER, J.A.; MUNG'ALA-ODERA, V.; NEVILLE, B.G.R.; MURIRA, G.; MTURI, N.; MUSUMBA, C.; NEWTON, C.R.J.C. Persistent neurocognitive impairments associated with severe falciparum malaria in Kenyan children. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 76:476-481, 2005b.
- CARVALHO, L.J.; LENZI, H.L.; PELAJO-MACHADO, M.; OLIVEIRA, D.N.; DANIEL-RIBEIRO, C.T.; FERREIRA-DA-CRUZ M.F. *Plasmodium berghei*: cerebral malaria in CBA mice is not clearly related to plasma TNF levels or intensity of histopathological changes. *Exp Parasitol*. 95:1-7, 2000.
- CHAKRAVORTY, S.J.; CRAIG, A. The role of ICAM-1 in *Plasmodium falciparum* cytoadherence. *Eur J Cell Biol*. 84:15-27, 2005.
- CHANG, W.L.; JONES, S.P.; LEFER, D.J.; WELBOURNE, T.; SUN, G.; YIN, L.; SUZUKI, H.; HUANG, J.; GRANGER, D.N.; VAN DER HEYDE, H.C. CD8<sup>+</sup>-T-cell depletion ameliorates circulatory shock in *Plasmodium berghei*-infected mice. *Infect Immun*. 69:7341-7348, 2001.
- CHANG, W.L.; LI, J.; SUN, G.; CHEN, H.L.; SPECIAN, R.D.; BERNEY, S.M.; GRANGER, D.N.; VAN DER HEYDE, H.C.. P-selectin contributes to severe experimental malaria but is not required for leukocyte adhesion to brain microvasculature. *Infect Immun*. 71(4):1911-1918, 2003.
- CHANG, K-H.; STEVENSON, M.M. Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. *Int J Parasitol*. 34:1501-1516, 2004.
- CHAO, W.; OLSON, M.S. Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem J*. 292:617-629, 1993.
- CHEN, L.; ZHANG, Z.; SENDO, F. Neutrophils play a critical role in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Clin Exp Immunol*. 120:125-133, 2000.
- CHIZZOLINI, C.; TROTTEIN, F.; BERNARD, F.X.; KAUFMANN, M.H. Isotypic analysis, antigen specificity, and inhibitory function of maternally transmitted *Plasmodium falciparum*-specific antibodies in Gabonese newborns. *Am J Trop Med Hyg*. 45:57-64, 1991.
- CLARK, I.A.; ROCKETT, K.A. The cytokine theory of human cerebral malaria. *Parasitol Today*. 10:410-412, 1994.
- CLARK, I.A.; AWBURN, M.M.; WHITTEN, R.O.; HARPER, C.G.; LIOMBA, N.G.; MOLYNEUX, M.E.; TAYLOR, T.E. Tissue distribution of migration inhibitory factor and inducible nitric oxide synthase in falciparum malaria and sepsis in African children. *Malar J*. 2:6, 2003.

- CLARK, I.A.; COWDEN, W.B. The pathophysiology of falciparum malaria. *Pharmacol Ther.* 99:221-260, 2003.
- CLASER, C.; MALLERET, B.; GUN, S.Y.; WONG, A.Y.; CHANG, Z.W.; TEO, P.; SEE, P.C.; HOWLAND, S.W.; GINHOUX, F.; RÉNIA, L. CD8<sup>+</sup> T cells and IFN- $\gamma$  mediate the time-dependent accumulation of infected red blood cells in deep organs during experimental cerebral malaria. *PLoS One.* 6:e18720, 2011.
- COBAN, C.; ISHII, K.J.; UEMATSU, S.; ARISUE, N.; SATO, S.; YAMAMOTO, M.; KAWAI, T.; TAKEUCHI, O.; HISAEDA, H.; HORII, T.; AKIRA, S. Pathological role of Toll-like receptor signaling in cerebral malaria. *Int Immunol.* 19:67-79, 2007.
- COHEN, S.; BUTCHER, G.A. Serum antibody in acquired malarial immunity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 65:125-135, 1971.
- COHNHEIM J. *Vorlesungen uber allgemeine Pathologie.* Berlin: August Hirschwald Verlag, 1877. *apud* KUBES, P.; KERFOOT, S.M. Leukocyte in the microcirculation: the rolling paradigm revisited. *News Physiol Sci.* 16:76-80, 2001.
- COLTEL, N.; COMBES, V.; WASSMER, S.C.; CHIMINI, G.; GRAU, G.E. Cell vesiculation and immunopathology: implications in cerebral malaria. *Microbes Infect.* 8:2305-2316, 2006.
- COMBES, V.; COLTEL, N.; ALIBERT, M.; VAN ECK, M.; RAYMOND, C.; JUHAN-VAGUE, I.; GRAU, G.E.; CHIMINI, G. ABCA1 gene deletion protects against cerebral malaria: potential pathogenic role of microparticles in neuropathology. *Am J Pathol.* 166:295-302, 2005.
- COMBES, V.; COLTEL, N.; FAILLE, D.; WASSMER, S.C.; GRAU, G.E. Cerebral malaria: role of microparticles and platelets in alterations of the blood-brain barrier. *Int J Parasitol.* 36:541-546, 2006.
- COMBES, V.; EL-ASSAAD, F.; FAILLE, D.; JAMBOU, R.; HUNT, N.H.; GRAU, G.E. Microvesiculation and cell interactions at the brain-endothelial interface in cerebral malaria pathogenesis. *Prog Neurobiol.* 91:140-151, 2010.
- CORDEIRO, R.S.; CUNHA, F.Q.; FILHO, J.A.; FLORES, C.A.; VASCONCELOS, H.N.; MARTINS, M.A. *Plasmodium berghei*: physiopathological changes during infections in mice. *Ann Trop Med Parasitol.* 77:455-465, 1983.
- CURFS, J.H.; SCHETTERS, T.P.; HERMSEN, C.C.; JERUSALEM, C.R.; VAN ZON, A.A.; ELING, W.M. Immunological aspects of cerebral lesions in murine malaria. *Clin Exp Immunol.* 75:136-140, 1989.

- D'AMBROSIO, D.; PANINA-BORDIGNON, P.; SINIGAGLIA, F. Chemokine receptors in inflammation: an overview. *J. Neuroimmunol Methods*. 273:3-13, 2003.
- DAI, M.; REZNIK, S.E.; SPRAY, D.C., WEISS, L.M.; TANOWITZ, H.B.; GULINELLO, M.; DESRUISSEAU, M.S. Persistent cognitive and motor deficits after successful antimalarial treatment in murine cerebral malaria. *Microbes Infect*. 12:1198-207, 2010.
- DAVIS, T.M.; STURM, M.; ZHANG, Y.R.; SPENCER, J.L.; GRAHAM, R.M.; LI, G.Q.; TAYLOR, R.R. Platelet-activating factor and lipid metabolism in acute malaria. *J Infect*. 26:279-285, 1993.
- DAVIS, T.M.; BINH, T.Q.; VAN PHUONG, N.; STURM, M.; ST JOHN, A.; DYER, J.R.; ANH, T.K. The metabolism of platelet-activating factor in severe and cerebral malaria. *J Infect*. 31:181-188, 1995.
- DE SOUZA, J.B.; WILLIAMSON, K.H.; OTANI, T.; PLAYFAIR, J.H. Early gamma interferon responses in lethal and nonlethal murine blood-stage malaria. *Infect Immun*. 65:1593-1598, 1997.
- DE SOUZA, J.B.; RILEY, E.M. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes Infect*. 4:291-300, 2002.
- DEB, C.; HOWE, C.L. Functional characterization of mouse spinal cord infiltrating CD8+ lymphocytes. *J Neuroimmunol*. 214:33-42, 2009.
- DEHARO, E.; COQUELIN, F.; CHABAUD, A.G.; LANDAU, I. The erythrocytic schizogony of two synchronized strains of *Plasmodium berghei* NK65 and ANKA, in normocytes and reticulocytes. *Parasitol Res*. 82:178-182, 1996.
- DELAHAYE, N.F.; COLTEL, N.; PUTHIER, D.; FLORI, L.; HOULGATTE, R.; IRAQI, F.A.; NGUYEN, C.; GRAU, G.E.; RIHET, P. Gene-expression profiling discriminates between cerebral malaria (CM)-susceptible mice and CM-resistant mice. *J Infect Dis*. 193:312-321, 2006.
- DELVAEYE, M.; CONWAY, E.M. Coagulation and innate immune responses: can we view them separately? *Blood*. 114:2367-2374, 2009.
- DEMOPOULOS, C.A.; PINCKARD, R.N.; HANAHAN, D.J. Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). *J Biol Chem*. 254:9355-9358, 1979. *apud* CHAO, W.; OLSON, M.S. Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem J*. 292:617-629, 1993.

- DENG, Y.; FANG, W.; LI, Y.; CEN, J.; FANG, F.; LV, P.; GONG, S.; MAO, L. Blood-brain barrier breakdown by PAF and protection by XQ-1H due to antagonism of PAF effects. *Eur J Pharmacol.* 616:43-47, 2009.
- DENNIS, L.H.; EICHELBERGER, J.W.; INMAN, M.M.; CONRAD, M.E. Depletion of coagulation factors in drug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Blood.* 29:713-721, 1967.
- DESRUISSEAU, M.S.; GULINELLO, M.; SMITH, D.N.; LEE, S.C.; TSUJI, M.; WEISS, L.M.; SPRAY, D.C.; TANOWITZ, H.B. Cognitive dysfunction in mice infected with *Plasmodium berghei* strain ANKA. *J Infect Dis.* 197:1621-1627, 2008.
- DIETRICH, J.B. The adhesion molecule ICAM-1 and its regulation in relation with the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol.* 128:58-68, 2002.
- DOS SANTOS, A.C.; BARSANTE, M.M.; ARANTES, R.M.; BERNARD, C.C.; TEIXEIRA, M.M.; CARVALHO-TAVARES, J. CCL2 and CCL5 mediate leukocyte adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis--an intravital microscopy study. *J Neuroimmunol.* 162:122-129, 2005.
- DRUILHE, P.; KHUSMITH, S. Epidemiological correlation between levels of antibodies promoting merozoite phagocytosis of *Plasmodium falciparum* and malaria-immune status. *Infect Immun.* 55:888-891, 1987.
- DUARTE, M.I.; CORBETT, C.E.; BOULOS, M.; AMATO, N.V. Ultrastructure of the lung in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 34:31-35, 1985.
- DUMITRU, C.D.; CECI, J.D.; TSATSANIS, C.; KONTOYIANNIS, D.; STAMATAKIS, K.; LIN, J.H.; PATRIOTIS, C.; JENKINS, N.A.; COPELAND, N.G.; KOLLIAS, G.; TSICHLIS, P.N. TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell.* 103:1071-1083, 2000.
- ENGELHARDT, B. Immune cell entry into the central nervous system: involvement of adhesion molecules and chemokines. *J Neurol Sci.* 274:23-26, 2008.
- ENGWERDA, C.R.; MYNOTT, T.L.; SAWHNEY, S.; DE SOUZA, J.B.; BICKLE, Q.D.; KAYE, P.M. Locally up-regulated lymphotoxin alpha, not systemic tumor necrosis factor alpha, is the principle mediator of murine cerebral malaria. *J Exp Med.* 195:1371-1377, 2002.
- EPIPHANIO, S.; CAMPOS, M.G.; PAMPLONA, A.; CARAPAU, D.; PENA, A.C.; ATAÍDE, R.; MONTEIRO, C.A.; FÉLIX, N.; COSTA-SILVA, A.; MARINHO, C.R.; DIAS, S.; MOTA, M.M.

- VEGF promotes malaria-associated acute lung injury in mice. *PLoS Pathog.* 6:e1000916, 2010.
- ESMON, C.T.; FUKUDOME, K.; MATHER, T.; BODE, W.; REGAN, L.M.; STEARNS-KUROSAWA, D.J.; KUROSAWA, S. Inflammation, sepsis, and coagulation. *Haematologica.* 84:254-259, 1999.
- FANG, W.; GENG, X.; DENG, Y.; LI, Y.; SHANG, E.; CEN, J.; LV, P. Platelet activating factor induces blood brain barrier permeability alteration in vitro. *J Neuroimmunol.* 230:42-47, 2011.
- FAUCONNIER, M.; BOURIGAULT, M.L.; MEME, S.; SZEREMETA, F.; PALOMO, J.; DANNEELS, A.; CHARRON, S.; FICK, L.; JACOBS, M.; BELOEIL, J.C.; RYFFEL, B.; QUESNIAUX, V.F. Protein kinase C-theta is required for development of experimental cerebral malaria. *Am J Pathol.* 178:212-221, 2011.
- FAVRE, N.; DA LAPEROUSAZ, C.; RYFFEL, B.; WEISS, N.A.; IMHOF, B.A.; RUDIN, W.; LUCAS, R.; PIGUET, P.F. Role of ICAM-1 (CD54) in the development of murine cerebral malaria. *Microbes Infect.* 1:961-968, 1999.
- FERNANDEZ-REYES, D.; CRAIG, A.G.; KYES, S.A.; PESHU, N.; SNOW, R.W. BERENDT, A.R.; MARSH, K.; NEWBOLD, C.I. A high frequency African coding polymorphism in the N-terminal domain of ICAM-1 predisposing to cerebral malaria in Kenya. *Hum Mol Genet.* 6:1357-1360, 1997.
- FIFE, B.T.; PANIAGUA, M.C.; LUKACS, N.W.; KUNKEL, S.L.; KARPUS, W.J. Selective CC chemokine receptor expression by central nervous system-infiltrating encephalitogenic T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res.* 66:705-714, 2001.
- FRANCISCHETTI, I.M.; SEYDEL, K.B.; MONTEIRO, R.Q.; WHITTEN, R.O.; EREXSON, C.R.; NORONHA, A.L.; OSTERA, G.R.; KAMIZA, S.B.; MOLYNEUX, M.E., WARD, J.M.; TAYLOR, T.E. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes induce tissue factor expression in endothelial cells and support the assembly of multimolecular coagulation complexes. *J Thromb Haemost.* 5:155-165, 2007.
- FRANCISCHETTI, I.M.; SEYDEL, K.B.; MONTEIRO, R.Q. Blood coagulation, inflammation, and malaria. *Microcirculation.* 15:81-107, 2008.

- FRANKE-FAYARD, B.; TRUEMAN, H.; RAMESAR, J.; MENDOZA, J.; VAN DER KEUR, M.R.; SINDEN, R.E.; WATERS, A.P.; JANSE, C.J. A *Plasmodium berghei* reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle. *Mol Biochem Parasitol.* 137:23-33, 2004.
- FREVERT, U. Sneaking in through the back entrance: the biology of malaria liver stages. *Trends Parasitol.* 20:417-424, 2004.
- GARCIA, C.C.; RUSSO, R.C.; GUABIRABA, R.; FAGUNDES, C.T.; POLIDORO, R.B.; TAVARES, L.P.; SALGADO, A.P.; CASSALI, G.D.; SOUSA, L.P.; MACHADO, A.V.; TEIXEIRA, M.M. Platelet-activating factor receptor plays a role in lung injury and death caused by Influenza A in mice. *PLoS Pathog.* 6:e1001171, 2010.
- GARNHAN, P.C.C. Malaria parasites and other haemosporidia. *Oxford: Blackwell Scientific Publications*, 1966.
- GAWAZ, M.; LANGER, H.; MAY, A.E. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest.* 115:3378-3384, 2005.
- GIMENEZ, F.; BARRAUD DE LAGERIE, S.; FERNANDEZ, C.; PINO, P.; MAZIER, D. Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of cerebral malaria. *Cell Mol Life Sci.* 60:1623-1635, 2003.
- GLABINSKI, A.R.; TANI, M.; TUOHY, V.K.; TUTHILL, R.J.; RANSOHOFF, R.M. Central nervous system chemokine mRNA accumulation follows initial leukocyte entry at the onset of acute murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun.* 9:315-330, 1995.
- GLASS, W.G.; LIU, M.T.; KUZIEL, W.A., LANE, T.E. Reduced macrophage infiltration and demyelination in mice lacking the chemokine receptor CCR5 following infection with a neurotropic coronavirus. *Virology.* 288:8-17, 2001.
- GLOOR, S.M.; WACHTEL, M.; BOLLIGER, M.F.; ISHIHARA, H.; LANDMANN, R.; FREI, K. Molecular and cellular permeability control at the blood-brain barrier. *Brain Res Brain Res Rev.* 36:258-264, 2001.
- GOOD, M.F.; DOOLAN, D.L. Immune effector mechanisms in malaria. *Curr Opin Immunol.* 11:412-9, 1999.
- GOOD, M.F.; XU, H.; WYKES, M.; ENGWERDA, C. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: Implications for vaccine research. *Annu Rev Immunol.* 23:69-99, 2005.



- GORMLEY, J.A.; HOWARD, R.J.; TARASCHI, T.F. Trafficking of malarial proteins to the host cell cytoplasm and erythrocyte surface membrane involves multiple pathways. *J Cell Biol.* 119:1481-1495, 1992.
- GRAU, G.E.; PIGUET, P.F.; ENGERS, H.D.; LOUIS, J.A.; VASSALI, P.; LAMBERT, P.H. L3T4<sup>+</sup> T lymphocytes play a major role in the pathogenesis of murine cerebral malaria. *J Immunol.* 137:2348-2354, 1986.
- GRAU, G.E.; FAJARDO, L.F.; PIGUET, P.F.; ALLET, B.; LAMBERT, P.H.; VASSALLI, P. Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science.* 237:1220-1212, 1987.
- GRAU, G.E.; TAYLOR, T.E.; MOLYNEUX, M.E.; WIRIMA, J.J.; VASSALLI, P.; HOMMEL, M.; LAMBERT, P.H. Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. *N Engl J Med.* 320:1586-1591, 1989.
- GRAU, G.E.; TACCHINI-COTTIER, F.; VESIN, C.; MILON, G.; LOU, J.N.; PIGUET, P.F.; JUILLARD, P. TNF-induced microvascular pathology: active role for platelets and importance of the LFA-1/ICAM-1 interaction. *Eur Cytokine Netw.* 4:415-419, 1993.
- GRAU, G.E.; KOSSODO, S. Cerebral malaria: Mediators, mechanical obstruction or more? *Parasitol Today.* 10:408-409, 1994.
- GRAU, G.E.; MACKENZIE, C.D.; CARR, R.A.; REDARD, M.; PIZZOLATO, G.; ALLASIA, C.; CATALDO, C.; TAYLOR, T.E.; MOLYNEUX, M.E. Platelet accumulation in brain microvessels in fatal pediatric cerebral malaria. *J Infect Dis.* 187:461-466, 2003.
- GRECH, K.; WATT, K.; READ, A.F. Host-parasite interactions for virulence and resistance in a malaria model system. *J Evol Biol.* 19:1620-1630, 2006.
- HANDUNNETTI, S.M.; VAN SCHRAVENDIJK, M.R.; HASLER, T.; BARNWELL, J.W.; GREENWALT, D.E.; HOWARD, R.J. Involvement of CD36 on erythrocytes as a rosetting receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Blood.* 80:2097-2104, 1992.
- HANSEN, D.S.; BERNARD, N.J.; NIE, C.Q.; SCHOFIELD, L. NK cells stimulate recruitment of CXCR3<sup>+</sup> T cells to the brain during *Plasmodium berghei*-mediated cerebral malaria. *J Immunol.* 178:5779-5788, 2007.
- HANUM, P.S.; HAYANO, M.; KOJIMA, S. Cytokine and chemokine responses in a cerebral malaria-susceptible or -resistant strain of mice to *Plasmodium berghei* ANKA infection: early chemokine expression in the brain. *Int Immunol.* 15:633-640, 2003.

- HAQUE, A.; BEST, S.E.; AMANTE, F.H.; AMMERDORFFER, A.; DE LABASTIDA, F.; PEREIRA, T.; RAMM, G.A.; ENGWERDA, C.R. High parasite burdens cause liver damage in mice following *Plasmodium berghei* ANKA infection independently of CD8(+) T cell-mediated immune pathology. *Infect Immun.* 79:1882-1888, 2011.
- HAWRYLOWICZ, C.M.; HOWELLS, G.L.; FELDMANN, M. Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production. *J Exp Med.* 174:785-790, 1991.
- HEARN, J.; RAYMENT, N.; LANDON, D.N.; KATZ, D.R.; DE SOUZA, J.B. Immunopathology of cerebral malaria: morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature. *Infect Immun.* 68:5364-5376, 2000.
- HEE, L.; DINUDOM, A.; MITCHELL, A.J.; GRAU, G.E.; COOK, D.I.; HUNT, N.H.; BALL, H.J. Reduced activity of the epithelial sodium channel in malaria-induced pulmonary oedema in mice. *Int J Parasitol.* 41:81-88, 2011.
- HELMBY, H.; JÖNSSON, G.; TROYE-BLOMBERG, M. Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. *Infect Immun.* 68:1485-1490, 2000.
- HENSON, P.M. Release of vasoactive amines from rabbit platelets induced by sensitized mononuclear leukocytes and antigen. *J Exp Med.* 131:287-306, 1970. *apud* CHAO, W.; OLSON, M.S. Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem J.* 292 (3): 617-629, 1993.
- HERBAS, M.S.; OKAZAKI, M.; TERAQ, E.; XUAN, X.; ARAI, H.; SUZUKI, H. alpha-Tocopherol transfer protein inhibition is effective in the prevention of cerebral malaria in mice. *Am J Clin Nutr.* 91:200-207, 2010.
- HERMSEN, C.; VAN DE WIEL, T.; MOMMERS, E.; SAUERWEIN, R.; ELING, W. Depletion of CD4+ or CD8+ T-cells prevents *Plasmodium berghei* induced cerebral malaria in end-stage disease. *Parasitology.* 114:7-12, 1997.
- HO, M.; SEXTON, M.M.; TONGTAWA, P.; LOOAREESUWAN, S.; SUNTHARASAMAI, P.; WEBSTER, H.K. Interleukin-10 inhibits tumor necrosis factor production but not antigen-specific lymphoproliferation in acute *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis.* 172:838-844, 1995.

- HØGH, B.; MARBIAH, N.T.; BURGHAUS, P.A.; ANDERSEN, P.K. Relationship between maternally derived anti-*Plasmodium falciparum* antibodies and risk of infection and disease in infants living in an area of Liberia, west Africa, in which malaria is highly endemic. *Infect Immun.* 63:4034-4038, 1995.
- HOLDING, P.A.; SNOW, R.W. Impact of *Plasmodium falciparum* malaria on performance and learning: review of the evidence. *Am J Trop Med Hyg.* 64:68-75, 2001.
- HORSTMANN, R.D.; DIETRICH, M.; BIENZLE, U.; RASCHE, H. Malaria-induced thrombocytopenia. *Blut.* 42:157-164, 1981.
- HUNT, N.H.; GRAU, G.E. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol.* 24:491-499, 2003.
- HUNT, N.H.; GOLENSER, J.; CHAN-LING, T.; PAREKH, S.; RAE, C.; POTTER, S.; MEDANA, I.M.; MIU, J.; BALL, H.J. Immunopathogenesis of cerebral malaria. *Int J Parasitol.* 36:569-582, 2006.
- IDRO, R.; JENKINS, N.E.; NEWTON, C.R. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. *Lancet Neurol.* 4:827-840, 2005.
- IDRO, R.; CARTER, J.A.; FEGAN, G.; NEVILLE, B.G.; NEWTON, C.R. Risk factors for persisting neurological and cognitive impairments following cerebral malaria. *Arch Dis Child.* 91:142-148, 2006.
- IRWIN, S. Comprehensive observational assessment: 1a. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioural and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia.* 13:222-257, 1968.
- ISHII, S.; SHIMIZU, T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog Lipid Res.* 39:41-82, 2000.
- ISHII, S.; NAGASE, T.; SHIMIZU, T. Platelet-activating factor receptor. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69:599-609, 2002.
- JOHN, C.C.; BANGIRANA, P.; BYARUGABA, J.; OPOKA, R.O.; IDRO, R.; JUREK, A.M.; WU, B.; BOIVIN, M.J. Cerebral malaria in children is associated with long-term cognitive impairment. *Pediatrics.* 122:92-99, 2008.
- KÄGI, D.; VIGNAUX, F.; LEDERMANN, B.; BÜRKI, K.; DEPRAETERE, V.; NAGATA, S.; HENGARTNER, H.; GOLSTEIN, P. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science.* 265:528-530, 1994.

- KANTELE, A.; JOKIRANTA, T.S. Review of Cases With the Emerging Fifth Human Malaria Parasite, *Plasmodium knowlesi*. *Clin Infect Dis*. 52:1356-1362, 2011.
- KERFOOT, S.M.; KUBES, P. Overlapping roles of P-selectin and alpha 4-integrin to recruit leukocytes to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol*. 169:1000-1006, 2002.
- KIHARA, M.; CARTER, J.A.; NEWTON, C.R. The effect of *Plasmodium falciparum* on cognition: a systematic review. *Trop Med Int Health*. 11:386-397, 2006.
- KILLICK-KENDRICK, R. Taxonomy, Zoography and Evolution. IN: KILLICK-KENDRICK, R. & PETERS, W. *Rodent Malaria*. London: Academic Press, 1978. págs 1-52.
- KIM, H.A.; SEO, K.H.; KANG, Y.R.; KO, H.M.; KIM, K.J.; BACK, H.K.; LEE, H.K.; IM, S.Y. Mechanisms of platelet-activating factor-induced enhancement of VEGF expression. *Cell Physiol Biochem*. 27:55-62, 2011.
- KIRK, K. Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte. *Physiol Ver*. 81:495-537, 2001.
- KO, H.M.; SEO, K.H.; HAN, S.J.; AHN, K.Y.; CHOI, I.H.; KOH, G.Y.; LEE, H.K.; RA, M.S.; IM, S.Y. Nuclear factor kappaB dependency of platelet-activating factor-induced angiogenesis. *Cancer Res*. 62:1809-1814, 2002.
- KOK, J.P.; BOON, M.E. *Microwave Cook Book for Microscopists*, 3rd ed. Leyden: Coulomb Press Leyden, 1992.
- KONING-WARD, T.F.; GILSON, P.R.; BODDEY, J.A.; RUG, M.; SMITH, B.J.; PAPENFUSS, A.T.; SANDERS, P.R.; LUNDIE, R.J.; MAIER, A.G.; COWMAN, A.F.; CRABB, B.S. A newly discovered protein export machine in malaria parasites. *Nature*. 459:945-949, 2009.
- KORNECKI, E.; EHRLICH, Y.H. Neuroregulatory and neuropathological actions of the ether-phospholipid platelet-activating factor. *Science* 240:1792-1794, 1988.
- KOSSODO, S.; GRAU, G.E. Profiles of cytokines production in relation with susceptibility to cerebral malaria. *J. Immunol*. 151:4811-4820, 1993.
- KOSSODO, S.; MONSO, C.; JUILLARD, P.; VELU, T.; GOLDMAN, M.; GRAU, G.E. Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria. *Immunology*. 91:536-540 1997.
- KRISHNA, S.; TAYLOR, A.M.; SUPANARANOND, W.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; TER KUILE, F.; TAWFIQ, K.M.; HOLLOWAY, P.A.; WHITE, N.J. Thiamine deficiency and malaria in adults from southeast Asia. *Lancet*. 353:546-549, 1999.

- KUBES, P.; KERFOOT, S.M. Leukocyte in the microcirculation: the rolling paradigm revisited. *News Physiol. Sci.* 16:76-80, 2001.
- KUBES, P. The complexities of leukocyte recruitment. *Semin Immunol.* 14:65-72, 2002.
- KUMAR, R.; HARVEY, S.A.K.; KESTER, M.; HANAHAN, D.J.; OLSON, M.S. Production and effects of platelet-activating factor in the rat brain. *Biochim Biophys Acta.* 963:375-383, 1988.
- KWIATKOWSKI, D.; HILL, A.V.; SAMBOU, I.; TWUMASI, P.; CASTRACANE, J.; MANOGUE, K.R.; CERAMI, A.; BREWSTER, D.R.; GREENWOOD, B.M. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet.* 336:1201-1204, 1990.
- LACERDA-QUEIROZ, N.; TEIXEIRA, M.M.; TEIXEIRA, A.L. Imunopatogênese da malária cerebral. *Revista Brasileira de Neurologia.* 44:13-19, 2008.
- LACERDA-QUEIROZ, N.; RODRIGUES, D.H.; VILELA, M.C.; MIRANDA, A.S.; AMARAL, D.C.; CAMARGOS, E.R.; CARVALHO, L.J.; HOWE, C.L.; TEIXEIRA, M.M.; TEIXEIRA, A.L. Inflammatory changes in the central nervous system are associated with behavioral impairment in *Plasmodium berghei* (strain ANKA)-infected mice. *Exp Parasitol.* 125:271-8, 2010.
- LACKNER, P.; BEER, R.; HEUSSLER, V.; GOEBEL, G.; RUDZKI, D.; HELBOK, R.; TANNICH, E.; SCHMUTZHARD, E. Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 32:177-188, 2006.
- LACKNER, P.; BURGER, C.; PFALLER, K.; HEUSSLER, V.; HELBOK, R.; MORANDELL, M.; BROESSNER, G.; TANNICH, E.; SCHMUTZHARD, E.; BEER, R. Apoptosis in experimental cerebral malaria: spatial profile of cleaved caspase-3 and ultrastructural alterations in different disease stages. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 33:560-571, 2007.
- LACKNER, P.; PART, A.; BURGER, C.; DIETMANN, A.; BROESSNER, G.; HELBOK, R.; REINDL, M.; SCHMUTZHARD, E.; BEER, R. Glatiramer acetate reduces the risk for experimental cerebral malaria: a pilot study. *Malar J.* 8:36, 2009.
- LALONDE, R.; DUMONT, M.; STAUFENBIEL, M.; STRAZIELLE, C. Neurobehavioral characterization of APP23 transgenic mice with the SHIRPA primary screen. *Behav Brain Res.* 157:91-98, 2005.

- LAMB, T.J.; BROWN, D.E.; POCOTNIK, A.J.; LANGHORNE, J. Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. *Expert Rev. Mol. Med.* 8:1-22, 2006.
- LAMBERT, M.P.; SACHAIS, B.S.; KOWALSKA, M.A. Chemokines and thrombogenicity. *Thromb Haemost.* 97:722-729, 2007.
- LANDAU, I.; BOULARD, Y. Life cycles and Morphology. IN: KILLICK-KENDRICK, R.; PETERS, W. *Rodent Malaria*. London: Academic Press, 1978. págs 53-84.
- LANGHORNE, J. Immunology and Immunopathogenesis of Malaria. Berlin: Springer, 2005.
- LENTING PJ, PEGON JN, CHRISTOPHE OD, DENIS CV. Factor VIII and von Willebrand factor--too sweet for their own good. *Haemophilia.* 16:194-199, 2010.
- LEVI, M.; VAN DER POLL, T.; TEN CATE, H.; VAN DEVENTER, S.J. The cytokine-mediated imbalance between coagulant and anticoagulant mechanisms in sepsis and endotoxaemia. *Eur J Clin Invest.* 27:3-9, 1997.
- LEVI, M.; VAN DER, POLL T. Two-way interactions between inflammation and coagulation. *Trends Cardiovasc Med.* 15:254-259, 2005.
- LEY, K. *Physiology of Inflammation*. New York: Oxford University Press, 2001.
- LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M.I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 7:678-689, 2007.
- LI, C.; CORRALIZA, I.; LANGHORNE, J. A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice. *Infect Immun.* 6:4435-4442, 1999.
- LI, C.; SEIXAS, E.; LANGHORNE, J. Rodent malarias: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite. *Med Microbiol Immunol.* 189:115-126, 2001.
- LI, J.; CHANG, W.L.; SUN, G.; CHEN, H.L.; SPECIAN, R.D.; BERNEY, S.M., KIMPEL, D.; GRANGER, D.N.; VAN DER HEYDE, H.C. Intercellular adhesion molecule 1 is important for the development of severe experimental malaria but is not required for leukocyte adhesion in the brain. *J Investig Med.* 51:128-140, 2003.
- LIEBERMAN, J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol.* 3:361-370, 2003.
- LOOAREESUWAN, S.; SJOSTROM, L.; KRUDSOOD, S.; WILAIRATANA, P.; PORTER, R.; HILLS, F.; WARRELL D.A.A. Polyclonal anti-tumor necrosis factor-alpha Fab used as an ancillary treatment for severe malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 61:26-33, 1999.

- LORANT, D.E.; ZIMMERMAN, G.A.; MCINTYRE, M.T.; PRESCOTT, S.M. Platelet-activating factor mediates procoagulant activity on the surface of endothelial cells by promoting leukocyte adhesion. *Semin Cell Biol.* 6:295-303, 1995.
- LOU, J.; DONATI, Y. R.; JUILLARD, P.; GIROUD, C.; VESIN, C.; MILI, N.; GRAU, G.E. Platelets play an important role in TNF-induced microvascular endothelial cell pathology. *Am J Pathol.* 151:1397-1405, 1997.
- LOU, J.; LUCAS, R.; GRAU, G. E. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clin Microbiol Rev.* 14:810-820, 2001.
- LOVEGROVE, F.E.; GHARIB, S.A.; PENA-CASTILLO, L.; PATEL, S.N.; RUZINSKI, J.T.; HUGHES, T.R.; LILES, W.C.; KAIN, K.C. Parasite burden and CD36-mediated sequestration are determinants of acute lung injury in an experimental malaria model. *PLoS Pathog.* 4:e1000068, 2008.
- LÖWENBERG, E.C.; MEIJERS, J.C.; LEVI, M. Platelet-vessel wall interaction in health and disease. *Neth J Med.* 68:242-251, 2010.
- LOWIN, B.; HAHNE, M.; MATTMANN, C.; TSCHOPP, J. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature.* 370:650-652, 1994.
- LUCAS, R.; JUILLARD, P.; DECOSTER, E.; REDADR, M.; BURGER, D.; DONATI, Y.; GIROUD, C.; MONSO-HINARD, C.; DE-KESEL, T.; BUURMAN, W.A.; MOORE, M.W.; FAYER, J.M.; FIERS, W.; BLUETHMANN, H.; GRAU, G.E. Crucial role for tumour necrosis factor (TNF) receptor 2 and membrane bound TNF in experimental cerebral malaria. *Eur J Immunol.* 27:1719-1725, 1997.
- LUH, S.P.; CHIANG, C.H. Acute lung injury/acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS): the mechanism, present strategies and future perspectives of therapies. *J Zhejiang Univ Sci B.* 8:60-69, 2007.
- LUNDIE, R.J.; DE KONING-WARD, T.F.; DAVEY, G.M.; NIE, C.Q.; HANSEN, D.S.; LAU, L.S.; MINTERN, J.D.; BELZ, G.T.; SCHOFIELD, L.; CARBONE, F.R.; VILLADANGOS, J.A.; CRABB, B.S.; HEATH, W.R. Blood-stage *Plasmodium* infection induces CD8<sup>+</sup> T lymphocytes to parasite-expressed antigens, largely regulated by CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:14509-14514, 2008.

- LUNEL, F.; DRUILHE, P. Effector cells involved in nonspecific and antibody-dependent mechanisms directed against *Plasmodium falciparum* blood stages in vitro. *Infect Immun.* 57:2043-2049, 1989.
- LUYENDYK, J.; OLIVAS, O.R.; GINGER, L.A.; AVERY, A.C. Antigen-presenting cell function during *Plasmodium yoelii* infection. *Infect Immun.* 70:2941-2949, 2002.
- MAC GUIRE, W.; HILL, A.V.; ALLSOPP, C.E.; GREENWOOD, B.M.; KWIATKOWSKI, D. Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature.* 371:508-510, 1994.
- MACPHERSON, G.G.; WARRELL, M.J.; WHITE, N.J.; LOOAREESUWAN, S.; WARRELL, D.A. Human cerebral malaria: a quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am J Pathol.* 119:385-401, 1985.
- MÁJEK, P.; REICHELTOVÁ, Z.; STIKAROVÁ, J.; SUTTNAR, J.; SOBOTKOVÁ, A.; DYR, J.E. Proteome changes in platelets activated by arachidonic acid, collagen, and thrombin. *Proteome Sci.* 8:56, 2010.
- MARCHIAVA, E.; BIGNAMI, A. Malaria. Twentieth century practice of Medicine. London: Sampson Lowe, 1900. *apud* LANGHORNE, J. Immunology and Immunopathogenesis of Malaria. Berlin: Springer, 2005.
- MARSH, K.; ENGLISH, M.; CRAWLEY, J.; PESHU, N. The pathogenesis of severe malaria in African children. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 90:395-402, 1996.
- MARSHALL, J.C. Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med.* 29:S99-106, 2001.
- MARTIN, T.; LOSA, J.E.; GARCIA-SALGADO, M.J.; PEREZ-ARELLANO, J.L. The role of platelet-activating factor (paf) in interstitial pulmonary disease. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 4:149-157, 1994.
- MAZIER, D.; IDRISSE-BOUBOU, M. Immunogénétique et paludisme cérébral. *Bull Soc Pathol Exot.* 92:249-255, 1999.
- MCDONALD, B.; MCAVOY, E.F.; LAM, F.; GILL, V.; DE LA MOTTE, C.; SAVANI, R.C.; KUBES, P. Interaction of CD44 and hyaluronan is the dominant mechanism for neutrophil sequestration in inflamed liver sinusoids. *J Exp Med.* 205:915-927, 2008.
- MEDANA, I. M.; HUNT, N. H.; CHAN-LING, T. Early activation of microglia in the pathogenesis of fatal murine cerebral malaria. *Glia.* 19:91-103, 1997a.



- MEDANA, I.M.; HUNT, N.H.; CHAUDHRI, G. Tumor necrosis factor-alpha expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and astrocytes. *Am J Pathol.* 150:1473-1486, 1997b.
- MEDANA, I.M.; CHAUDHRI, G.; CHAN-LING, T.; HUNT, N.H. Central nervous system in cerebral malaria: 'Innocent bystander' or active participant in the induction of immunopathology? *Immunol Cell Biol.* 79:101-120, 2001.
- MEDANA, I.M.; DAY, N.P.; HIEN, T.T.; MAI, N.T.; BETHELL, D.; PHU, N.H.; FARRAR, J.; ESIRI, M.M.; WHITE, N.J.; TURNER, G.D. Axonal injury in cerebral malaria. *Am. J. Pathol.* 160:655-666, 2002.
- MEDANA, I.M.; TURNER, G.D. Human cerebral malaria and the blood-brain barrier. *Int J Parasitol.* 36:555-568, 2006.
- MILLER, L. H.; BARUCH, D.I.; MARSH, K.; DOUMBO, O.K. The pathogenic basis of malaria. *Nature.* 415:673-679, 2002.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/saude>
- MIU, J.; MITCHELL, A.J.; MÜLLER, M.; CARTER, S.L.; MANDERS, P.M.; MCQUILLAN, J.A.; SAUNDERS, B.M.; BALL, H.J.; LU, B.; CAMPBELL, I.L.; HUNT, N.H. Chemokine gene expression during fatal murine cerebral malaria and protection due to CXCR3 deficiency. *J Immunol.* 180:1217-1230, 2008.
- MIYAKODA, M.; KIMURA, D.; YUDA, M.; CHINZEI, Y.; SHIBATA, Y.; HONMA, K.; YUI, K. Malaria-specific and nonspecific activation of CD8+ T cells during blood stage of *Plasmodium berghei* infection. *J Immunol.* 181:1420-1428, 2008.
- MOHAN, K.; MOULIN, P.; STEVENSON, M.M. Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *J Immunol.* 159:4990-4998, 1997.
- MOHAN, A.; SHARMA, S.K.; BOLLINENI, S. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in malaria. *J Vector Borne Dis.* 45:179-193, 2008.
- MONTRUCCHIO, G.; ALLOATTI, G.; CAMUSSI, G. Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev.* 80:1669-1699, 2000.
- MORENO, S.E.; ALVES-FILHO, J.C.; RIOS-SANTOS, F.; SILVA, J.S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; TEIXEIRA, M.M. Signaling via platelet-activating factor receptors accounts for the

- impairment of neutrophil migration in polymicrobial sepsis. *J Immunol.* 177:1264-1271, 2006.
- MOTA, M.M.; PRADEL, G.; VANDERBERG, J.P.; HAFALLA, J.C.; FREVERT, U.; NUSSENZWEIG, R.S.; NUSSENZWEIG, V.; RODRÍGUEZ, A. Migration of sporozoites through cells before infection. *Science.* 291:141-144, 2001.
- MOTA, M.M.; RODRIGUEZ, A. Migration through host cells by apicomplexan parasites. *Microbes Infect.* 3:1123-1128, 2001.
- MOXON, C.A.; HEYDERMAN, R.S.; WASSMER, S.C. Dysregulation of coagulation in cerebral malaria. *Mol Biochem Parasitol.* 166:99-108, 2009.
- MUNG'ALA-ODERA, V.; SNOW, R.W.; NEWTON, C.R.J.C. The burden of the neurocognitive impairment associated with *Plasmodium falciparum* malaria in sub-saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 71:64-70, 2004.
- MURPHY, S.C.; BREMAN, J.G. Gaps in the childhood malaria burden in Africa: cerebral malaria, neurological sequelae, anemia, respiratory distress, hypoglycemia, and complications of pregnancy. *Am J Trop Med Hyg.* 64:57-67, 2001.
- NATARAJAN, R.; THATHY, V.; MOTA, M.M.; HAFALLA, J.C.; MENARD, R.; VERNICK, K.D. Fluorescent *Plasmodium berghei* sporozoites and pre-erythrocytic stages: a new tool to study mosquito and mammalian host interactions with malaria parasites. *Cell Microbiol.* 3:371-379, 2001.
- NEILL, A.L.; HUNT, N.H. Pathology of fatal and resolving *Plasmodium berghei* cerebral malaria in mice. *Parasitology.* 105:165-175, 1992.
- NEW, D.C.; WONG, Y.H. CC chemokine receptor-coupled signalling pathways. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai).* 35:779-788, 2003.
- NEWTON, C.R.; TAYLOR, T.E.; WHITTEN, R.O. Pathophysiology of fatal falciparum malaria in African children. *Am J Trop Med Hyg.* 58:673-683, 1998.
- NEWTON, C.R.; HIEN, T.T.; WHITE, N. Cerebral malaria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 69:433-441, 2000.
- NEWTON, P.N.; GREEN, M.; FERNÁNDEZ, F.M.; DAY, N.P.; WHITE, N.J. Counterfeit anti-infective drugs. *Lancet Infect Dis.* 6:602-613, 2006.
- NIE, C.Q.; BERNARD, N.J.; NORMAN, M.U.; AMANTE, F.H.; LUNDIE, R.J.; CRABB, B.S.; HEATH, W.R.; ENGWERDA, C.R.; HICKEY, M.J.; SCHOFIELD, L.; HANSEN, D.S. IP-10-mediated T cell

- homing promotes cerebral inflammation over splenic immunity to malaria infection. *PLoS Pathogens*. 5:e1000369, 2009.
- NITCHEU, J.; BONDUELLE, O.; COMBADIÈRE, C.; TEFIT, M.; SEILHEAN, D.; MAZIER, D.; COMBADIÈRE, B. Perforin-dependent brain-infiltrating cytotoxic CD8<sup>+</sup> T lymphocytes mediate experimental cerebral malaria pathogenesis. *J Immunol*. 170:2221-2228, 2003.
- OCAÑA-MORGNER, C.; MOTA, M.M.; RODRIGUEZ, A. Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. *J Exp Med*. 197:143-151, 2003.
- OHNO, T.; KOBAYASHI, F.; NISHIMURA, M. Fas has a role in cerebral malaria, but not in proliferation or exclusion of the murine parasite in mice. *Immunogenetics*. 57:293-296, 2005.
- OMER, F.M.; RILEY, E.M. Transforming growth factor beta production is inversely correlated with severity of murine malaria infection. *J Exp Med*. 188:39-48, 1998.
- ONO, S.J.; NAKAMURA, T.; MIYAZAKI, D.; OHBAYASHI, M.; DAWSON, M.; TODA, M. Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. *J Allergy Clin Immunol*. 111:1185-1199, 2003.
- OPAL, S.M.; ESMON, C.T. Bench-to-bedside review: functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis. *Crit Care*. 7:23-38, 2003.
- OWENS, A.P.; MACKMAN, N. Tissue factor and thrombosis: The clot starts here. *Thromb Haemost*. 104:432-439, 2010.
- PARRY, M.J.; ALABASTER, V.A.; CHEESEMAN, H.E.; COOPER, K.; DE SOUZA, R.N.; KEIR, R.F. Pharmacological profile of UK-74,505, a novel and selective PAF antagonist with potent and prolonged oral activity. *J Lipid Mediat Cell Signal*. 10:251-268, 1994.
- PATNAIK, J.K.; DAS, B.S.; MISHRA, S.K.; MOHANTY, S.; SATPATHY, S.K.; MOHANTY, D. Vascular clogging, mononuclear cell margination, and enhanced vascular permeability in the pathogenesis of human cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 51:642-647, 1994.
- PEARSON, G.; ROBINSON, F.; BEERS GIBSON, T.; XU, B.E.; KARANDIKAR, M.; BERMAN, K.; COBB, M.H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev*. 22:153-183, 2001.
- PENET, M.F.; VIOLA, A.; CONFORT-GOUNY, S.; LE FUR, Y.; DUHAMEL, G.; KOBER, F.; IBARROLA, D.; IZQUIERDO, M.; COLTEL, N.; GHARIB, B.; GRAU, G.E.; COZZONE, P.J.

- Imaging experimental cerebral malaria *in vivo*: significant role of ischemic brain edema. *J Neurosci.* 25:7352-7358, 2005.
- PERRY, J.A.; RUSH, A.; WILSON, R.J.; OLVER, C.S.; AVERY, A.C. Dendritic cells from malaria-infected mice are fully functional APC. *J Immunol.* 172:475-482, 2004.
- PICCIO, L.; ROSSI, B.; SCARPINI, E.; LAUDANNA, C.; GIAGULLI, C.; ISSEKUTZ, A.C.; VESTWEBER, D.; BUTCHER, E.C.; CONSTANTIN, G. Molecular mechanisms involved in lymphocyte recruitment in inflamed brain microvessels: critical roles for P-selectin glycoprotein ligand-1 and heterotrimeric G<sub>i</sub>-linked receptors. *J Immunol.* 168:1940-1949, 2002.
- PIGUET, P.F.; DA LAPERROUSAZ, C.; VESIN, C.; TACCHINI-COTTIER, F.; SENALDI, G.; GRAU, G.E. Delayed mortality and attenuated thrombocytopenia associated with severe malaria in urokinase- and urokinase receptor-deficient mice. *Infect Immun.* 68:3822-3829, 2000.
- PIGUET, P.F.; KAN, C.D.; VESIN, C.; ROCHAT, A.; DONATI, Y.; BARAZZONE, C. Role of CD40-CVD40L in mouse severe malaria. *Am J Pathol.* 159:733-742, 2001.
- PIGUET PF, KAN CD, VESIN C. Role of the tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) in cerebral malaria in mice. *Lab Invest.* 82:1155-1166, 2002.
- POBER, J.; COTRAN, R.S. What can be learned from the expression of endothelial adhesion molecules in tissues? *Lab Invest.* 64:301-305, 1991.
- POLDER, T.W.; ELING, W.M.; CURFS, J.H.; JERUSALEM, C.R.; WIJERS-ROUW, M. Ultrastructural changes in the blood-brain barrier of mice infected with *Plasmodium berghei*. *Acta Leiden.* 60:31-46, 1992.
- POTTER, S.; CHAUDHRI, G.; HANSEN, A.; HUNT, N.H. Fas and perforin contribute to the pathogenesis of murine cerebral malaria. *Redox Rep.* 4:333-335, 1999.
- POTTER, S.; CHAN-LING, T.; BALL, H.J.; MANSOUR, H.; MITCHELL, A.; MALUISH, L.; HUNT, N.H. Perforin mediated apoptosis of cerebral microvascular endothelial cells during experimental cerebral malaria. *Int J Parasitol.* 36:485-496, 2006.
- PRAKASH, D.; FESEL, C.; JAIN, R.; CAZENAVE, P.A.; MISHRA, G.C.; PIED, S. Clusters of cytokines determine malaria severity in *Plasmodium falciparum*-infected patients from endemic areas of Central India. *J Infect Dis.* 194:198-207, 2006.
- PRESCOTT, S.M.; ZIMMERMAN, G.A.; STAFFORINI, D.M.; MCINTYRE, T.M. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem.* 69:419-445, 2000.

- PROUDFOOT, A.E.I. The biological relevance of chemokine-proteoglycan interactions. *Biochem Soc Trans.* 34:422-426, 2006.
- PRPIC, V.; UHING, R.J.; WEIEL, J.E.; JAKOI, L.; GAWDI, G.; HERMAN, B.; ADAMS, D.O. Biochemical and functional responses stimulated by platelet-activating factor in murine peritoneal macrophages. *J Cell Biol.* 107:363-372, 1988.
- PRZYBORSKI, J.M.; WICKERT, H.; KROHNE, G.; LANZER, M. Maurer's clefts-a novel secretory organelle? *Mol Biochem Parasitol.* 132:17-26, 2003.
- REIS, P.A.; COMIM, C.M.; HERMANI, F.; SILVA, B.; BARICHELLO, T.; PORTELLA, A.C.; GOMES, F.C.; SAB, I.M.; FRUTUOSO, V.S.; OLIVEIRA, M.F.; BOZZA, P.T.; BOZZA, F.A.; DAL-PIZZOL, F.; ZIMMERMAN, G.A.; QUEVEDO, J.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C. Cognitive dysfunction is sustained after rescue therapy in experimental cerebral malaria, and is reduced by additive antioxidant therapy. *PLoS Pathog.* 6:e1000963, 2010.
- RÉNIA, L.; POTTER, S.M.; MAUDUIT, M.; ROSA, D.S.; KAYIBANDA, M.; DESCHEMIN, J.C.; SNOUNOU, G.; GRÜNER, A.C. Pathogenic T cells in cerebral malaria. *Int J Parasitol.* 36:547-54, 2006.
- ROBAYE, B.; MOSSELMANS, R.; FIERS, W.; DUMONT, J.E.; GALAND, P. Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol.* 138:447-453, 1991.
- RODRIGUES, D.H.; LACERDA-QUEIROZ, N.; DE MIRANDA, A.S.; FAGUNDES, C.T.; CAMPOS, R.D.; ARANTES, R.E.; VILELA, M.D.; RACHID, M.A.; TEIXEIRA, M.M.; TEIXEIRA, A.L. Absence of PAF receptor alters cellular infiltrate but not rolling and adhesion of leukocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res.* 1385:298-306, 2011.
- ROGERS, D.C.; FISHER, E.M.; BROWN, S.D.; PETERS, J.; HUNTER, A.J.; MARTIN, J.E. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm Genome.* 8:711-713, 1997.
- ROGERS, D.C.; PETERS, J.; MARTIN, J.E.; BALL, S.; NICHOLSON, S.J.; WITHERDEN, A.S.; HAFEZPARAST, M.; LATCHAM, J.; ROBINSON, T.L.; QUILTER, C.A.; FISHER, E.M. SHIRPA, a protocol for behavioral assessment: validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice. *Neurosci Lett.* 306:89-92, 2001.
- ROT, A.; VON ANDRIAN, U.R. Chemokines in innate and adaptative host defense: Basic chemokines grammar for immune cells. *Ann Rev Immunol.* 22:891-928, 2004.

- ROWE, J.A.; MOULDS, J.M.; NEWBOLD, C.I.; MILLER, L.H. *P. falciparum* rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. *Nature*. 388:292-295, 1997.
- SABCHAREON, A.; BURNOUF, T.; OUATTARA, D.; ATTANATH, P.; BOUHAROUN-TAYOUN, H.; CHANTAVANICH, P.; FOUCAULT, C.; CHONGSUPHAJASIDDHI, T.; DRUILHE, P. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 45:297-308, 1991.
- SACHAIS, B.S.; HIGAZI, A.A.; CINES, D.B.; PONCZ, M.; KOWALSKA, M.A. Interactions of platelet factor 4 with the vessel wall. *Semin Thromb Hemost*. 30:351-358, 2004.
- SÁNCHEZ-MADRID, F.; DEL POZO, M.A. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J*. 18:501-511, 1999.
- SANNI, L.A.; JARRA, W.; LI, C.; LANGHORNE, J. Cerebral edema and cerebral hemorrhages in interleukin-10-deficient mice infected with *Plasmodium chabaudi*. *Infect Immun*. 72:3054-3058, 2004.
- SARFO, B.Y.; ARMAH, H.B.; IRUNE, I.; ADJEI, A.A.; OLVER, C.S.; SINGH, S.; LILLARD, J.W.; STILES, J.K. *Plasmodium yoelii* 17XL infection up-regulates RANTES, CCR1, CCR3 and CCR5 expression, and induces ultrastructural changes in the cerebellum. *Malar J*. 4:63-76, 2005.
- SAUNDERS, N.R.; EK, C.J. ; HABGOOD, M.D. ; DZIEGIELEWSKA, K.M. Barriers in the brain: a renaissance? *Trends Neurosci*. 31:279-286, 2008.
- SCHENKEL, A.R.; MAMDOUN, Z.; MULLER, W.A. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nat Immunol*. 5:393-400, 2004.
- SCHMUTZHARD, J.; KOSITZ, C.H., LACKNER, P.; DIETMANN, A.; FISCHER, M.; GLUECKERT, R.; REINDL, M.; STEPHAN, K.; RIECHELMANN, H.; SCHROTT-FISCHER, A.; SCHMUTZHARD, E. Murine malaria is associated with significant hearing impairment. *Malar J*. 9:159, 2010.
- SCHOFIELD, L.; GRAU, G.E. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol*. 5:722-735, 2005.
- SEHGAL, V.M.; SIDDIQUI, W.A.; ALPERS, M.P. A seroepidemiological study to evaluate the role of passive maternal immunity to malaria in infants. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 83:105-106, 1989.

- SEIXAS, E.; CROSS, C.; QUIN, S.; LANGHORNE, J. Direct activation of dendritic cells by the malaria parasite, *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *Eur J Immunol.* 31:2970-2978, 2001.
- SENALDI, G.; VESIN, C.; CHANG, R.; GRAU, G.E.; PIGUET, P.F. Role of polymorphonuclear neutrophil leukocytes and their integrin CD11a (LFA-1) in the pathogenesis of severe murine malaria. *Infect Immun.* 62:1144-1149, 1994.
- SERGHIDES, L.; SMITH, T.G.; PATEL, S.N.; KAIN, K.C. CD36 and malaria: friends or foes? *Trends Parasitol.* 19:461-469, 2003.
- SHERMAN, I.W.; EDA, S.; WINOGRAD, E. Cytoadherence and sequestration in *Plasmodium falciparum*: defining the ties that bind. *Microbes Infect.* 5:897-909, 2003.
- SIBSON, N.R.; BLAMIRE, A.M.; PERRY, V.H.; GAULDIE, J.; STYLES, P.; ANTHONY, D.C. TNF- $\alpha$  reduces cerebral blood volume and disrupts tissue homeostasis via an endothelin- and TNFR2-dependent pathway. *Brain.* 125:2446-2459, 2002.
- SILVA, A.P.C.; RODRIGUES, S.C.O.; MERLO, F.A.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. Acute and chronic histopathologic changes in wild type or TLR-2<sup>-/-</sup>, TLR-4<sup>-/-</sup>, TLR-6<sup>-/-</sup>, TLR-9<sup>-/-</sup>, CD14<sup>-/-</sup>, and MyD-88<sup>-/-</sup>-mice experimentally infected with *Plasmodium chabaudi*. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology.* 4:5-11, 2011.
- SIMPSON, J.E.; NEWCOMBE, J.; CUZNER M.L.; WOODROOFE, M.N. Expression of the interferon- $\gamma$ -inducible chemokines IP-10 and Mig and their receptor, CXCR3, in multiple sclerosis lesions. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 26:133-142, 2000.
- SLOFSTRA, S.H.; SPEK, C.A.; TEN CATE, H. Disseminated intravascular coagulation. *Hematol J.* 4:295-302, 2003.
- SMITH, T.; CHARLWOOD, J.D.; KITUA, A.Y.; MASANJA, H.; MWANKUSYE, S.; ALONSO, P.L.; TANNER, M. Relationships of malaria morbidity with exposure to *Plasmodium falciparum* in young children in a highly endemic area. *Am J Trop Med Hyg.* 59:252-257, 1998.
- SNYDER, R.A.; KAEMPFER, C.E.; WINTROUB, B.U. Chemistry of a human monocyte-derived cell line (U937): identification of the angiotensin I-converting activity as leukocyte cathepsin G. *Blood.* 65:176-182, 1985.
- SONG, L.; PACTER, J.S. Monocyte chemoattractant protein-1 alters expression of tight junction-associated proteins in brain microvascular endothelial cells. *Microvasc Res.* 67:78-89, 2004.

- SOUSA, L.P.; CARMO, A.F.; REZENDE, B.M.; LOPES, F.; SILVA, D.M.; ALESSANDRI, A.L.; BONJARDIM, C.A.; ROSSI, A.G.; TEIXEIRA, M.M.; PINHO, V. Cyclic AMP enhances resolution of allergic pleurisy by promoting inflammatory cell apoptosis via inhibition of PI3K/Akt and NF-kappaB. *Biochem Pharmacol* 78:396-405, 2009.
- SOUZA, D.G.; CARA, D.C.; CASSALI, G.D.; COUTINHO, S.F.; SILVEIRA, M.R.; ANDRADE, S.P.; POOLE, S.P.; TEIXEIRA, M.M. Effects of the PAF receptor antagonist UK74,505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. *Br J Pharmacol*. 131:1800-1808, 2000.
- SOUZA, D.G.; PINHO, V.; SOARES, A.C.; SHIMIZU, T.; ISHII, S.; TEIXEIRA, M.M. Role of PAF receptors during intestinal ischemia and reperfusion injury. A comparative study between PAF receptor-deficient mice and PAF receptor antagonist treatment. *Br J Pharmacol*. 139:733-740, 2003.
- SOUZA, D.G.; FAGUNDES, C.T.; SOUSA, L.P.; AMARAL, F.A.; SOUZA, R.S.; SOUZA, A.L.; KROON, E.G.; SACHS, D.; CUNHA, F.Q.; BUKIN, E.; ATRASHEUSKAYA, A.; IGNATYEV, G.; TEIXEIRA, M.M. Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:14138-14143, 2009.
- SPIEGEL, D.A.; GOSSELIN, R.A.; COUGHLIN, R.R.; KUSHNER, A.L.; BICKLER, S.B. Topics in global public health. *Clin Orthop Relat Res*. 466:2377-2384, 2008.
- SRICHAIKUL, T.; NIMMANNITYA, S. Haematology in dengue and dengue haemorrhagic fever. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*. 13:261-276, 2000.
- SRIVASTAVA, K.; COCKBURN, I.A.; SWAIM, A.; THOMPSON, L.E.; TRIPATHI, A.; FLETCHER, C.A.; SHIRK, E.M.; SUN, H.; KOWALSKA, M.A.; FOX-TALBOT, K.; SULLIVAN, D.; ZAVALA, F.; MORRELL, C.N. Platelet factor 4 mediates inflammation in experimental cerebral malaria. *Cell Host Microbe*. 4:179-187, 2008.
- STEVENSON, M.M.; KRAAL, G. Histological changes in the spleen and liver of C57BL/6 and A/J mice during *Plasmodium chabaudi* AS infection. *Exp Mol Pathol*. 51:80-95, 1989.
- STEVENSON, M.M.; RILEY, E.M. Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol*. 4:169-180, 2004.
- STURM, A.; AMINO, R.; VAN DE SAND, C.; REGEN, T.; RETZLAFF, S.; RENNENBERG, A.; KRUEGER, A.; POLOK, J-M.; MENARD, R.; HEUSSLER, V.T. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*. 313:1287-1290, 2006.



- SUIDAN, G.L.; MCDOLE, J.R.; CHEN, Y.; PIRKO, I.; JOHNSON, A.J. Induction of blood brain barrier tight junction protein alterations by CD8 T cells. *PLoS One*. 3:e3037, 2008.
- SUN, G.; CHANG, W.L.; LI, J.; BERNEY, S.M.; KIMPEL, D.; VAN DER HEYDE, H.C. Inhibition of platelet adherence to brain microvasculature protects against severe *Plasmodium berghei* malaria. *Infect Immun*. 71:6553-6561, 2003.
- TADEI, W.P.; THACHER, B.D. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. *Inst Med Trop S Paulo*. 42:87-94, 2000.
- TAKAHASHI, A.; KATO, K.; MAKINO, J.; SHIROISHI, T.; KOIDE, T. Multivariate analysis of temporal descriptions of Open-field behavior in wild-derived mouse strains. *Behavior Genetics*. 36:763-774, 2006.
- TAN, L.K.; YACCOUB, S., SCOTT, S., BHAGANI, S.; JACOBS, M. Acute lung injury and other serious complications of *Plasmodium vivax* malaria. *Lancet Infect Dis*. 8:449-454, 2008.
- TAYLOR, W.R.; WHITE, N.J. Malaria and the lung. *Clin Chest Med*. 23:457-468, 2002.
- TEN CATE, H. Trombocytopenia: one of the markers of disseminated intravascular coagulation. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 33:413-416, 2003.
- TERASHITA Z, IMURA Y, NISHIKAWA K. Inhibition by CV-3988 of the binding of [3H]-platelet activating factor (PAF) to the platelet. *Biochem Pharmacol*. 34:1491-1495, 1985.
- THELEN, M.; STEIN, J.V. How chemokines invite leukocytes to dance. *Nat Immunol*. 9:953-959, 2008.
- THUMWOOD, C.M.; HUNT, N.H.; CLARK, I.A.; COWDEN, W.B. Breakdown of the blood-brain barrier in murine cerebral malaria. *Parasitology*. 96:579-589, 1988.
- TOGBE, D.; SCHOFIELD, L.; GRAU, G.E.; SCHNYDER, B.; BOISSAY, V.; CHARRON, S.; ROSE, S.; BEUTLER, B.; QUESNIAUX, V.F.; RYFFEL, B. Murine cerebral malaria development is independent of Toll-like receptor signaling. *Am J Pathol*. 170:1640-1648, 2007.
- TOGBE, D.; DE SOUSA, P.L.; FAUCONNIER, M.; BOISSAY, V.; FICK, L.; SCHEU, S.; PFEFFER, K.; MENARD, R.; GRAU, G.E.; DOAN, B.T.; BELOEIL, J.C.; RENIA, L.; HANSEN, A.M.; BALL, H.J.; HUNT, N.H.; RYFFEL, B.; QUESNIAUX, V.F. Both functional LTbeta receptor and TNF receptor 2 are required for the development of experimental cerebral malaria. *PLoS ONE*. 3:2608, 2008.

- TRIPATHI, A.K.; SULLIVAN, D.J.; STINS, M.F. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes increase intercellular adhesion molecule 1 expression on brain endothelium through NF-kappaB. *Infect Immun.* 74:3262-3270, 2006.
- TRIPATHI, A.K.; SULLIVAN, D.J.; STINS, M.F. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes decrease the integrity of human blood-brain barrier endothelial cell monolayers. *J Infect Dis.* 195:942-950, 2007.
- TURNER, G.D.; MORRISON, H.; JONES, M.; DAVIS, T.M.; LOOAREESUWAN, S.; BULEY, I.D.; GATTER, K.C.; NEWBOLD, C.I.; PUKRITAYAKAMEE, S.; NAGACHINTA, B. An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. *Am J Pathol.* 145:1057-1069, 1994.
- TURNER G. Cerebral Malaria. *Brain Pathol.* 7:569-582, 1997.
- UHLIG, S.; GOGGEL, R.; ENGEL, S. Mechanisms of platelet-activating factor (PAF)-mediated responses in the lung. *Pharmacol Rep.* 57:206-221, 2005.
- URBAN, B.C.; MWANGI, T.; ROSS, A.; KINYANJUI, S.; MOSOBO, M.; KAI, O.; LOWE, B.; MARSH, K.; ROBERTS, D.J. Peripheral blood dendritic cells in children with acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Blood.* 98:2859-2861, 2001.
- VALECHA, N.; PINTO, R.G.; TURNER, G.D.; KUMAR, A.; RODRIGUES, S.; DUBHASHI, N.G.; RODRIGUES, E.; BANAUlikAR, S.S.; SINGH, R.; DASH, A.P.; BAIRD, J.K. Histopathology of fatal respiratory distress caused by *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 81:758-762, 2009.
- VAN DEN STEEN, P.E.; DEROST, K.; VAN AELST, I.; GEURTS, N.; MARTENS, E.; STRUYF, S.; NIE, C.Q.; HANSEN, D.S.; MATTHYS, P.; VAN DAMME, J.; OPDENAKKER, G. CXCR3 determines strain susceptibility to murine cerebral malaria by mediating T lymphocyte migration toward IFN-gamma-induced chemokines. *Eur J Immunol.* 38:1082-1095, 2008.
- VAN DEN STEEN, P.E.; GEURTS, N.; DEROST, K.; VAN AELST, I.; VERHENNE, S.; HEREMANS, H.; VAN DAMME, J.; OPDENAKKER, G. Immunopathology and dexamethasone therapy in a new model for malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 181:957-968, 2010.

- VAN DER HEYDE, H.C.; BAUER, P.; SUN, G.; CHANG, W.L.; YIN, L.; FUSELER, J.; GRANGER, D.N. Assessing vascular permeability during experimental cerebral malaria by a radiolabeled monoclonal antibody technique. *Infect Immun.* 69:3460-3465, 2001.
- VAN DER HEYDE, H.; NOLAN, J.; COMBES, V.; GRAMAGLIA, I.; GRAU, G.E. A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends Parasitol.* 22:503-508, 2006.
- VAN DER POLL, T.; LEVI, M.; HACK, C.E.; TEN CATE, H.; VAN DEVENTER, S.J.; EERENBERG, A.J.; DE GROOT, E.R.; JANSEN, J.; GALLATI, H.; BÜLLER, H.R. Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. *J Exp Med.* 179:1253-1259, 1994.
- VAN DEVENTER, S.J.; BÜLLER, H.R.; TEN CATE, J.W.; AARDEN, L.A.; HACK, C.E.; STURK, A. Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood.* 76:2520-2526, 1990.
- VILELA, M.C.; MANSUR, D.S.; LACERDA-QUEIROZ, N.; RODRIGUES, D.H.; LIMA, G.K.; ARANTES, R.M.; KROON, E.G.; DA SILVA CAMPOS, M.A.; TEIXEIRA, M.M.; TEIXEIRA, A.L. The chemokine CCL5 is essential for leukocyte recruitment in a model of severe Herpes simplex encephalitis. *Ann N Y Acad Sci.* 1153:256-263, 2009.
- VILLEVAL, J.L.; GEARING, A.; METCALF, D. Changes in hemopoietic and regulator levels in mice during fatal or nonfatal malarial infections. II. Nonerythroid populations. *Exp Parasitol.* 71:375-385, 1990.
- VILLRINGER, A.; DIRNAGL, U.; THEM, A.; SCHÜRER, L.; KROMBACH, F.; EINHÄUPL, K.M. Imaging of leukocytes within the rat brain cortex *in vivo*. *Microvasc Res.* 42:305-315, 1991.
- VINCKE, I.H.; LIPS, M. Un nouveau *plasmodium* de rongeur sau vage du Congo: *Plasmodium berghei*. *Ann Soc Belge Med Trop.* 28:97-105, 1948. *apud* LANGHORNE, J. Immunology and Immunopathogenesis of Malaria. Berlin: Springer, 2005.
- VLACHOU, D.; SCHLEGELMILCH, T.; RUNN, E.; MENDES, A.; KAFATOS, F.C. The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. *Curr Opin Genet Dev.* 16:384-391, 2006.
- WASSMER, S.C.; LEPOLARD, C.; TRAORE, B.; POUVELLE, B.; GYSIN, J.; GRAU, G.E. Platelets reorient *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte cytoadhesion to activated endothelial cells. *J Infect Dis.* 189:180-189, 2004.

- WASSMER, S.C.; COMBES, V.; CANDAL, F.J.; JUHAN-VAGUE, I.; GRAU, G.E. Platelets potentiate brain endothelial alterations induced by *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun.* 74:645-653, 2006.
- WEIJER, S.; LEEEMANS, J.C.; FLORQUIN, S.; SHIMIZU, T.; ISHII, S.; VAN DER POLL, T. Host response of platelet-activating factor receptor-deficient mice during pulmonary tuberculosis. *Immunology.* 109:552-556, 2003.
- WHITE, N.J. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clin Infect Dis.* 46:172-173, 2008.
- WITTCHEN, E.S. Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration. *Front Biosci.* 14:2522-2545, 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION: Severe and complicated malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84:1-65, 1990.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION: World Health Report, 2002: Reducing Risks, Promoting Healthy Life.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION: World Malaria Report, 2008.
- YAÑEZ, D.M.; MANNING, D.D.; COOLEY, A.J.; WEIDANZ, W.P.; VAN DER HEYDE, H.C. Participation of lymphocyte subpopulations in the pathogenesis of experimental murine cerebral malaria. *J Immunol.* 157:1620-1624, 1996.
- YAÑEZ, D.M.; BATCHELDER, J.; VAN DER HEYDE, H.C.; MANNING, D.D.; WEIDANZ, W.P. Gamma delta T-cell function in pathogenesis of cerebral malaria in mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA. *Infect Immun.* 67:446-448, 1999.
- YOSHIDA, H.; GRANGER, D.N. Inflammatory bowel disease: a paradigm for the link between coagulation and inflammation. *Inflamm Bowel Dis.* 15:1245-1255, 2009.
- YOSHIMOTO, T.; TAKAHAMA, Y.; WANG, C-R.; YONETO, T.; WAKI, S.; NARIUCHI, H. A pathogenic role of IL-12 in blood-stage murine malaria lethal strain *Plasmodium berghei* NK65 infection. *J Immunol.* 160:5500-5505, 1998.
- ZHU, J.; KRISHNEGOWDA, G.; GOWDA, D.C. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: the requirement of extracellular signal-regulated kinase, p38, c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB pathways for the expression of proinflammatory cytokines and nitric oxide. *J Biol Chem.* 280:8617-8627, 2005.

- ZHU, S.W.; YEE, B.K.; NYFFELER, M.; WINBLAD, B.; FELDON, J.; MOHAMMEDA, A.H.  
Influence of differential housing on emotional behaviour and neurotrophin levels in mice.  
*Behav Brain Res.* 169:10-20, 2006.
- ZIMMERMAN, G.A.; WEYRICH, A.S. Signal-dependent protein synthesis by activated platelets:  
new pathways to altered phenotype and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28:s17-  
24, 2008.

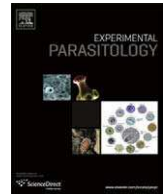
## 9. Anexos

### 9.1- Artigo aceito:

LACERDA-QUEIROZ, N.; RODRIGUES, D.H.; VILELA, M.C.; MIRANDA, A.S.; AMARAL, D.C.; CAMARGOS, E.R.; CARVALHO, L.J.; HOWE, C.L.; TEIXEIRA, M.M.; TEIXEIRA, A.L. Inflammatory changes in the central nervous system are associated with behavioral impairment in *Plasmodium berghei* (strain ANKA)-infected mice. *Exp Parasitol.* 125: 271-278, 2010 (Anexo 1).

### 9.2- Artigo submetido:

LACERDA-QUEIROZ, N.; RODRIGUES, D.H.; VILELA, M.C.; RACHID, M.R.; SORIANI, F.M.; SOUSA, L.P.; CAMPOS, R.D.L.; QUESNIAUX, V.F. J.; TEIXEIRA, M.M.; TEIXEIRA, A.L. Platelet-Activating Factor Receptor (PAFR) is essential for the development of experimental cerebral malaria.



## Inflammatory changes in the central nervous system are associated with behavioral impairment in *Plasmodium berghei* (strain ANKA)-infected mice

Norinne Lacerda-Queiroz<sup>a,b</sup>, David Henrique Rodrigues<sup>a,b</sup>, Márcia Carvalho Vilela<sup>b</sup>, Aline Silva de Miranda<sup>b</sup>, Débora Cristina Guerra Amaral<sup>b</sup>, Elizabeth Ribeiro da Silva Camargos<sup>a</sup>, Leonardo José de Moura Carvalho<sup>c,d</sup>, Charles L Howe<sup>e</sup>, Mauro Martins Teixeira<sup>b</sup>, Antônio Lúcio Teixeira<sup>b,f,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Cellular Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Immunopharmacology, Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, UFMG, Belo Horizonte, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Malaria Research, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>d</sup> La Jolla Bioengineering Institute, La Jolla, CA, USA

<sup>e</sup> Departments of Neurology and Neuroscience, Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, MN, USA

<sup>f</sup> Neurology Group, Department of Internal Medicine, School of Medicine, UFMG, Belo Horizonte, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 October 2009

Received in revised form 28 January 2010

Accepted 1 February 2010

Available online 6 February 2010

#### Keywords:

Cerebral malaria

Leukocyte recruitment

Behavior

Cytokines

Intravital microscopy

### ABSTRACT

Experimental cerebral malaria is a neuroinflammatory condition that results from the host immune response to the parasite. Using intravital microscopy, we investigated leukocyte recruitment in the brain microcirculation and the temporal relationship of this process to the behavioral changes observed in *Plasmodium berghei* (strain ANKA)-infected C57Bl/6 mice. We found that leukocyte recruitment was increased from day 5 post-infection (p.i.) onwards. Histopathological changes and increased levels of inflammatory cytokines in the brain were also observed. Behavioral performance evaluated by the SHIR-PA protocol showed functional impairment from day 6 p.i. onwards. Thus, early leukocyte migration into the brain and associated inflammatory changes may be involved in neurological impairment in parasite-infected C57Bl/6 mice.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Malaria infection causes a wide variety of clinical symptoms, ranging from mild unspecific signs to severe forms marked by deep anemia, respiratory distress syndrome and cerebral malaria (CM) (WHO, 2000). CM is the major complication of *Plasmodium falciparum* infection in humans and, in according to the World Health Organization (WHO) clinical criteria, is defined as a potentially reversible diffuse encephalopathy with coma in the absence of other factors that could cause reduced level of arousal (Lou et al., 2001; Medana and Turner, 2006). Long-term neurocognitive impairment has been described in children afflicted by CM (Idro et al., 2006; John et al., 2008a), but the pathogenic mechanisms underlying this impairment remain unclear.

Two main hypotheses have been proposed to explain the pathogenesis of CM: (1) neural injury following direct sequestration of parasite-infected red blood cells (pRBC) in the cerebral microvas-

culature, and (2) neural injury associated with an inflammatory response to the parasite in the central nervous system (CNS). More recently, there is a trend to consider a unified hypothesis in which parasite sequestration and inflammation cooperatively lead to microcirculatory dysfunction and to neurological symptoms (van der Heyde et al., 2006).

Many animal models have been developed to elucidate the inflammatory and/or immunological mechanisms involved in CM (de Souza and Riley, 2002). Experimental CM is characterized by an intravascular accumulation of mononuclear leukocytes and platelets and the presence of perivascular inflammation and parenchymal microhaemorrhages in the CNS (Lackner et al., 2006a). High levels of circulating and cerebral tissue cytokines have also been observed (Grau et al., 1987), including increased expression of CXCL10, CCL2, and CCL5 in mice infected with *Plasmodium berghei* (strain ANKA) (PbA) (Hanum et al., 2003). These chemokines may represent the signal responsible for the chemoattraction of circulating leukocytes into the CNS and they may also contribute directly to neuronal and glial dysfunction.

Finally, mice infected with PbA may exhibit behavioral symptoms as a result of these neuroinflammatory processes (Lackner et al., 2006b; Desruisseaux et al., 2008). In this study, in order to

\* Corresponding author. Address: Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, UFMG, 30130-100 Av. Alfredo Balena, 190. Santa Efigênia, Belo Horizonte, MG, Brazil. Fax: +55 31 3409 2651.

E-mail address: [altex@gmail.com](mailto:altex@gmail.com) (A.L. Teixeira).

better understand the timing of processes involved in the behavioral changes that occur during CM, we studied early events in leukocyte migration into the CNS in PbA-infected mice using intravital microscopy.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

C57Bl/6 mice (6–8-week-old) were obtained from the Animal Care Facilities of the Federal University of Minas Gerais, Brazil. Animals were housed in cages in temperature-controlled rooms and received food and water *ad libitum*. All procedures described had prior approval from the local animal ethics committee.

### 2.2. Parasite and experimental infection

*P. berghei* (strain ANKA) (PbA) was used in this study. Parasites were maintained in liquid nitrogen and subjected to at least one *in vivo* passage prior to use in experimental infection. Mice were infected by intraperitoneal (i.p.) injection of  $10^6$  pRBC suspended in 0.2 mL PBS (Grau et al., 1986). The level of parasitemia in infected mice was monitored on Giemsa-stained blood films from day 3 onwards and estimated at 1000 pRBC under immersion oil.

### 2.3. SHIRPA screen

The SmithKline/Harwell/Imperial College/Royal Hospital/Phenotype Assessment (SHIRPA) screen was conceived as a multi-test behavioral battery used for longitudinal studies with standardized guidelines and materials (Rogers et al., 1997). The primary SHIRPA screen consists of a series of observations of reflexes and basic sensorimotor functions and provides a behavioral and functional profile by observational assessment of individual performance (Lalonde et al., 2005).

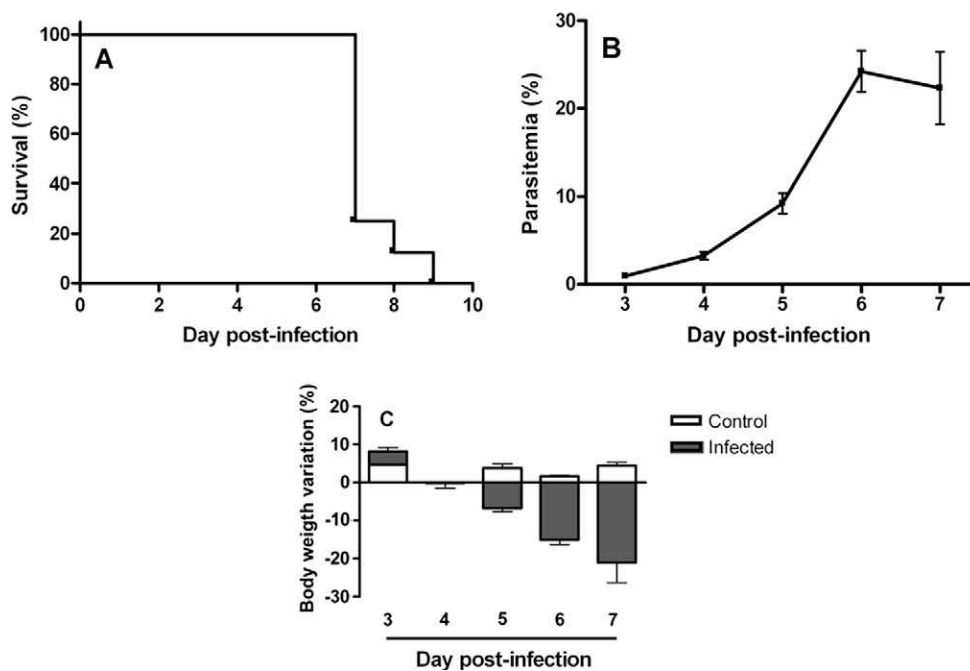
The SHIRPA protocol was used to evaluate behavioral changes during the course of the infection. After a period of adaptation,

the procedure was carried out on day 0 (day of infection) and then from day 3 until death on daily basis. For analysis purpose, the individual parameters assessed by SHIRPA were grouped into five functional categories (neuropsychiatric state; motor behavior; autonomic function; muscle tone and strength, and reflex and sensory function) according to Lackner et al. (2006b), determining an overall score and five domain scores. The reflex and sensory domain involves visual placing, pinna reflex, corneal reflex, toe pinch and righting reflex.

### 2.4. Intravital microscopy in mouse brain

Intravital microscopy of brain microvasculature was performed as previously described (Vilela et al., 2008, 2009). Briefly, control and infected mice (on day 3 and 5 p.i.) were anesthetized by intraperitoneal (i.p.) injection of a mixture of Ketamine (150 mg/kg, Laboratório Cristália, Brazil) and Xylazine (10 mg/kg, Rompun®, Bayer, Germany) and the tail vein was cannulated. A craniotomy was performed using a high-speed drill (Beltec, Brazil) and the dura matter was removed to expose the underlying pial vasculature. Throughout the experiment, the mouse was maintained at 37 °C with a Thermo Plate (TOKAI HIT, Nikon Inc., Japan) and the exposed brain was continuously superfused with artificial cerebrospinal fluid (composition in mM: NaCl 132, KCl 2.95, CaCl<sub>2</sub> 1.71, MgCl<sub>2</sub> 0.64, NaHCO<sub>3</sub> 24.6, dextrose 3.71 and urea 6.7, pH 7.4) kept at 37 °C.

To observe leukocyte/endothelium interactions, leukocytes were fluorescently labeled by i.v. administration of rhodamine 6G (0.3 mg/kg, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) and observed using a microscope (Nikon, Eclipse 501, X10 objective lens) outfitted with a fluorescent light source (epi-illumination at 510–560 nm, using a 590 nm emission filter). Images were captured by a camera (Nikon, DS-Qi1MC) and projected onto a monitor (LG, FLATRON-W1952TQ). Rolling leukocytes were defined as white cells moving at a velocity less than that of erythrocyte flow. Leucocytes were considered adherent to the venular endothelium (100 μm length) if they remained stationary for 30 s or longer.



**Fig. 1.** (A) Time course of parasitemia in infected mice ( $n = 8$ ). (B) Time course of survival of mice infected with PbA ( $n = 8$ ). (C) Weight variation in control ( $n = 4$ ) and infected ( $n = 8$ ) mice. Each point of parasitemia and weight loss is expressed as mean  $\pm$  SEM.



2.5. Histology

For histological analysis, brains were quickly removed, fixed in 10% formalin, embedded in paraffin and cut into 4 µm sections. The sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E). Slides were examined under a light microscope for qualitative analysis of inflammatory parameters.

2.6. Tissue extraction and measurement of NAG activity

The extent of macrophage sequestration was quantified indirectly by the measuring of *N*-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) activity in brain supernatants, as an index of monocyte influx (Barcelos et al., 2005). In brief, the brains of control and infected animals (on day 5 p.i.) were removed, weighed and the tissue was homogenized in extraction solution (100 mg of tissue per mL), containing: 0.4 M NaCl, 0.05% Tween 20, 0.5% BSA, 0.1 mM phenyl methyl sulphonyl fluoride, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA and 20 KIU aprotinin, using Ultra-Turrax. Brain homogenate was centrifuged at 3000 g for 10 min at 4 °C and supernatants were collected for ELISA and stored at -20 °C. The

resultant pellet was resuspended in saline/Triton 0.1%. The NAG reaction was run at 37 °C for 10 min in a 96-well microplate following the addition of 100 µL *p*-nitrophenyl-*N*-acetyl-β-D-glucosaminide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), dissolved in citrate/phosphate buffer (0.1 M citric acid, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 4.5) at a final concentration of 2.24 mM per 100 µL supernatant derived from tissue sample processing. The reaction was terminated by the addition of 100 µL 0.2 M glycine buffer (pH 10.6). NAG activity was assayed by measuring the change in absorbance (optical density [OD]) at 405 nm in a spectrophotometer (Emax, Molecular Devices) and interpolated on a standard curve constructed with *p*-nitrophenol (0–500 nmol/ml) (Sigma-Aldrich). Results were expressed as change in O.D. per gram of tissue.

2.7. ELISA of proteins in cerebral tissue

Brain tissues were obtained from control and infected mice (on day 3, 5 and 7 p.i.) and the supernatant was collected and stored at -20 °C. The concentrations of TNF-α, CXCL1, CXCL9, CCL2, CCL3 and CCL5 were determined by ELISA. Additionally, the systemic concentration of TNF-α and CXCL9 was measured in serum obtained from

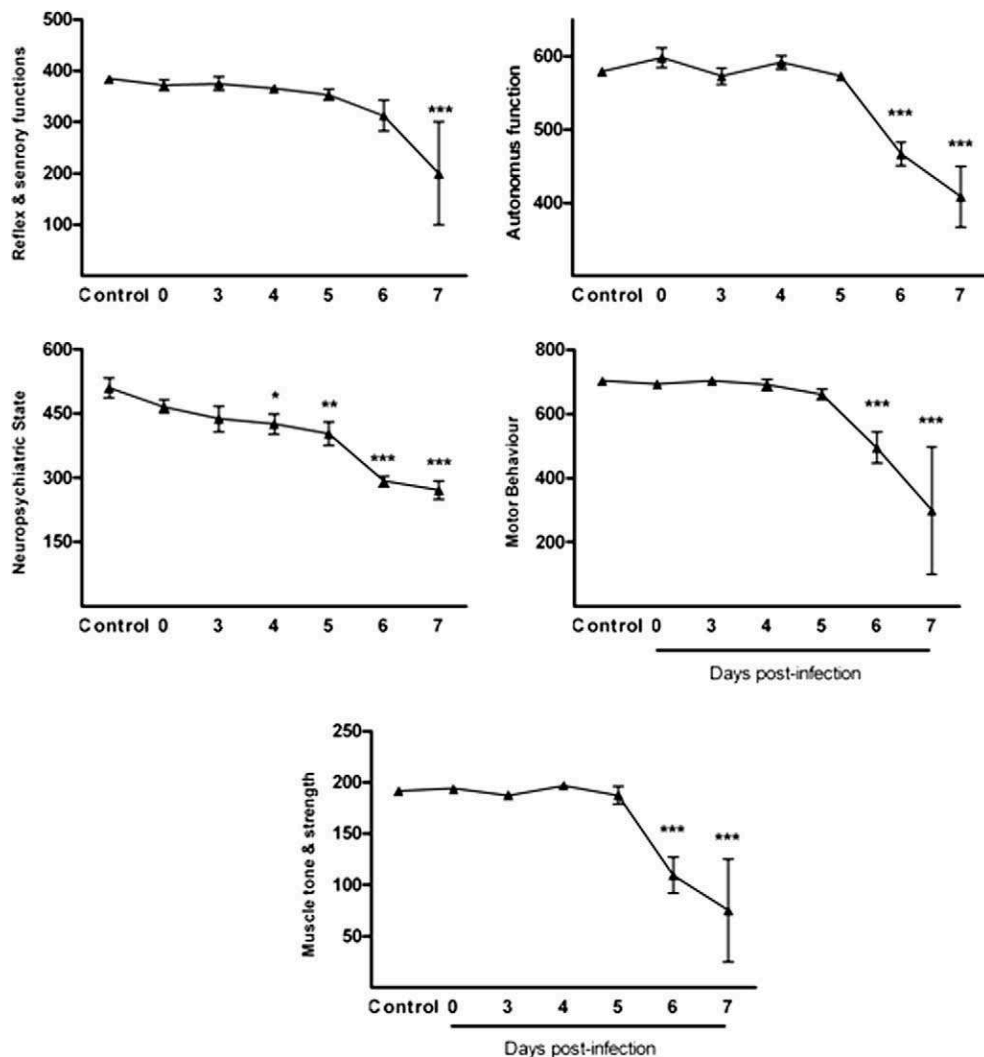


Fig. 2. Visualisation of performance of control animals and PbA-infected animals in the five distinct functional categories (neuropsychiatric state; motor behavior; autonomic function; muscle tone and strength, and reflex and sensory function). Overall scores of the functional categories are shown in groups of at least five mice. Scores of animals at different time points of infection and scores of control animals were compared by One-way ANOVA with Newman-Keuls post-test. \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001.

coagulated blood (15 min at 37 °, then 30 min at 4 °C, stored at –20 °C until analysis). Samples at a 1:3 dilution in 0.1% BSA in PBS were assayed by ELISA using commercially available antibodies according to the procedures supplied by the manufacturer (R&D Systems, Minneapolis, MN and Pharmingen, San Diego, CA).

### 2.8. Statistical analysis

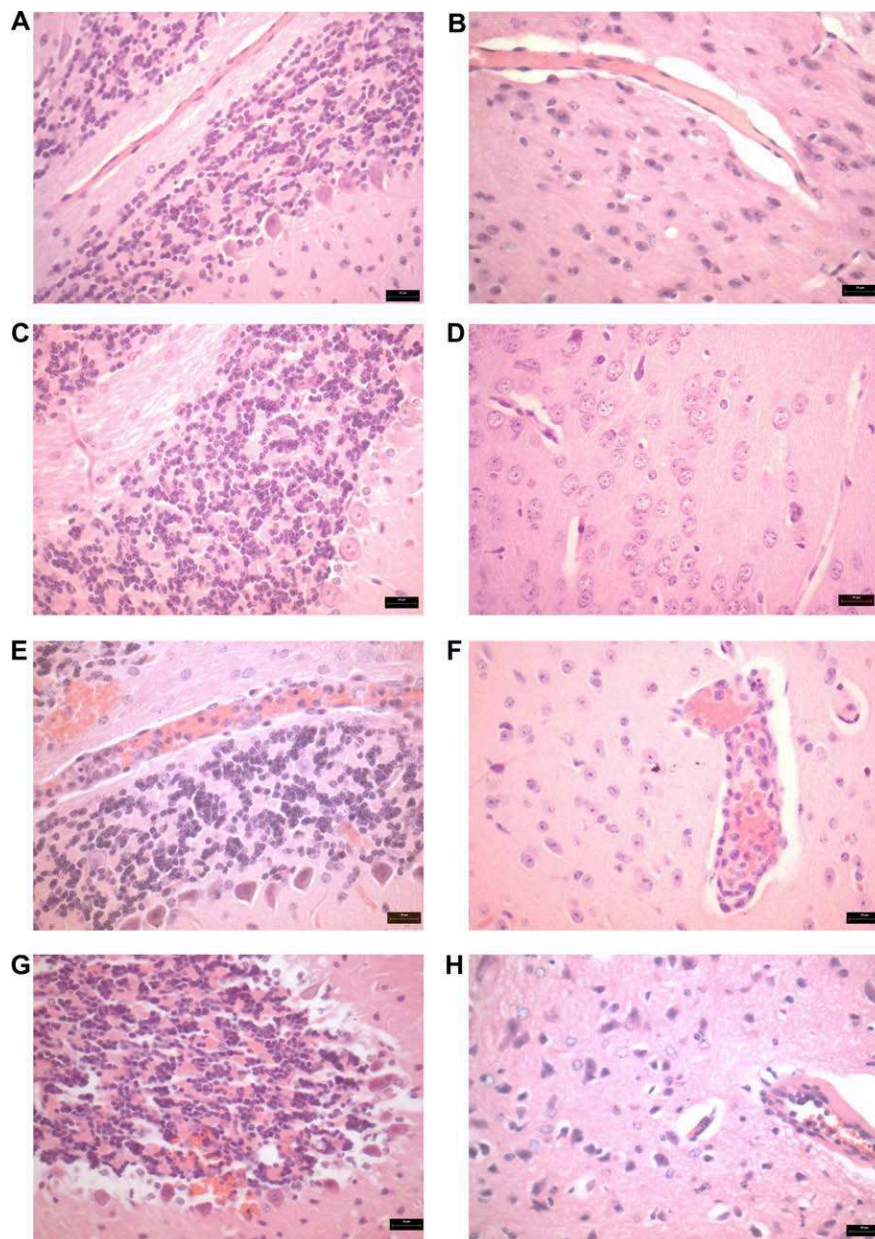
Data are shown as mean  $\pm$  SEM (except the survival curve). Student *t*-test was used in NAG analyzes. SHIRPA results, leukocyte–endothelium interaction and ELISA were evaluated by ANOVA, with Newman–Keuls post-test. The survival rate was expressed as the percentage of live animals. A value of  $p < 0.05$  was considered significant.

## 3. Results

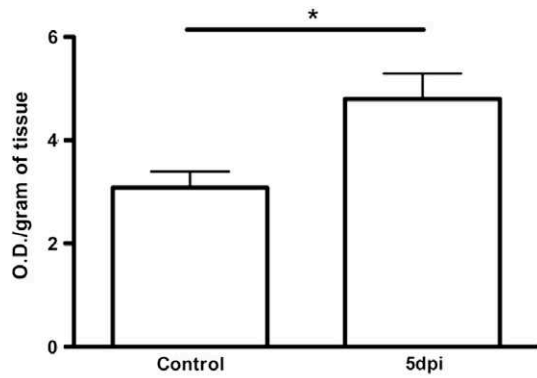
### 3.1. *P. berghei* (strain ANKA) infection changes behavioral parameters in C57Bl/6 WT mice

C57Bl/6 WT mice were infected with PbA and monitored daily. Parasitemia progressively increased (Fig. 1A) and mortality peaked on day 7 p.i. (Fig. 1B). There was a marked weight loss in mice during the infection (Fig. 1C).

To further analyze the clinical signs of animals, we performed the SHIRPA behavioral battery. SHIRPA analysis confirmed that infected mice developed a wide range of behavioral changes during the course of the disease prior to death (Fig. 2). Neuropsychiatric state was altered in the early course of malaria infection, starting from day 4 p.i. Motor behavior, autonomic function, muscle tone



**Fig. 3.** Hemorrhages and intravascular inflammatory infiltrates in the brain of PbA-infected C57Bl/6 mice (H&E). (A and B) Hematoxylin and eosin-stained sections of cerebellum and cerebrum of control mice without morphological changes. (C and D) Cerebellum and cerebrum parenchyma without inflammatory cells and a typical architecture in mice on day 3 p.i. (E) Intravascular inflammatory cells and hemorrhagic areas in the cerebellum on day 5 p.i. (F) Cerebrum parenchyma with intravascular inflammatory infiltrates in the same date. (G) Multifocal hemorrhages in the cerebellum and neuronal damage on day 7 p.i. (H) Vasculat alteration with edema and intravascular inflammatory cells on day 7 p.i. Magnification,  $\times 200$ .



**Fig. 4.** NAG levels in cerebral tissue from control and infected mice. Infected mice on day 5 p.i. showed increased NAG levels when compared with control. Groups of at least five mice and results are expressed as mean  $\pm$  SEM, where \* $p < 0.05$ .

and strength were altered from day 6, while reflex and sensory function did not change until day 7 p.i.

### 3.2. PbA-infected mice present several histopathological changes in the brain

Brain samples were evaluated by routine histological techniques in order to determine the progress of the morphological changes in cerebrum and cerebellum of infected mice. Control and infected mice sacrificed on day 3 p.i. had no evidence of morphological changes (Fig. 3A–D). Infected mice on day 5 p.i. showed moderate intravascular infiltrates, consisting primarily of mononuclear cells, and hemorrhagic areas, especially in the cerebellum (Fig. 3E and F). On day 7 p.i., animals exhibited endothelial damage, mild intravascular infiltrates, multifocal hemorrhages (brain parenchyma and cerebellum) and changes consistent with glial activation and neuronal damage (Fig. 3G and H).

### 3.3. Monocytes/macrophages are increased in the brain of PbA-infected mice

To confirm the presence of monocyte/macrophage infiltration in the brain of PbA-infected mice, we measured NAG activity in brain tissue from control and infected mice. In infected mice, on day 5 p.i., the NAG activity was almost twofold higher than that observed

in controls, indicating the presence of monocytes and macrophages (Fig. 4).

### 3.4. Leukocyte recruitment is increased in the pial microvasculature of PbA-infected mice

To assess the time course of the infiltration of cells into the brain, we performed intravital microscopy in the pia mater vessels. The number of rolling and adherent rhodamine-stained leukocytes was similar in control and infected animals on day 3 p.i., but increased significantly on day 5 p.i. ( $p < 0.001$ ) (Fig. 5), consistent with the heightened monocyte/macrophage accumulation observed by histology and NAG measurements.

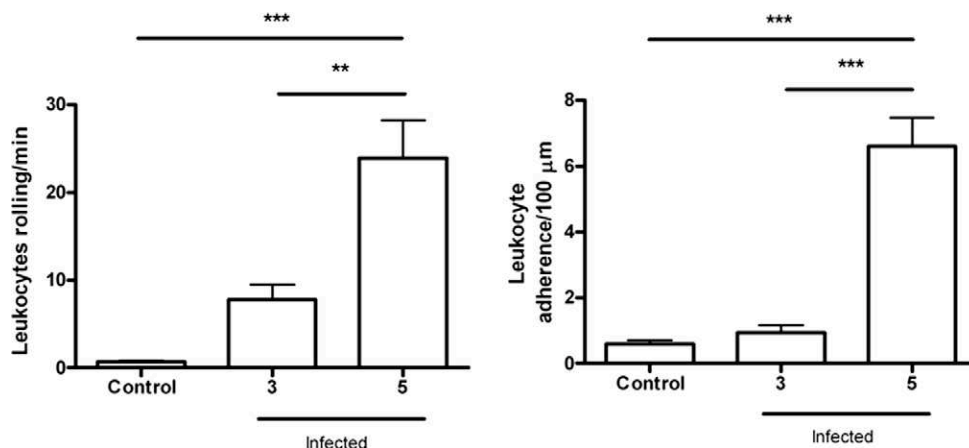
### 3.5. CC and CXC chemokines are increased in the brain of PbA-infected mice

Leukocyte activation and recruitment depends on the involvement of cytokines and chemokines. Therefore, we evaluated cerebral levels of TNF- $\alpha$  and the chemokines CCL2, CCL3, CCL5, CXCL1 and CXCL9 (Fig. 6). PbA infection increased cerebral levels of CXCL9 on days 5 and 7 p.i., and CCL2, CCL3 and CCL5 on day 7 p.i., but did not alter CXCL1 levels. Serum levels of TNF- $\alpha$  were increased on days 5 and 7 p.i., and serum CXCL9 levels were increased on days 3, 5 and 7 p.i.

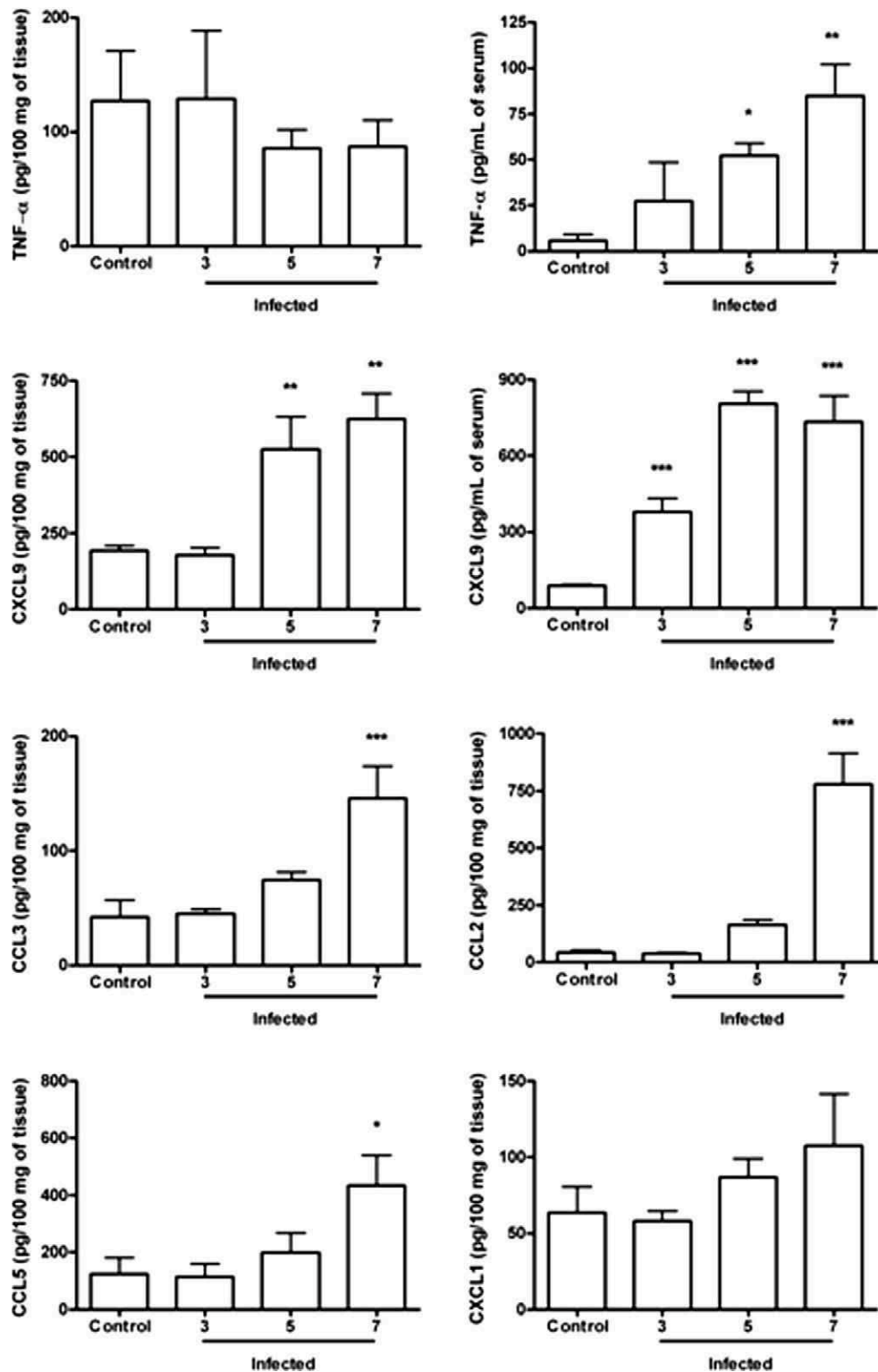
## 4. Discussion

In this study, we found a temporal association between behavioral changes and inflammatory parameters in the CNS of PbA-infected mice. The early leukocyte recruitment events observed on day 5 p.i. preceded neurological changes, which were clearly evident from day 6 p.i. until death.

PbA induces a neurological syndrome in susceptible mouse strains that resembles human CM. The concept of experimental CM is traditionally associated with the presence of typical neurological signs, such as ataxia, paralysis, seizures and coma, followed by death (Bagot et al., 2002). However, as the pathogenesis of CM includes different mechanisms with a varying degree of severity, this concept may be too restrictive, not encompassing more subtle neurological signs, including mild to moderate cognitive impairment (Medana et al., 2001). Along this line, Desruisseaux et al. (2008) recently demonstrated that memory dysfunction in experimental malaria correlated with brain inflammation and hemor-



**Fig. 5.** The study of leukocyte–endothelium interaction was performed by intravital microscopy. The rolling and adhesion of leukocytes in the brain microvasculature were assessed. The protocol included control (sham) and infected animals. Mice, infected by PbA, on day 5 p.i. showed an increase in cell recruitment when compared with control. Groups of at least five mice, results are expressed as mean  $\pm$  SEM, where \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . ANOVA confirmed the significance.



**Fig. 6.** Comparative analysis of TNF- $\alpha$ , CCL2, CXCL1, CXCL9, CCL5 and CCL3 concentration in control and PbA-infected mice by ELISA. Results were expressed as the mean  $\pm$  SEM from at least five animals per group. Asterisk(s) indicate statistical differences where \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ .

rhage, as well as microglial activation. Our results corroborate these findings, as a series of neurological signs developed in association with early inflammatory changes in CNS. We found an increase in the rolling and adhesion of leukocytes by *in vivo* analysis of cell recruitment using intravital microscopy. This increase was observed on day 5 p.i., while most neurological changes were observed after 6 days of infection.

Once we observed these inflammatory changes, we looked at the brain tissue. The major histopathologic findings were hemorrhagic areas and intravascular inflammatory infiltrates composed mainly of mononuclear cells. The increase of NAG in brain supernatants corroborated the histopathologic finding of mononuclear recruitment to brain tissue in infected animals (Martins et al., 2009). NAG activity is one of the many parameters that can assess

macrophage activity and, hence, is an index of monocyte/macrophage tissue infiltration (Reiner et al., 1981). One limitation of our work is the absence of a more detailed study of the types of leukocytes recruited into CNS. This is an interesting issue as previous studies emphasized the role of determined cell types, such as CD8<sup>+</sup> T, in the development of neurological signs in the course of CM (Belnoue et al., 2002). Future studies will address in detail the leukocyte subtypes infiltrating the brain and their putative role in modifying behavioural function.

There was also an increase in the levels of chemokines in the brain. Previous studies showed that chemokines up-regulate the expression of adhesion molecules and facilitate leukocyte migration processes in the brain (Ransohoff, 2002). The specific role of chemokines in determining the clinical severity and/or the outcome of malaria or CM remains to be defined. However, as demonstrated by others (Hanum et al., 2003; Miu et al., 2008; Van den Steen et al., 2008), we found increased cerebral levels of chemokines in the brain of mice infected with Pba. Specifically, we found that CXCL9, an interferon- $\gamma$ -inducible chemokine (Farber, 1997), was upregulated at day 5 p.i. in the brain and at day 3 p.i. in the serum (Fig. 6), predicting the large increase in infiltrating leukocytes in the brain microvasculature (Figs. 3 and 5) and the onset of functional deficits (Fig. 2). This CXCR3 ligand is associated with macrophage activation (Menke et al., 2008) and leukocyte infiltration in a number of inflammatory disease states associated with parasite infection, including Chagas disease (Cutrullis et al., 2009). Whether CXCL9 in our model was produced by neural cells or by an early wave of infiltrating macrophages and whether the brain CXCL9 promoted additional macrophage recruitment and/or T cell recruitment remains to be determined.

Recently, Miu et al. (2008) showed the up-regulation of CXCL9 and CCL5 in experimental CM at the level of mRNA expression. These two chemokines are directly involved in T cell and monocyte/macrophage recruitment to target tissues (Simpson et al., 2000). Additionally, CXCL9<sup>-/-</sup> mice (Campanella et al., 2008) and IP-10<sup>-/-</sup> mice (Nie et al., 2009) were reported to be partially/markedly resistant to CM during Pba infection, and exhibited lower leukocyte migration to the brain. Therefore, the increase in leukocyte recruitment during Pba infection in wild type mice in our model may be a direct consequence of CXCL9 upregulation.

Finally, systemic inflammation, as suggested by the increase of serum CXCL9 levels on day 3 p.i., could explain the early alteration in neuropsychiatric state starting at day 4 p.i. However, whether chemokine expression directly results in cognitive dysfunction or whether recruited leukocytes are primarily responsible remains unclear. The association of inflammatory chemokine and cytokine production in the CNS with mild cognitive impairment (John et al., 2008b) and under conditions of CNS viral infection (Sui et al., 2007) suggests that these factors may directly impair neuronal function.

In the present study, we found that deficits in cognitive function associated with cerebral malaria in mice triggered by infection with *P. berghei* (strain ANKA) follows an early wave of leukocyte recruitment to the CNS. This recruitment may be driven predominantly by CXCL9, as this was the chemokine that we observed to be increased in the brain prior to severe cognitive impairment. The upregulation of CCL2, CCL3, and CCL5 in the brain at later time-points just prior to death suggests that these chemokines are not responsible for the initial inflammatory infiltration into the malarial CNS. Further studies are necessary to define leukocyte subsets recruited into the CNS and possibly involved in behavioral changes.

## Acknowledgments

The authors thank Carlos Henrique da Silva and Catherine Kelly Martins for their technical assistance. This work was financially

supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (Rede IBN-Net), Brazil. LJMC is recipient of NIH Grants R01-HL087290 (NHLBI) and R01-AI082610 (NIAID).

## References

- Bagot, S., Idrissa Boubou, M., Campino, S., Behrschmidt, C., Gorgette, O., Guenet, J.L., Penha-Goncalves, C., Mazier, D., Pied, S., Cazenave, P.A., 2002. Susceptibility to experimental cerebral malaria induced by *Plasmodium berghei* ANKA in inbred mouse strains recently derived from wild stock. *Infection and Immunity* 70, 2049–2056.
- Barcelos, L.S., Talvani, A., Teixeira, A.S., Vieira, L.Q., Cassali, G.D., Andrade, S.P., Teixeira, M.M., 2005. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *Journal of Leukocyte Biology* 78, 352–358.
- Belnoue, E., Kayibanda, M., Vigarito, A.M., Deschemin, J.C., van Rooijen, N., Viguier, M., Snounou, G., Rénia, L., 2002. On the pathogenic role of brain-sequestered alpha $\beta$  CD8<sup>+</sup> T cells in experimental cerebral malaria. *Journal of Immunology* 169, 6369–6375.
- Campanella, G.S., Tager, A.M., El Khoury, J.K., Thomas, S.Y., Abrazinski, T.A., Manice, L.A., Colvin, R.A., Luster, A.D., 2008. Chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9 and CXCL10 are required for the development of murine cerebral malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 4814–4819.
- Cutrullis, R.A., Postan, M., Petray, P.B., Corral, R.S., 2009. Timing of expression of inflammatory mediators in skeletal muscles from mice acutely infected with the RA strain of *Trypanosoma cruzi*. *Pathobiology* 76, 170–180.
- Desruisseaux, M.S., Gulinello, M., Smith, D.N., Lee, S.C., Tsuji, M., Weiss, L.M., Spray, D.C., Tanowitz, H.B., 2008. Cognitive dysfunction in mice infected with *Plasmodium berghei* strain ANKA. *The Journal of Infectious Diseases* 197, 1621–1627.
- de Souza, J.B., Riley, E.M., 2002. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes and Infection* 4, 291–300.
- Farber, J.M., 1997. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 61, 246–257.
- Grau, G.E., Piguet, P.F., Engers, H.D., Louis, J.A., Vassali, P., Lambert, P.H., 1986. L3T4<sup>+</sup> T lymphocytes play a major role in the pathogenesis of murine cerebral malaria. *Journal of Immunology* 137, 2348–2354.
- Grau, G.E., Fajardo, L.F., Piguet, P.F., Allet, B., Lambert, P.H., Vassali, P., 1987. Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science* 237, 1210–1212.
- Idro, R., Carter, J.A., Fegan, G., Neville, B.G., Newton, C.R., 2006. Risk factors for persisting neurological and cognitive impairments following cerebral malaria. *Archives of Disease in Childhood* 91, 142–148.
- Hanum, P.S., Hayano, M., Kojima, S., 2003. Cytokine and chemokine responses in a cerebral malaria-susceptible or -resistant strain of mice to *Plasmodium berghei* ANKA infection: early chemokine expression in the brain. *International Immunology* 15, 633–640.
- John, C.C., Bangirana, P., Byarugaba, J., Opoka, R.O., Idro, R., Jurek, A.M., Wu, B., Boivin, M.J., 2008a. Cerebral malaria in children is associated with long-term cognitive impairment. *Pediatrics* 122, 92–99.
- John, C.C., Panoskaltis-Mortari, A., Opoka, R.O., Park, G.S., Orchard, P.J., Jurek, A.M., Idro, R., Byarugaba, J., Boivin, M.J., 2008b. Cerebrospinal fluid cytokine levels and cognitive impairment in cerebral malaria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 78, 198–205.
- Lackner, P., Beer, R., Helbok, R., Broessner, G., Engelhardt, K., Brenneis, C., Schmutzhard, E., Pfaller, K., 2006a. Scanning electron microscopy of the neuropathology of murine cerebral malaria. *Malaria Journal* 5, 116.
- Lackner, P., Beer, R., Heussler, V., Goebel, G., Rudzki, D., Helbok, R., Tannich, E., Schmutzhard, E., 2006b. Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 32, 177–188.
- Lalonde, R., Dumont, M., Staufenbiel, M., Strazielle, C., 2005. Neurobehavioral characterization of APP23 transgenic mice with the SHIRPA primary screen. *Behavioural Brain Research* 157, 91–98.
- Lou, J., Lucas, R., Grau, G.E., 2001. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clinical Microbiology Reviews* 14, 810–820.
- Martins, Y.C., Smith, M.J., Pelajo-Machado, M., Werneck, G.L., Lenzi, H.L., Daniel-Ribeiro, C.T., Carvalho, L.J., 2009. Characterization of cerebral malaria in the outbred Swiss Webster mouse infected by *Plasmodium berghei* ANKA. *International Journal of Experimental Pathology* 90, 119–130.
- Medana, I.M., Chaudhri, G., Chan-Ling, T., Hunt, N.H., 2001. Central nervous system in cerebral malaria: 'Innocent bystander' or active participant in the induction of immunopathology? *Immunology and Cell Biology* 79, 101–120.
- Medana, I.M., Turner, G.D., 2006. Human cerebral malaria and the blood-brain barrier. *International Journal for Parasitology* 36, 555–568.
- Menke, J., Zeller, G.C., Kikawada, E., Means, T.K., Huang, X.R., Lan, H.Y., Lu, B., Farber, J., Luster, A.D., Kelley, V.R., 2008. CXCL9, but not CXCL10, promotes CXCR3-dependent immune-mediated kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology* : JASN 19, 1177–1189.
- Miu, J., Mitchell, A.J., Müller, M., Carter, S.L., Manders, P.M., McQuillan, J.A., Saunders, B.M., Ball, H.J., Lu, B., Campbell, I.L., Hunt, N.H., 2008. Chemokine gene

- expression during fatal murine cerebral malaria and protection due to CXCR3 deficiency. *Journal of Immunology* 180, 1217–1230.
- Nie, C.Q., Bernard, N.J., Norman, M.U., Amante, F.H., Lundie, R.J., Crabb, B.S., Heath, W.R., Engwerda, C.R., Hickey, M.J., Schofield, L., Hansen, D.S., 2009. IP-10-mediated T cell homing promotes cerebral inflammation over splenic immunity to malaria infection. *PLoS Pathogens* 5, e1000369.
- Ransohoff, R.M., 2002. The chemokine system in neuroinflammation: an update. *The Journal of Infectious Diseases* 186, 152–156.
- Reiner, R.G., Tanner, A.R., Keyhani, A.H., Wright, R., 1981. A comparative study of lysosomal enzyme activity in monocytes and Kupffer cells isolated simultaneously in a rat model of liver injury. *Clinical and Experimental Immunology* 43, 376–380.
- Rogers, D.C., Fisher, E.M., Brown, S.D., Peters, J., Hunter, A.J., Martin, J.E., 1997. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mammalian Genome* 8, 711–713.
- Simpson, J.E., Newcombe, J., Czuzner, M.L., Woodroffe, M.N., 2000. Expression of the interferon- $\gamma$ -inducible chemokines IP-10 and Mig and their receptor, CXCR3, in multiple sclerosis lesions. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 26, 133–142.
- Sui, Z., Sniderhan, L.F., Schifitto, G., Phipps, R.P., Gelbard, H.A., Dewhurst, S., Maggirwar, S.B., 2007. Functional synergy between CD40 ligand and HIV-1 Tat contributes to inflammation: implications in HIV type 1 dementia. *Journal of Immunology* 178, 3226–3236.
- Van den Steen, P.E., Deroost, K., Van Aelst, I., Geurts, N., Martens, E., Struyf, S., Nie, C.Q., Hansen, D.S., Matthys, P., Van Damme, J., Opdenakker, G., 2008. CXCR3 determines strain susceptibility to murine cerebral malaria by mediating T lymphocyte migration toward IFN- $\gamma$ -induced chemokines. *European Journal of Immunology* 38, 1082–1095.
- van der Heyde, H.C., Nolan, J., Combes, V., Gramaglia, I., Grau, G.E., 2006. A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends in Parasitology* 22, 503–508.
- Vilela, M.C., Mansur, D.S., Lacerda-Queiroz, N., Rodrigues, D.H., Arantes, R.M., Kroon, E.G., Campos, M.A., Teixeira, M.M., Teixeira, A.L., 2008. Traffic of leukocytes in the central nervous system is associated with chemokine up-regulation in a severe model of herpes simplex encephalitis: an intravital microscopy study. *Neuroscience Letters* 445, 18–22.
- Vilela, M.C., Mansur, D.S., Lacerda-Queiroz, N., Rodrigues, D.H., Lima, G.K., Arantes, R.M., Kroon, E.G., da Silva Campos, M.A., Teixeira, M.M., Teixeira, A.L., 2009. The chemokine CCL5 is essential for leukocyte recruitment in a model of severe herpes simplex encephalitis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1153, 256–263.
- WHO, 2000. Severe falciparum malaria: World Health Organization, communicable diseases cluster. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 94, S1–S90.

**Platelet-Activating Factor Receptor (PAFR) is essential for the development of  
experimental cerebral malaria**

Norinne Lacerda-Queiroz<sup>1,2</sup>, David Henrique Rodrigues<sup>2</sup>, Márcia Carvalho Vilela<sup>2</sup>,  
Milene Alvarenga Rachid<sup>2</sup>, Frederico M. Soriani<sup>2</sup>, Lirlândia P. Sousa<sup>2</sup>, Roberta  
Dayrell de Lima Campos<sup>2</sup>, Valerie F. J. Quesniaux<sup>3</sup>, Mauro Martins Teixeira<sup>2</sup>,  
Antonio Lucio Teixeira<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil.

<sup>2</sup> Laboratório de Imunofarmacologia/Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil.

<sup>3</sup> Molecular Immunology and Embryology UMR6218 CNRS and University of Orleans, Orléans, France.

<sup>4</sup> Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil.

**\* Corresponding authors:**

Norinne Lacerda-Queiroz and Antonio Lucio Teixeira

Laboratory of Immunopharmacology, sala O4 202

Instituto de Ciências Biológicas

Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha

Belo Horizonte, MG, Brasil

Phone number: 5531 (XX) 3409-2649

Fax number: 5531 (XX) 3409-2545

E-mail address: [norinneq@yahoo.com.br](mailto:norinneq@yahoo.com.br) and [altexr@gmail.com](mailto:altexr@gmail.com)

## ABSTRACT

Severe malaria results from an overt inflammatory response during infection by *Plasmodium falciparum*. Cerebral malaria (CM) is a major clinical expression of severe malaria. The understanding of the pathogenesis of CM may aid in the development of better therapeutic strategies for patients. The immune response in CM involves elevation of circulating levels of cytokines and chemokines associated with leukocyte recruitment and breakdown of blood-brain barrier in the central nervous system. Platelet-activating factor (PAF) is a mediator of inflammation shown to orchestrate inflammatory processes, including recruitment of leukocytes and increase of vascular permeability. Using mice lacking the PAF receptor (PAFR<sup>-/-</sup>), we investigated the relevance of this molecule for the outcome and the neuroinflammatory process triggered by *Plasmodium berghei* ANKA, an experimental model of CM. In the absence of PAFR, lethality was markedly delayed and brain inflammation was significantly reduced, as demonstrated by histology, recruitment and activation of CD8<sup>+</sup> T cells, changes in vascular permeability and activation of caspase-3 on endothelial cells and leukocytes. Akin to PAFR<sup>-/-</sup> mice, treatment with the PAFR antagonist UK-74,505 delayed lethality. Altogether the results suggest that PAFR signaling is crucial for the development of CM. Mechanistically, PAFR activation is crucial for the cascade of events leading to changes in vascular permeability, recruitment and activation of CD8<sup>+</sup> T cells and apoptosis of leukocytes and endothelial cells.



## 1. Introduction

Malaria infection may present different clinical forms, from asymptomatic to a complicated form, called severe malaria. Severe malaria is a syndrome characterized by variable combination of severe anemia, respiratory complications, acidosis and cerebral malaria (CM), as a consequence of *Plasmodium falciparum* infection.<sup>1</sup>

Although the exact pathogenesis of CM remains unclear, several mechanisms have been raised to explain it, including microvascular obstruction, inflammatory and adaptive immune responses.<sup>2</sup> Experimental cerebral malaria (ECM) does not reproduce human disease exactly, but it does exhibit some histopathological similarities including changes in cerebral microvasculature, breakdown of blood-brain barrier (BBB), petechial hemorrhages, congestion and edema in brain.<sup>3</sup> ECM is considered, therefore, a useful method to study the pathogenesis of CM. In ECM induced by *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) infection, T-cell sequestration and activation are crucial steps for disease development.<sup>4,5</sup> Other studies have found that concomitant brain sequestration of CD8<sup>+</sup> T cells and recruitment of parasitized red blood cells (pRBC) also contribute for the development of ECM.<sup>6</sup> Additionally, BBB is compromised following infection by PbA via induction of endothelial cells apoptosis by CD8<sup>+</sup> T cells in a perforin-dependent process.<sup>7,8,9</sup>

Platelet-activating factor (PAF) is a phospholipid mediator of inflammation, known to mediate recruitment and activation of leukocytes, increase of vascular permeability, and release of cytokines and chemokines.<sup>10</sup> PAF acts via a single G protein-coupled receptor (PAFR), which may be expressed on cellular and nuclear membranes of leukocytes, endothelial cells and platelets.<sup>11</sup> We hypothesized that PAF/PAFR pathway may play an essential role in the development of ECM by

controlling relevant pathways need for development of disease, including leukocyte infiltration, changes in vascular permeability and apoptosis of relevant cells types. PAFR deficient mice were used to address the involvement of PAFR for the outcome of infection caused by PbA and the associated inflammatory process. The relevance of this pathway for infection outcome was further confirmed using a long lasting, selective PAFR antagonist, UK74,505.<sup>12</sup> The results presented herein show that absence or pharmacological blockade of PAFR confers significant protection against ECM caused by PbA, indicating that PAFR is a relevant gene in the context of CM.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Animals**

Wild-type (WT) C57Bl/6 (6 to 8-wk-old) mice were obtained from the Animal Care Facilities of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG-Brazil). PAFR<sup>-/-</sup> mice, with C57BL/6 genetic background, were a kind gift from Dr. Takao Shimizu (University of Tokyo, Japan) and were bred and maintained under SPF conditions at Instituto de Ciências Biológicas (ICB-UFMG). The Animal Ethics Committee of UFMG approved all experimental procedures used (protocol number: 193/06).

### **2.2 Experimental infection**

Mice were infected with PbA by intraperitoneal (i.p.) injection of 10<sup>6</sup> parasitized red blood cells (pRBC) suspended in 0.2 mL PBS.<sup>13</sup> Level of parasitemia in infected mice was monitored on Giemsa-stained blood films from day 3 onwards and estimated at 1,000 RBCs under immersion oil. Mice were observed daily for body weight measurement, survival and clinical neurological signs of ECM culminating in ataxia, paralysis and coma.

### **2.3 Histopathology**

For histological analysis, brains were quickly removed and fixed in 10% buffered formalin. The sections (4µm) were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and were examined under a light microscope (Olympus BX51). The histopathological analyses, in the brain, were performed in cerebral cortex, cerebellum and brainstem. Each area of the brain was graded on 0 to 4-point scale: 0 = no pathology; 1 = minimal;

2 = mild; 3 = moderate and 4 = intense. The evaluated processes were: vascular plugging and hemorrhages.

#### **2.4 Intravital microscopy in mouse brain**

Intravital microscopy of mouse brain microvasculature was performed as previously described.<sup>14</sup> Briefly, control and infected mice (3 and 6 dpi) were anesthetized by i.p injection of a mixture of Ketamine (150 mg/Kg, Laboratório Cristália, SP) and Xylazine (10 mg/kg, Rompun<sup>®</sup>, Bayer) and the tail vein was cannulated for administration of rhodamine 6G. The craniotomy was performed using a high-speed drill (Beltec, Brazil) and the dura and arachnoid mater were removed to expose the underlying pial vasculature. Throughout the experiment, the mice were maintained at 37°C with a Thermo Plate (TOKAI HIT, Nikon Inc., Japan) and the exposed brain was continuously superfused with artificial cerebrospinal fluid buffer, an ionic composition in mmol/L: NaCl 132, KCl 2.95, CaCl<sub>2</sub> 1.71, MgCl<sub>2</sub> 0.64, NaHCO<sub>3</sub> 24.6, dextrose 3.71 and urea 6.7, pH 7.4, at 37°C.

To observe leukocyte/endothelium interactions, leukocytes were fluorescently labeled by i.v. administration of rhodamine 6G (0.3 mg/kg, Sigma) and observed using a microscope (Nikon, Eclipse 501, X10 objective lens, corresponding to 100 µm of area) outfitted with a fluorescent light source (epi-illumination at 510-560 nm, using a 590 nm emission filter). A camera (Nikon, DS-Qi1MC) mounted on the microscope projected the image onto a monitor (LG, FLATRON-W1952TQ). The number of rolling and adherent leukocytes was determined offline during video playback analysis. Leukocytes were considered adherent to the venular endothelium if they remained stationary for a minimum of 30s and expressed as number of cells/100µm. Rolling leukocytes were

defined as white cells moving at a velocity lower than that of erythrocytes within a given vessel.

## **2.5 Lysate preparation and Western blot analysis**

Western blot analysis for cleaved caspase-3 was performed as described.<sup>15</sup> Briefly, whole cell extracts were obtained from homogenized brains by using a lyses buffer (1% (v/v) Triton X-100, 100 mM Tris/HCl, pH 8.0, 10% (v/v) glycerol, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 25mM NaF, 2.5 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml aprotinin, and 1mM sodium orthovanadate). Lysates were centrifuged at 13,000×g for 10min at 4°C and quantified using the Bradford assay reagent from Bio-Rad (Hercules, CA). Protein extracts (25µg) were separated by electrophoresis on a denaturing 15% polyacrylamide-SDS gel and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked overnight at 4°C with PBS containing 5% (w/v) non-fat dry milk and 0.1% Tween-20 and washed three times with PBS containing 0.1% Tween-20. The membranes were then incubated with rabbit anti-cleaved caspase-3 (Cell Signalling Technology - Beverly MA, USA) or mouse anti-β-actin (Sigma-Aldrich) using a dilution of 1:1000 in phosphate-buffered saline containing 5% (w/v) BSA and 0.1% Tween-20. After washing, membrane was incubated with appropriate horseradish peroxidase conjugated secondary antibody (1:3000). Immunoreactive bands were visualized by using an enhanced chemiluminescence detection system, as described by the manufacturer (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). The levels of cleaved caspase-3 were quantified by using a densitometric analysis software (ImageJ, Image Processing and Analysis in Java), and the values were normalized to the values of β-actin in the same sample. Changes in protein levels were estimated, and the results were expressed as a cleaved caspase-3/β-actin ratio, measured in arbitrary units.

## **2.6 Immunohistochemistry**

Endothelial cells immunoreactive for cleaved caspase-3 were analyzed *in situ* after staining with relevant antibodies. Brain sections (4µm) from formalin fixed paraffin tissue were submitted to antigen unmasking with sodium-citrate buffer (pH 6) for 20 min, washed and blocked for endogenous peroxidase activity (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS/BSA 1%) for 30 min. After slides were washed and blocked with PBS containing 5% (w/v) non-fat dry milk and 0.1% Tween-20. All incubations were carried out in a wet chamber. Brain sections were then incubated with rabbit monoclonal antibody against activated caspase-3 (Cell Signalling) which was diluted 1:500 and permitted to bind overnight at 4°C. Biotinylated link and streptavidin-HRP (Dako) were applied and after washing, sections were incubated with peroxydase substrate (diaminobenzidine; Dako). Finally, sections were counterstained with haematoxylin, washed, mounted, and examined microscopically. Sections without primary antibodies were equally processed to control for unspecific binding. Cell immunoreactivity for cleaved caspase-3 were scored 0 to 4 using the following point scale: 0 = no signal; 1 = minimal; 2 = mild; 3 = moderate and 4 = intense.

## **2.7 Assessment of blood-brain barrier integrity**

The integrity of the BBB was investigated using Evans-Blue (EB) dye as previously reported.<sup>16</sup> Mice were injected intravenously with 0.2mL of 1% EB solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) on day 6. One hour later, mice were sacrificed and perfused intracardially with 5mL of PBS. Brain samples were removed, weighted, and EB extravasation was evaluated by formamide incubation (1mL) for 24h. The amount of EB in tissue extracts was measured by absorbance at 610nm as an index of increased

capillary permeability. Results are shown as the amount of EB (pg) present in 100mg of brain tissue.

## **2.8 Gene expression analysis by real-time quantitative PCR (qPCR)**

Brains were removed for analysis of transcript levels of IL-1 $\beta$ , IL-10 and molecules involved in adhesion process, such as intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). The primers used are presented in Table 1. Total RNA was obtained using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the procedure supplied by the manufacturer. Total RNA was reverse transcribed with SuperScript III (Invitrogen) as described by the manufacturer. Real-time quantitative PCR was performed on an ABI PRISM Step-One sequence-detection system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). The relative expression level of genes was determined by the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta$ Ct) method and data were normalized by 18S ribosome subunit expression levels. All reactions were replicated.

## **2.9 ELISA of cytokines in the CNS**

Brain tissues were obtained from control and infected mice (on day 6 p.i.) and homogenized in extraction solution containing aprotinin. The levels of CCL2, CCL3, CCL5, and CXCL1 were determined by ELISA. The samples, at a 1:3 dilution in PBS/BSA 0.1%, were assayed in an ELISA set-up using commercially available antibodies and the concentrations according to the procedures supplied by the manufacturer (R&D Systems, Minneapolis, MN and Pharmingen, San Diego, CA).

## **2.10 Isolation of leukocytes in the CNS**

Mice were euthanized on day 7 p.i., a time point when all WT mice showed neurological symptoms of ECM. They were perfused intracardially with PBS to remove both circulating and non-adherent RBCs and leukocytes. Brains were removed and adherent leukocytes isolated using previously described protocols.<sup>17, 5</sup> Each sample (n) comprises a pool of 2-3 mice brains. Briefly, brains were collected and homogenized gently using the sterile glass tissue grinder in RPMI 1640 medium containing 5% FCS. Homogenates were passed through a nylon cell strainer (70  $\mu$ m; Becton Dickinson, Brazil) and then centrifuged at 400 $\times$ g for 10 minutes. The pellet was resuspended in 35% Percoll gradient (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and this was kindly deposited on a 70% Percoll gradient. After centrifugation (1,100 $\times$ g), myelin was aspirated off the top of the 35% Percoll layer and leukocytes were collected at the boundary layer, between the 70% and 35% gradient. Afterwards, leucocytes were resuspended in FACS buffer (PBS containing 1% FCS and 0.01% NaN<sub>3</sub>) and counted.

### **2.11 Immunolabeling and flow cytometric analysis (FACS)**

Brain-sequestered cells were stained for extracellular molecular expression patterns using monoclonal antibodies (mAb) against mouse CD3 conjugated to phycoerythrin (PE) (BD Pharmingen San Diego, CA; clone 17A2), CD8 $\alpha$  conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) (BD Pharmingen San Diego, CA; clone 53-6.7), CD62L conjugated to Phycoerythrin-Cy5 (PE-Cy5) (BioLegend; clone MEL-14) and isotype controls (all from Pharmingen San Diego, CA). For each sample, 20,000 cells from lymphocyte population were scored. The frequency of positive cells was analyzed using a gate that included lymphocytes. Limits for the quadrant markers were always set based on negative populations and isotype controls. Data were acquired on a FACScan (Becton Dickinson, San José, CA, USA) and analysed using the FlowJo 7.5.3 software



(TreeStar Inc., Ashland, Oregon, USA). Results are presented as absolute number of cells per brain or mean fluorescence intensity (MFI) as indicated.

### **2.12 Treatment with UK-74,505**

PAFR antagonist UK-74,505 (10mg/Kg), diluted in 0.1% (v/v) HCl in PBS, was given orally, once a day, from day 3 after infection in C57Bl/6.<sup>18</sup> Control group (vehicle) received the same volume of the solution used to dilute UK-74,505. Parasitemia, body weight variations and survival were analyzed.

### **2.13 Statistical analysis**

Data are shown as mean±SEM. ANOVA with Newman-Keuls post test was used for multiple comparisons. Survival rates were compared using a log-rank test. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

### **3. Results**

#### **3.1. Deficiency in PAFR prevents the development of ECM**

Inoculation of WT C57Bl/6 mice with PbA induced parasitemia which was first detectable on day 3 and increased significantly thereafter (Figure 1A). Parasitemia was associated with significant weight loss (Figure 1B) and most animals were dead at day 7 p.i. (Figure 1C). Parasitemia and weight loss in PAFR<sup>-/-</sup> mice were similar to those found in WT mice till day 7. However, PAFR<sup>-/-</sup> mice recovered their weight and most animals survived (60%) past day 7 p.i. Thereafter, parasitemia increased significantly in PAFR<sup>-/-</sup> mice and approximately 60% of red blood cells were infected at day 20, after which time most animals succumbed to the infection. The increased in parasitemia was associated with a second wave of weight loss in PAFR<sup>-/-</sup> mice. Altogether, these studies show that absence of PAFR protected mice against ECM after PbA infection.

#### **3.2. Infected PAFR<sup>-/-</sup> mice present mild histopathological changes in brain**

A series of experiments were then undertaken trying to understand why PAFR<sup>-/-</sup> mice survive for longer than WT mice. Control and infected mice killed at day 3 p.i. had no evidence of morphological changes in the brain (not shown). On day 6 p.i., there was intense intravascular leukocyte accumulation and vascular plugging in various brain regions of WT infected mice (seen as \* in Figure 2). Semi-quantification experiments showed that vascular plugging was in general less severe in PAFR<sup>-/-</sup> than WT mice (Figure 2G). There were also hemorrhagic areas, especially in the cerebellum of WT infected mice (Figure 3 E and H). Cerebellar hemorrhage was virtually absent in infected PAFR<sup>-/-</sup> mice (Figure 3F and H).

#### **3.3. Rolling and adhesion of leukocytes in pial vessels is independent of PAFR**

As there was decreased inflammation in infected PAFR<sup>-/-</sup> mice, we investigated whether this receptor played any significant role for the recruitment of cells into the brain of infected mice. Intravital microscopy in the pia-mater vasculature was used to measure rolling and adhesion induced by PbA infection. Infected animals had an increase in the number of leukocytes rolling and adhering on endothelium at day 6 p.i. when compared to uninfected control animals (Figure 3A and B), an event which precedes death in these animals (see Figure 1). Infected PAFR<sup>-/-</sup> mice had similar increase in leukocyte rolling and adhesion as infected WT 6 days p.i. The cell adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 are relevant for the sequestration of leukocytes to the brain of animals in the context of ECM.<sup>19</sup> Transcript levels of ICAM-1 and VCAM-1 were significantly increased in both WT and PAFR<sup>-/-</sup> infected mice at day 6 p.i. (Figure 3C and D).

#### **3.4 PAFR deficiency attenuates caspase-3 activation and brain vascular permeability on PbA infection**

Caspase-3-mediated apoptosis of endothelial cells occur in ECM and may be relevant for the pathogenesis of disease.<sup>20</sup> To determine whether PAFR regulates activation of caspase-3 in the course of ECM, brain extracts from WT and PAFR<sup>-/-</sup> mice were examined for the presence of cleaved subunits of caspase-3 (17/19kDa) (Figure 4A). In infected WT mice, densitometry measures revealed marked increase of caspase-3 17/19kDa subunits at day 6 p.i. Caspase-3 activation was significantly lower in infected PAFR<sup>-/-</sup> mice (Figure 4B).

Consistent with the finding of activated caspase-3 by immunoblotting, cells immunoreactive for activated caspase-3 were observed in brain samples of infected mice on day 6 p.i. Caspase-3<sup>+</sup> cells were frequently clustered around vessels with

caspase-3<sup>+</sup>endothelial cells and sequestered leucocytes (Figure 5B). In contrast, activated caspase-3 immunoreactivity was absent in brain tissue from non-infected animals (Figure 5A). Infected PAFR<sup>-/-</sup> mice showed less number of caspase-3<sup>+</sup> cells than infected WT mice (Figure 5C and 5D).

As the administration of PAF has been associated with increased vascular permeability,<sup>21</sup> the integrity of BBB was investigated next. At day 6 p.i., BBB integrity was determined by measuring EB extravasation into the cerebral parenchyma. There was clearly visible vascular leakage of EB in PbA-infected WT mice whereas PAFR<sup>-/-</sup> mice exhibited no discoloration of the brain parenchyma (Figure 6A). When the extravasation of EB was quantified, there was over 75% decrease in the amount of EB in the brain of infected mice (Figure 6B), indicating preserved BBB integrity in PAFR<sup>-/-</sup> mice. Taken together, these data demonstrate cerebral vascular protection in the absence of PAFR in PbA-induced ECM.

### **3.5 Analysis of cytokine expression and chemokynes molecules in the brain**

Since IL-10 seems to modulate ECM induced by PbA and, on the other hand, IL-1 $\beta$  can contribute to BBB damage,<sup>22</sup> we evaluated transcript levels of pro-IL-1 $\beta$  and IL-10 by qPCR. Levels of these cytokines could not be determined consistently using ELISA (data not shown). PbA infection induced significant expression of pro-IL-1 $\beta$  increased in the brain of WT mice. In PAFR<sup>-/-</sup> mice, this increase was not significant (Figure 7A). Expression of IL-10 was similar in both WT and PAFR<sup>-/-</sup> mice (Figure 7B).

We evaluated the levels of the following chemokines by ELISA in brain extracts: CCL2, CCL3, CCL5 and CXCL1. Infection of WT mice with PbA was associated with an increase in levels of CCL2 and CCL5 (Figure 7 C and D). In

contrast, there was no increase of CCL3 and CXCL1 after infection of WT mice (data not shown). In PAFR<sup>-/-</sup> mice, there was an increase in levels of both CCL2 and CCL5 but the increase in CCL2 levels was slightly lower than that observed in WT infected mice. Therefore, pro-IL-1 $\beta$  message and CCL2 protein were significantly less expressed in the brain of PAFR<sup>-/-</sup> than WT mice after PbA infection.

### **3.6 Absence of PAFR reduced cerebral T cell sequestration and activation.**

A few studies have shown that activated CD8<sup>+</sup> T cells play a crucial role in the pathogenesis of ECM. <sup>4</sup> Therefore, we measured number and state of activation of CD8<sup>+</sup> T cells in the brain of WT and PAFR<sup>-/-</sup> mice at day 7 p.i., a time point when typical neurological symptoms of ECM are established. There was significant increase in number of CD8<sup>+</sup> T cells in the brain of both WT and PAFR<sup>-/-</sup> mice after PbA infection (Figure 8A). However, the increase of CD8<sup>+</sup> T cells observed in infected PAFR<sup>-/-</sup> mice was 39% lower than that observed in WT mice. Activation of CD8<sup>+</sup> T cells was investigated by evaluating surface expression of CD62L. As seen in Figure 8B, PbA infection was associated with CD8<sup>+</sup> T cell activation, as determined by a decrease in CD62L expression. In contrast, CD8<sup>+</sup> T cells were less activated in PAFR<sup>-/-</sup> than WT mice (Figure 8B).

### **3.7 Treatment with a PAFR antagonist partially prevents cerebral malaria**

To test the potential pharmacological use of PAFR blockade in the context of ECM, we used UK-74,505, a selective PAFR antagonist, in a therapeutic protocol; ie. treatment was initiated 3 days after infection. Treatment with the PAFR antagonist significantly delayed lethality in C57Bl/6 infected mice (Figure 9C). Akin to results

seen in PAFR<sup>-/-</sup> mice, parasitemia (Figure 9A) and body weight variation (Figure 9B) were similar to animals treated with drug vehicle.

## Discussion

In this study, we investigated the relevance of PAFR for the outcome of PbA infection using PAFR<sup>-/-</sup> mice and a long-lasting and selective PAFR antagonist, UK74,505. We demonstrated that PAFR deletion or antagonism significantly delayed death in a model of ECM induced by infection with PbA. Parasitemia increased similarly in all groups, suggesting that PAFR is not relevant for parasite replication and that the compound does not appear to have any significant anti-malarial properties. Therefore, PAFR appears to be relevant for the inflammatory events which are eventually associated with premature death of the host. Indeed, in brain of PAFR<sup>-/-</sup> infected mice, there was significant reduction in vascular plugging and hemorrhage, decreased levels of IL-1 $\beta$ , decreased number and state of activation of CD8<sup>+</sup> T cells and markedly reduced changes in vascular permeability.

Mice that succumb to ECM develop a neurological condition characterized by paralysis, ataxia, seizures, and coma, resulting in high mortality.<sup>23</sup> CD8<sup>+</sup> T cell sequestration and activation seem to be essential events for the pathogenesis of ECM in PbA-infected C57Bl/6 mice<sup>4</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell depletion prevented neurological signs of ECM.<sup>24</sup> Our data show a clear reduction of CD8<sup>+</sup> T cells recruitment in the absence of a functional PAFR. The lymph node homing receptor CD62L (L-selectin) is highly expressed on naive T cells and down-regulated after T cell activation.<sup>25</sup> The expression of CD62L in CD8<sup>+</sup> T cells was significantly reduced in infected WT mice but to a lesser extent in infected PAFR<sup>-/-</sup> mice. Therefore, activation of CD8<sup>+</sup> T cells was reduced in the brain of PAFR<sup>-/-</sup> mice, indicating that absence of PAFR is impairing CD8<sup>+</sup> T cell activation and recruitment to the central nervous system.

Leukocyte rolling and adhesion in the pial vasculature was similar in PAFR<sup>-/-</sup> and WT mice infected with PbA. Previous work from our group also showed that

absence of PAFR attenuated experimental allergic encephalomyelitis, but the milder disease in PAFR<sup>-/-</sup> was independent of rolling and adhesion of leukocytes in the pial microvasculature.<sup>14</sup> ICAM-1 adhesion molecule has been linked to CM due to its role in pRBC and T-cell adhesion to brain endothelial cells.<sup>26</sup> VCAM-1 may also play a role in the pathogenesis of cerebral malaria.<sup>27</sup> In our model of ECM, expression of ICAM-1 and VCAM-1 were enhanced by infection but not were different in WT and PAFR<sup>-/-</sup> mice. Similarly, there were only minor changes in expression of chemokines in brain of infected WT and PAFR<sup>-/-</sup> mice, providing a molecular basis for the finding that overall rolling and adhesion were not different in WT and PAFR<sup>-/-</sup> mice. In contrast to normal overall rolling and adhesion, there was decreased number of CD8<sup>+</sup> T cells in the brain of infected PAFR<sup>-/-</sup> mice, as discussed above. Therefore, although there is similar number of overall leukocyte/endothelial cell interactions in the brain, infiltration of specific leukocytes subsets is deficient in PAFR<sup>-/-</sup> mice. This is consistent with findings that activated lymphocytes express PAFR on their surface<sup>28</sup> and that lipid mediators may selectively modulate lymphocyte subset migration in a tissue-specific manner.<sup>29</sup>

Although the precise mechanisms by which CD8<sup>+</sup> T cells mediate cerebral pathology are still unclear, it has been suggested that CD8<sup>+</sup> T cells may damage the BBB via the induction of endothelial cells apoptosis in a perforin-dependent process.<sup>7, 8,</sup>  
<sup>9</sup> Apoptosis of endothelial cells may represent a critical event for the development of ECM in the mouse model.<sup>30</sup> Following caspase-3 activation, Lackner *et al.*<sup>20</sup> found activation of apoptosis in brain endothelial cells in the early course of PbA infection, even when clinical signs were only mild. Interestingly, caspase-3 immunoreactive endothelial cells were primarily found in vessels with extensive leukocyte sequestration.  
<sup>20</sup> In our study, we observed reduced expression of cleaved caspase-3 in PAFR<sup>-/-</sup> mice, which was associated with decrease in the number of leukocytes and endothelial cells



undergoing apoptosis. It is unclear why there was less apoptosis in the system and how PAFR activation would lead to enhanced endothelial cell and leukocyte apoptosis. However, it has been shown that activation of PAFR causes apoptosis of certain leukocytes<sup>31</sup> and is relevant for the capacity of oxidized lipoproteins to induce apoptosis of vascular endothelial cells.<sup>32</sup> There was significant inhibition of plugging in the cerebral circulation of infected PAFR<sup>-/-</sup> mice. Decreased plugging could account for the decrease in endothelial cell apoptosis observed, as plugging may induce local ischemia. Indeed, leukocytes, platelets and pRBC within the microvasculature can induce a pro-inflammatory cascade that, ultimately, promotes endothelial cell apoptosis.<sup>24, 7, 8</sup> However, in contrast to human platelets, murine platelets are not responsive to PAF and do not express PAFR,<sup>33</sup> but this receptor is expressed at high levels on murine leukocytes and endothelial cells.<sup>34</sup> Regardless of the mechanisms explaining decreased apoptosis in PAFR<sup>-/-</sup> mice, it is clear that decreased apoptosis of leukocytes and endothelial cells may contribute to the protected phenotype of PAFR<sup>-/-</sup> mice.

PAF is a lipid mediator involved not only with the recruitment and activation of leukocytes,<sup>10</sup> but is also able to induce direct changes in BBB permeability *in vitro*.<sup>35</sup> Following infection by PbA, BBB is compromised and this has been considered one of the major events in the pathogenesis of ECM.<sup>36, 37, 23</sup> In the present study, cerebral vascular permeability was increased after infection by PbA, as quantified through EB leakage. More importantly, there was virtual absence of changes in vascular permeability in the brain of infected PAFR<sup>-/-</sup> mice. Thus, we hypothesized that CD8<sup>+</sup> T cell-dependent caspase-3-mediated apoptosis of endothelial cells coupled with direct activation of PAFR may be responsible for BBB breakdown and hemorrhage in the brain of PbA-infected mice.

In conclusion, these results constitute strong evidence that PAFR have an important role during ECM. More importantly, experiments with a long-lasting orally bioavailable PAFR antagonist <sup>12</sup> showed that the protective effects of PAFR blockade was still present when the compound was given after infection and before the major symptoms had appeared. To the best of our knowledge, this is the first demonstration that PAFR signaling is critical for development of ECM. Moreover, our data also suggest that PAFR antagonism is useful in ECM and may be a promising therapeutic strategy in patients with CM.

### **Acknowledgments**

The authors thank Carlos Henrique da Silva and Frankcinéia Assis for their technical assistance. This work was financially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and INCT em Dengue, Brazil.

## References

1. WHO: Severe falciparum malaria: World Health Organization, communicable diseases cluster. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000, 94:S1-S90
2. van der Heyde HC, Nolan J, Combes V, Gramaglia I, Grau GE: A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends Parasitol* 2006, 22:503-508
3. Hearn J, Rayment N, Landon DN, Katz DR, de Souza JB: Immunopathology of cerebral malaria: morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature. *Infect Immun* 2000, 68:5364-5376
4. Rénia L, Potter SM, Mauduit M, Rosa DS, Kayibanda M, Deschemin JC, Snounou G, Gruner AC: Pathogenic T cells in cerebral malaria. *Int J Parasitol* 2006, 36:547-554
5. Fauconnier M, Bourigault ML, Meme S, Szeremeta F, Palomo J, Danneels A, Charron S, Fick L, Jacobs M, Beloeil JC, Ryffel B, Quesniaux VF: Protein kinase C-theta is required for development of experimental cerebral malaria. *Am J Pathol* 2011, 178:212-221
6. Baptista FG, Pamplona A, Pena AC, Mota MM, Pied S, Vigário AM: Accumulation of *Plasmodium berghei*-infected red blood cells in the brain is crucial for the development of cerebral malaria in mice. *Infect Immun* 2010, 78:4033-4039

7. Potter S, Chan-Ling T, Ball HJ, Mansour H, Mitchell A, Maluish L, Hunt NH: Perforin mediated apoptosis of cerebral microvascular endothelial cells during experimental cerebral malaria. *Int J Parasitol* 2006, 36:485-496
8. Wassmer SC, Combes V, Candal FJ, Juhan-Vague I, Grau GE: Platelets potentiate brain endothelial alterations induced by *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 2006, 74:645-653
9. Suidan GL, McDole JR, Chen Y, Pirko I, Johnson AJ: Induction of blood brain barrier tight junction protein alterations by CD8 T cells. *PLoS ONE* 2008, 3:e3037
10. Chao W, Olson MS: Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem J* 1993, 292:617-629
11. Ishii S, Shimizu T: Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog Lipid Res* 2000, 39:41-82
12. Alabaster VA, Keir RF, Parry MJ, de Souza RN: UK-74,505, a novel and selective PAF antagonist, exhibits potent and long lasting activity in vivo. *Agents Actions Suppl* 1991, 34:221-227
13. Grau G E, Piguet PF, Engers HD, Louis JA, Vassali P, Lambert PH: L3T4+ T lymphocytes play a major role in the pathogenesis of murine cerebral malaria. *J Immunol* 1986, 137:2348-2354

14. Rodrigues DH, Lacerda-Queiroz N, de Miranda AS, Fagundes CT, Campos RD, Arantes RE, Vilela MD, Rachid MA, Teixeira MM, Teixeira AL: Absence of PAF receptor alters cellular infiltrate but not rolling and adhesion of leukocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res* 2011, 1385:298-306
15. Sousa LP, Carmo AF, Rezende BM, Lopes F, Silva DM, Alessandri AL, Bonjardim CA, Rossi AG, Teixeira MM, Pinho V: Cyclic AMP enhances resolution of allergic pleurisy by promoting inflammatory cell apoptosis via inhibition of PI3K/Akt and NF-kappaB. *Biochem Pharmacol* 2009, 78:396-405
16. Belayev L, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD: Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res* 1996, 739:88-96
17. Deb C, Howe CL: Functional characterization of mouse spinal cord infiltrating CD8+ lymphocytes. *J Neuroimmunol* 2009, 214:33-42
18. Souza DG, Fagundes CT, Sousa LP, Amaral FA, Souza RS, Souza AL, Kroon EG, Sachs D, Cunha FQ, Bukin E, Atrasheuskaya A, Ignatyev G, Teixeira MM: Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106:14138-14143
19. Favre N, Da Laperousaz C, Ryffel B, Weiss NA, Imhof BA, Rudin W, Lucas R, Piguet PF: Role of ICAM-1 (CD54) in the development of murine cerebral malaria. *Microbes Infect* 1999, 1:961-968

20. Lackner P, Burger C, Pfaller K, Heussler V, Helbok R, Morandell M, Broessner G, Tannich E, Schmutzhard E, Beer R: Apoptosis in experimental cerebral malaria: spatial profile of cleaved caspase-3 and ultrastructural alterations in different disease stages. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2007, 33:560-571
21. Stafforini DM, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM: Platelet-activating factor, a pleiotropic mediator of physiological and pathological processes. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2003, 40:643-672
22. Allan SM, Tyrrell PJ, Rothwell NJ: Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol* 2005, 5:629-640
23. Hunt NH, Golenser J, Chan-Ling T, Parekh S, Rae C, Potter S, Medana IM, Miu J, Ball HJ: Immunopathogenesis of cerebral malaria. *Int J Parasitol* 2006, 36:569-582
24. Belnoue E, Kayibanda M, Vigario AM, Deschemin JC, van Rooijen N, Viguier M, Snounou G, Rénia L: On the pathogenic role of brain-sequestered alphabeta CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. *J Immunol* 2002, 169:6369-6375
25. Butcher EC, Picker LJ: Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*, 1996 272:60-66

26. Tripathi AK, Sullivan DJ, Stins MF: *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes increase intercellular adhesion molecule 1 expression on brain endothelium through NF-kappaB. *Infect Immun* 2006, 74:3262-3270
27. Herbas MS, Okazaki M, Terao E, Xuan X, Arai H, Suzuki H: alpha-Tocopherol transfer protein inhibition is effective in the prevention of cerebral malaria in mice. *Am J Clin Nutr* 2010, 91:200-207
28. Calabresse C, Nguer MC, Pellegrini O, Benveniste J, Richard Y, Thomas Y: Induction of high-affinity paf receptor expression during T cell activation. *Eur J Immunol* 1992, 22:1349-1355
29. Landgraf RG, Nossi DF, Sirois P, Jancar S: Prostaglandins, leukotrienes and PAF selectively modulate lymphocyte subset and eosinophil infiltration into the airways in a murine model of asthma. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2007, 77:163-172
30. Bienvenu AL, Gonzalez-Rey E, Picot S: Apoptosis induced by parasitic diseases. *Parasit Vectors* 2010, 3:106
31. el Azzouzi B, Jurgens P, Benveniste J, Thomas Y: Immunoregulatory functions of paf-acether. IX. Modulation of apoptosis in an immature T cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1993, 190:320-324
32. Chen CH, Jiang T, Yang JH, Jiang W, Lu J, Marathe GK, Pownall HJ, Ballantyne CM, McIntyre TM, Henry PD, Yang CY: Low-density lipoprotein in

hypercholesterolemic human plasma induces vascular endothelial cell apoptosis by inhibiting fibroblast growth factor 2 transcription. *Circulation* 2003, 107:2102-2108

33. Terashita Z, Imura Y, Nishikawa K: Inhibition by CV-3988 of the binding of [3H]-platelet activating factor (PAF) to the platelet. *Biochem Pharmacol* 1985, 34:1491-1495

34. Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, McIntyre TM: Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem* 2000, 69:419-445

35. Fang W, Geng X, Deng Y, Li Y, Shang E, Cen J, Lv P : Platelet activating factor induces blood brain barrier permeability alteration in vitro. *J Neuroimmunol* 2011, 230:42-47

36. Pino P, Taoufiq Z, Nitcheu J, Vouldoukis I, Mazier D: Blood-brain barrier breakdown during cerebral malaria: suicide or murder? *Thromb Haemost* 2005, 94:336-340

37. Combes V, Coltel N, Faille D, Wassmer SC, Grau GE: Cerebral malaria: role of microparticles and platelets in alterations of the blood-brain barrier. *Int J Parasitol* 2006, 36:541-546



## Figure legends

**Table 1.** Oligonucleotide primers for Real-Time qPCR

**Figure 1. Increased resistance in PAFR<sup>-/-</sup> mice infected with PbA.** Time courses of parasitemia (**A**) and body weight variation (%) (**B**) in infected WT (n=8) and infected PAFR<sup>-/-</sup> (n=7) mice infected with 10<sup>6</sup> pRBC. Significant difference was not observed between the groups until day 7 p.i. Percentage of survival in PbA-infected mice (**C**). WT (Solid lines, n=14) and PAFR<sup>-/-</sup> mice (dashed lines, n=7). The survival curve of PAFR<sup>-/-</sup> was significantly different (21 dpi) of WT (7dpi), with p<0.01. Each point of parasitemia and weight loss is expressed as mean ± SEM. Results are representative of 2 independent experiments.

**Figure 2. Infected PAFR<sup>-/-</sup> mice presents mild histopathological changes in brain.** Representative photomicrographs (×400) of hematoxylin/eosin (HE)-stained brain sections from uninfected control mice (**A, D**), or PbA-infected C57BL/6 (**B, E**) and PAFR<sup>-/-</sup> (**C, F**) mice on day 6 p.i. Normal histological of cerebrum (**A**) and cerebellum (**D**). PbA-infected C57BL/6 showing dense intravascular inflammatory infiltrate (asterisk) in cerebrum (**B**) and cerebellum (**E**). Note also a focal cerebellar hemorrhage (arrow). In contrast, PAFR<sup>-/-</sup> mouse exhibiting less intense vascular plugging (asterisk) in the cerebrum (**C**) and less cerebellar hemorrhage (**F**) when compared to C57BL/6-infected mice. The severity of vascular plugging and hemorrhage assessed semiquantitatively demonstrated a significant reduction in brain disease in PAFR<sup>-/-</sup> mice (**G, H**). Significant differences were indicated by # p<0.05, when compared to C57BL/6-infected mice (n=5 minimum).

**Figure 3. Rolling and adhesion of leukocytes in pial vessels.** Leukocyte-endothelium interaction was performed by intravital microscopy to assess rolling (**A**) and adhesion (**B**) of leukocytes in brain microvasculature. The protocol included control and infected WT and PAFR<sup>-/-</sup> mice. Infected-mice, on day 6 p.i., showed an increase in leukocyte-endothelium interaction when compared with their respective controls. Cell rolling and adhesion was similar between infected WT and infected PAFR<sup>-/-</sup> mice. Transcript levels of ICAM-1 (**C**) and VCAM-1 (**D**) were significantly increased in infected groups at day 6 p.i. Results are expressed as mean ± SEM and are representative of 2 independent experiments (n=5). Significant differences were indicated by \*\*\*p<0.001, when compared to uninfected control counterparts. Significant differences were indicated by \*p<0.05 or \*\*\*p<0.001, when compared to uninfected control counterparts.

**Figure 4. Reduced cleavage of caspase-3 in brain extracts of infected PAFR<sup>-/-</sup> mice.** Western Blot analysis of brain levels of cleaved caspase-3 in WT and PAFR<sup>-/-</sup> mice after PbA infection. Samples were collected and processed for protein extraction. Brain extracts (25 µg) were fractioned on 15% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane, and then probed with anti-cleaved caspase-3 or anti-β-actin antibodies, for loading control (**A**). Densitometric analysis of Western Blot membranes by using ImageJ software are presented as arbitrary units (**B**). Results are expressed as mean ± SEM and are representative of 2 independent experiments. Significant differences were indicated by \*\*\*p<0.001, when compared to uninfected control counterparts or by ###p<0.001, when compared to WT infected mice.

**Figure 5. Reduced immunoreactive cells for cleaved caspase-3 in brain of infected PAFR<sup>-/-</sup> mice.** Representative photomicrographs ( $\times 400$ ) of immunohistologic staining for cleaved caspase-3 were observed in brain slides from uninfected control mice (**A**), or PbA-infected (**B**) and PAFR<sup>-/-</sup> (**C**) mice on day 6 p.i. Activated caspase-3 immunoreactivity was absent in tissue from control animals (**A**). PbA-infected mice showed immunoreactive sequestered leucocytes frequently clustered around vessels with immunoreactive endothelial cells (asterisk) (**B**). In contrast, PAFR<sup>-/-</sup> mouse exhibited less intense immunoreactive cells (asterisk) (**C**) when compared to infected WT mice. Quantification of immunoreactive cells for activated caspase-3 demonstrated a significant reduction in PAFR<sup>-/-</sup> mice (**D**). Significant differences were indicated by ##  $p < 0.01$ , when compared to infected WT mice ( $n = 5-7$ ).

**Figure 6. PAFR<sup>-/-</sup> mice do not develop ECM-associated brain vascular leakage.** Evaluation of BBB breakdown by determination of Evans blue concentration in cerebral parenchyma. Qualitative assessment of brain vascular leak using Evans blue extravasation (**A**). Mice with severe CM on day 6 p.i. infection exhibited blue discoloration of the brain, whereas control mice and infected PAFR<sup>-/-</sup> mice demonstrated no discoloration. Quantitative assessment of brain vascular permeability using Evans blue extravasation in formamide was measured by absorbance at 610 nm in brain extract (**B**). PbA-infected mice showed significant EB concentration in cerebral parenchyma whereas infected PAFR<sup>-/-</sup> mice exhibited no EB extravasation. Values are given as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ) from 2 different experiments. Significant differences were indicated by \*\*\* $p < 0.001$ , when compared to control counterparts or by ####  $p < 0.001$ , when compared to infected WT mice.

**Figure 7. Analysis of chemokines and mRNA cytokine in the brain of PbA-infected mice.** mRNA expression of IL-1 $\beta$  and IL-10 in the brain by qPCR. Transcript levels of IL-1 $\beta$  (**A**) and IL-10 (**B**) were significantly greater in the brains of infected WT mice in contrast with unchanged levels in infected PAFR<sup>-/-</sup> mice. PbA infection up-regulated CCL2 (**C**) and CCL5 (**D**) in both infected mice. Significant differences were indicated by \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001, when compared to control counterparts or by # p<0.05 and ## p<0.01, when compared to infected WT mice.

**Figure 8. Reduced recruitment and activation of CD8<sup>+</sup> lymphocytes in the brain of PbA-infected PAFR<sup>-/-</sup> mice.** Flow cytometry analyses of brain-sequestered leukocytes from uninfected control, PbA-infected WT mice with ECM, and infected CM-resistant PAFR<sup>-/-</sup> mice on day 7 p.i.. Absolute numbers of CD8<sup>+</sup> T cells. The numbers of CD8<sup>+</sup> T cells are shown in comparison to total number of leukocytes in the brain (**A**). Activated CD8<sup>+</sup> lymphocytes expression of CD62L was also evaluated and expressed as MFI (**B**). Representative dot plots of CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells (**C**). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM and are representative of 3 independent experiments, with 4 pools of 2 to 3 mice per group. \*\* p<0.01, \*\*\*p<0.001 when compared to uninfected control mice. ## p<0.01 and ### p<0.001, when compared to infected WT mice. MFI: Mean fluorescence intensity.

**Figure 9. Treatment with a PAFR antagonist prevents partially against cerebral malaria.** UK-74,505 was given orally, once a day, at the dose of 10 mg/kg, daily from day 3 until death after infection in infected WT mice. Survival, parasitemia and body weight variations were analyzed. Percentage of survival in PbA-infected mice (**A**), where solid lines denote vehicle-treated mice (n=8) and dashed lines, UK-74,505-

treated mice (n=8). Survival curves were significantly different, with  $p < 0.05$ . Time courses of parasitemia (**B**) and body weight variations (%) (**C**), with no differences between the groups. Each point of parasitemia and weight loss is expressed as mean  $\pm$  SEM.

**Table 1.**

| <b>Gene</b>   |         | <b>Primer Sequence</b>        |
|---------------|---------|-------------------------------|
| mIL-10        | Forward | 5'-GCTCTTACTGACTGGCATGAG-3'   |
|               | Reverse | 5'-CGCAGCTCTAGGAGCATGTG-3'    |
| mIL-1 $\beta$ | Forward | 5'-CTACAGGCTCCGAGATGAACAAC-3' |
|               | Reverse | 5'-TCCATTGAGGTGGAGAGCTTTC-3'  |
| mVCAM-1       | Forward | 5'-CCCCAAGGATCCAGAGATTCA-3'   |
|               | Reverse | 5'-ACTTGACCGTGACCCGGCTT-3'    |
| mICAM-1       | Forward | 5'-ATCTCAGGCCGCAAGGG-3'       |
|               | Reverse | 5'-CGAAAGTCCGGAGGCTCC-3'      |
| m18S          | Forward | 5'-CGTTCCACCAACTAAGAACG-3'    |
|               | Reverse | 5'-CTCAACACGGGAAACCTCAC-3'    |

Figure 1.

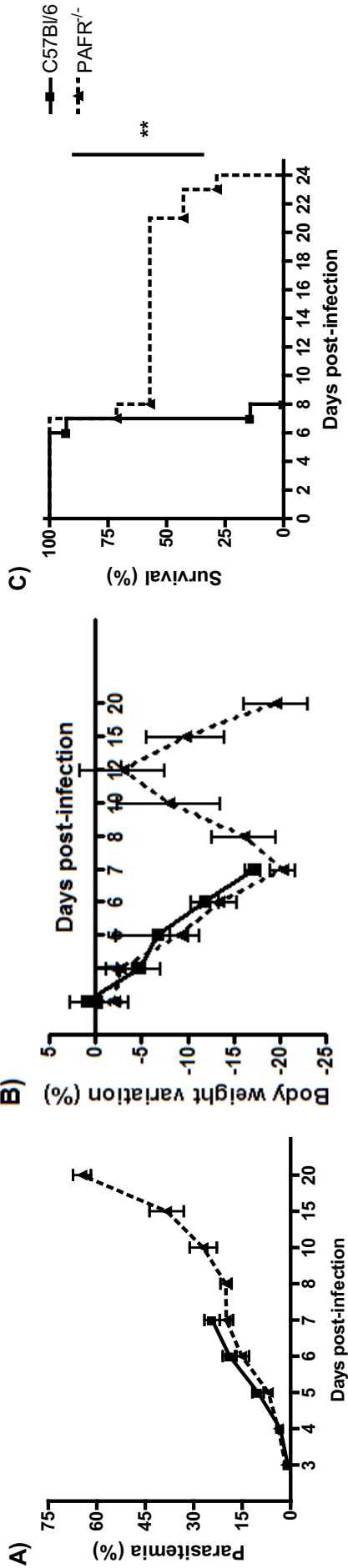


Figure 2.

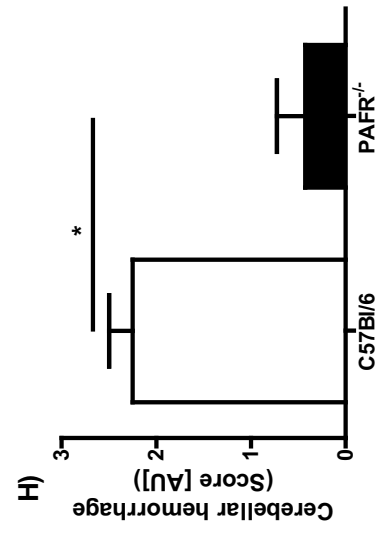
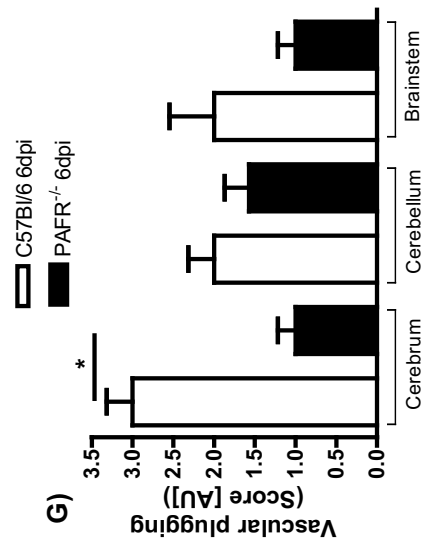
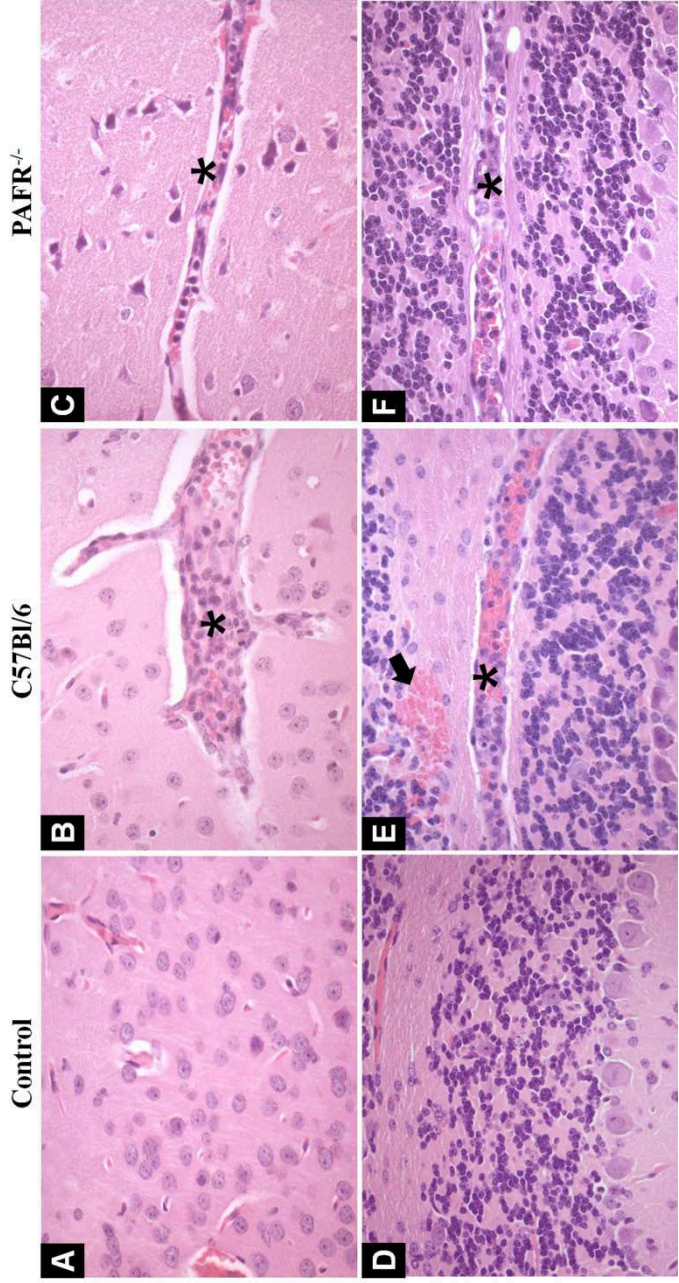




Figure 3.

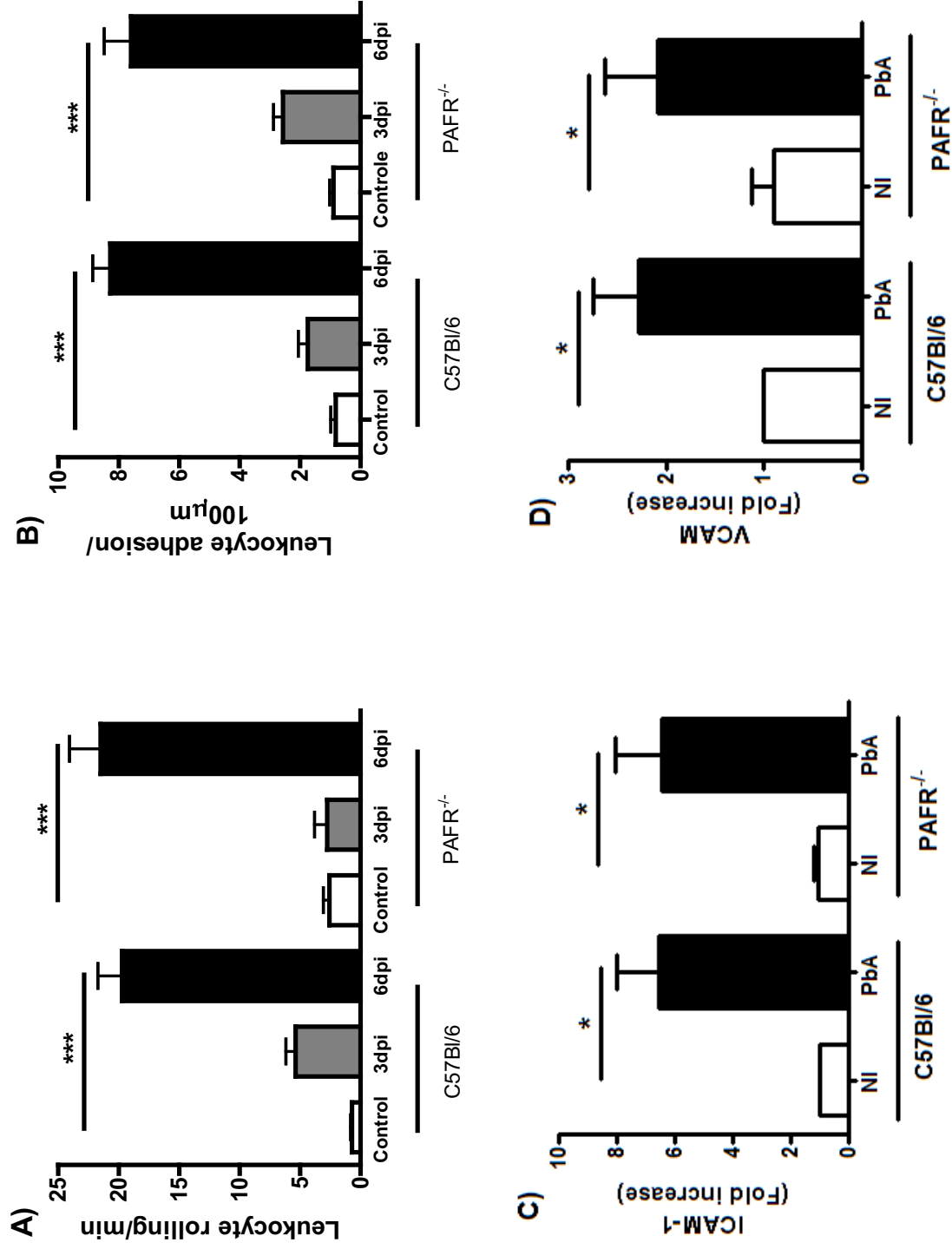


Figure 4.

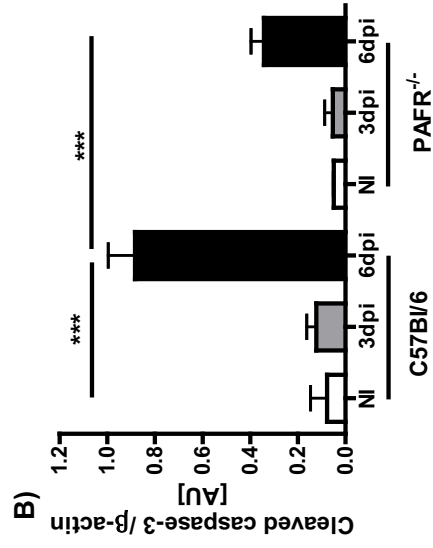
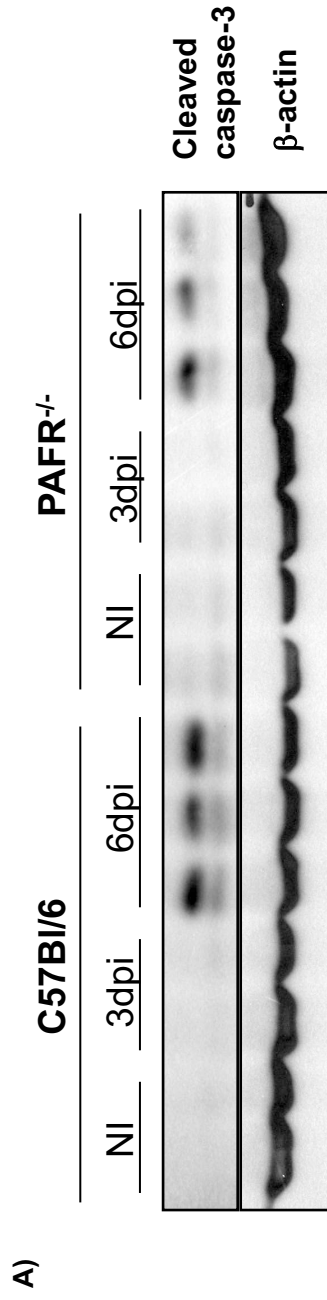


Figure 5.

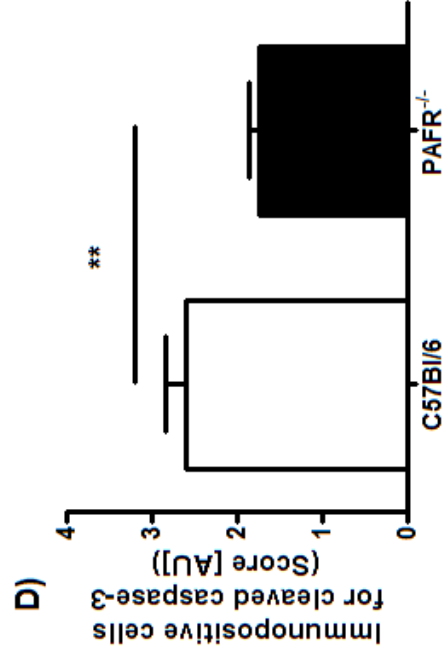
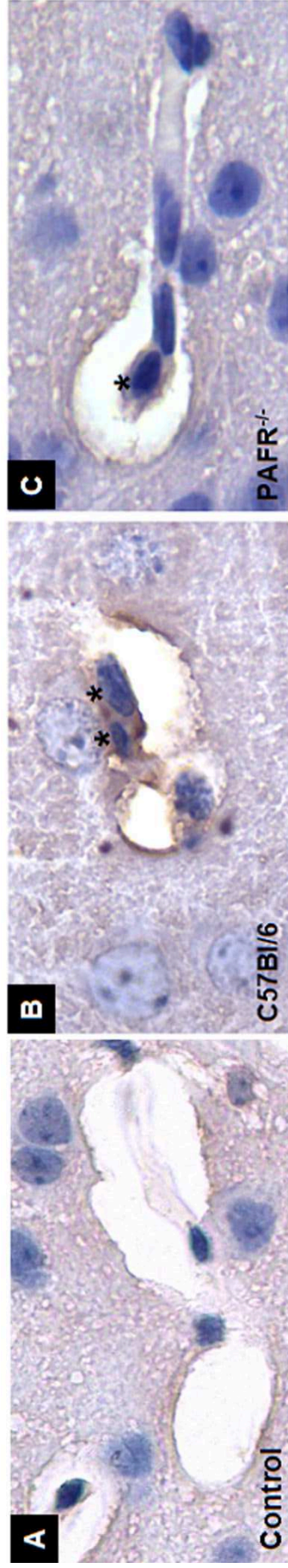


Figure 6.

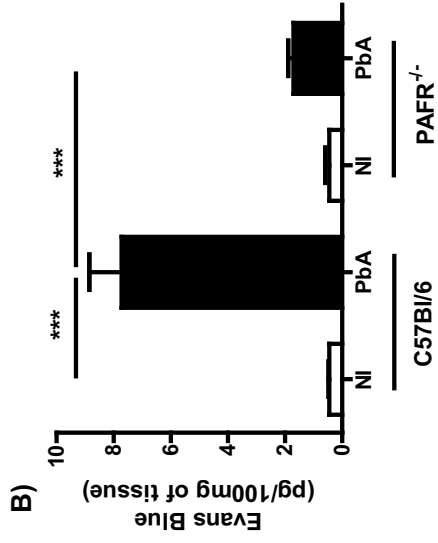


Figure 7.

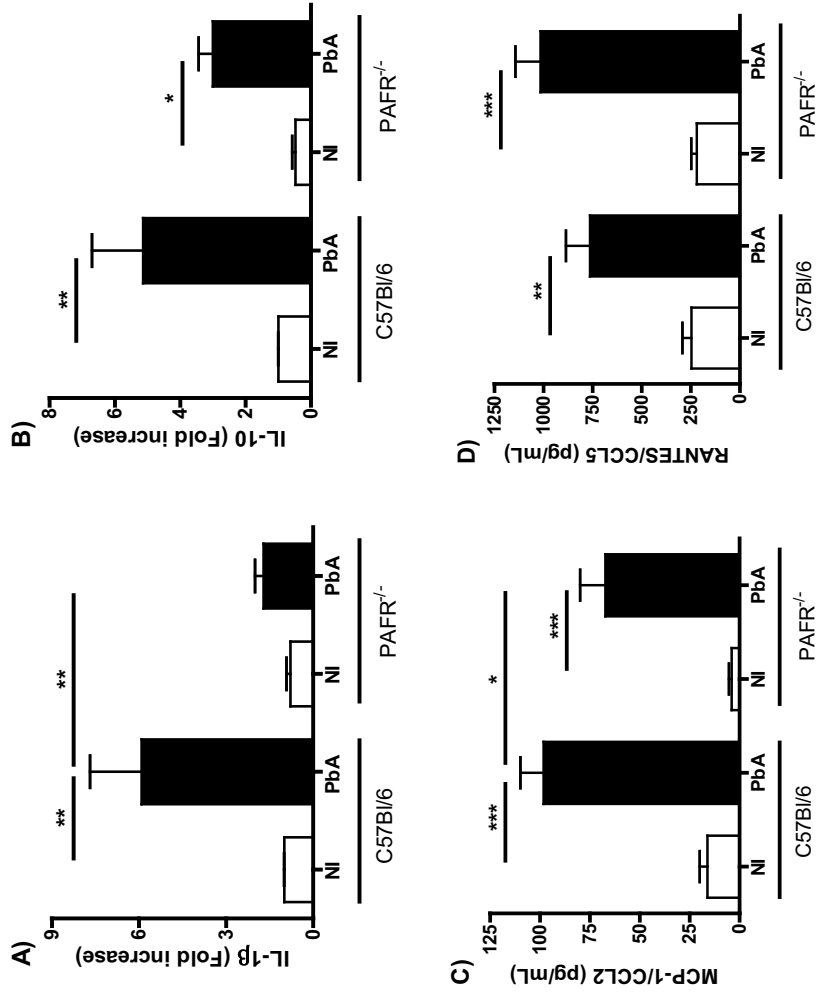


Figure 8.

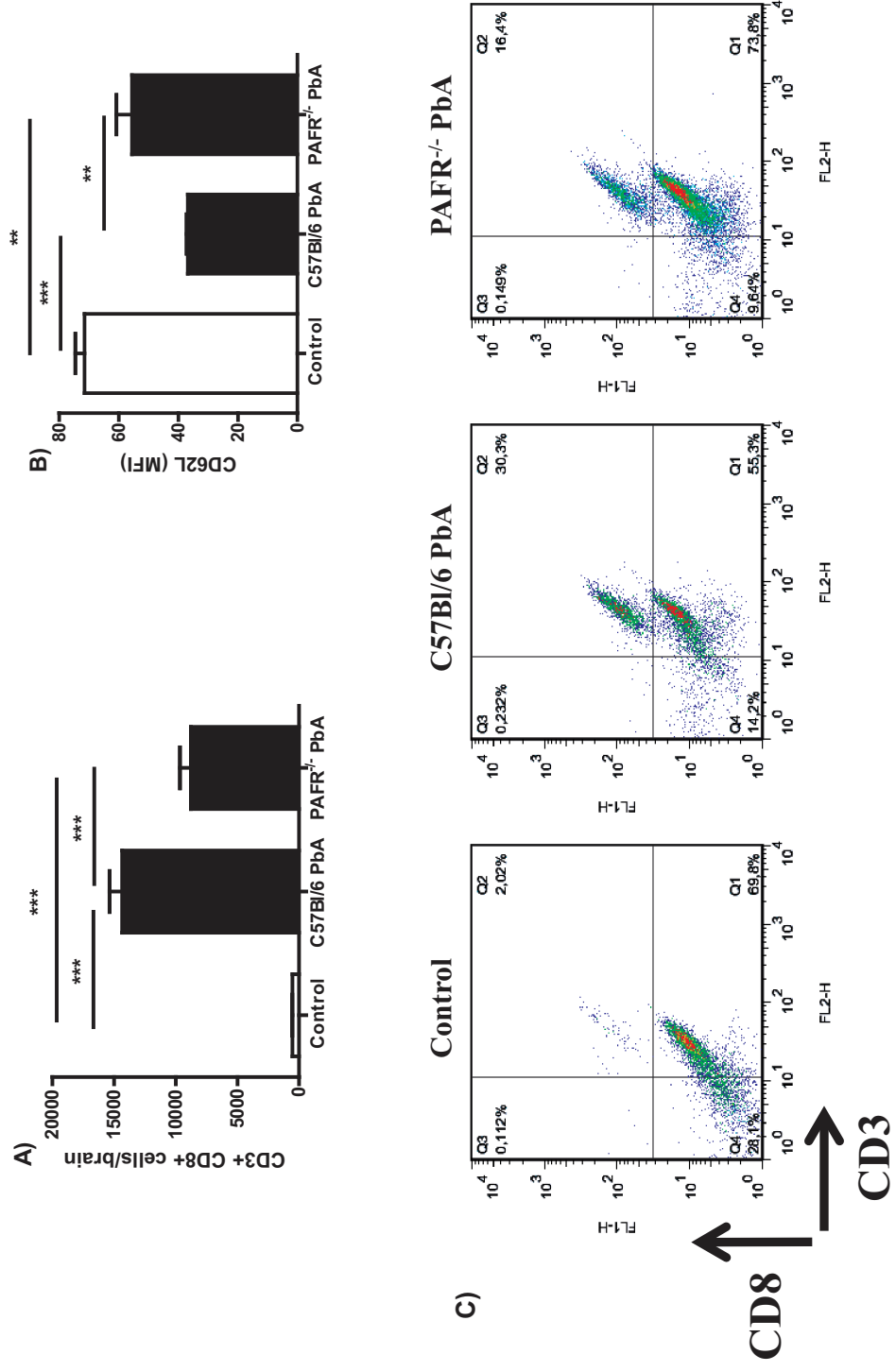


Figure 9.

