

NORINNE LACERDA QUEIROZ

**Avaliação da resposta inflamatória cerebral em camundongos BALB/c e C57Bl/6
infectados por *Plasmodium berghei* cepa NK65**

**Programa de Pós-Graduação em Parasitologia
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
Minas Gerais, Brasil
Maio/2007**

NORINNE LACERDA QUEIROZ

Avaliação da resposta inflamatória cerebral em camundongos BALB/c e C57Bl/6 infectados por *Plasmodium berghei* cepa NK65

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Protozoologia

Orientadora: Profa. Érika Martins Braga □ Departamento de Parasitologia

Co-orientadora: Profa. Juliana Carvalho Tavares □ Departamento de Fisiologia

**Programa de Pós-Graduação em Parasitologia
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
Minas Gerais, Brasil
Maio/2007**

043

Q3a **Queiroz, Norinne Lacerda .**

Avaliação da resposta inflamatória cerebral em camundongos BALB/c e C57Bl/6 infectados por Plasmodium berghei cepa NK65 [manuscrito] / Norinne Lacerda Queiroz. □2007.

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

Orientadora : Érika Martins Braga.

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

1. Malária Cerebral. 2. Plasmodium berghei □Teses. 3. Modelos animais em pesquisa □Teses. 4. Inflamação □Teses. 5. Quimiocinas □Teses. 6. Microscopia/Técnica □Teses. I. Braga, Érika Martins. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

□*Enfim, cada um o que quer aprova, o senhor sabe: pão ou pães, é questão de opiniões...*□

(Guimarães Rosa)

Dedico este trabalho ao meu querido avô Zacarias, que desconhecendo, tem sido tão importante na minha vida e minhas escolhas. Mesmo à distância você esteve constantemente presente neste mestrado.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, ICB/UFMG, pelos conhecimentos transmitidos e pela a oportunidade de realização desta Dissertação de Mestrado.

Agradecimentos

Agradeço imensamente aos meus pais, Antônio e Santa, alicerces da minha vida e exemplos de dedicação. Obrigada pelo amor e apoio incondicional, a confiança e o carinho.

Aos meus irmãos, que de formas tão diferentes me acompanham e contribuem na minha vida.

Ao Glauber pelas lições...

Ao Vladimir por acreditar e me incentivar...

A Noelle pela presença constante, mesmo a distância, e por todo carinho e cumplicidade.

A professora Érika Martins Braga pela orientação e pela oportunidade de trabalhar no laboratório de Malária.

A minha orientadora e amiga Juliana Carvalho Tavares, presente em toda esta caminhada. Sou eternamente grata a sua participação na minha vida acadêmica e pessoal. Agradeço o apoio e confiança.

A professora Cláudia Martins Carneiro, pela colaboração neste trabalho. Agradeço a disponibilidade, atenção e carinho.

Ao professor Antônio Lúcio Teixeira Jr, pela colaboração e disposição. Agradeço o interesse pelo trabalho e por me incentivar.

A amiga Márcia de Carvalho Vilela, meu braço direito em muitas ocasiões, com direito a ombro amigo...

A amiga Adriana Carvalho, que muito me ensinou durante o início da minha vida acadêmica e sempre esteve disponível para contribuir no meu trabalho.

Aos colegas de mestrado: Ana Terezinha, Érika, Erlisson, Juliana, Lara, Leonardo, Liliam, Natasha e Vladimir... Pelos momentos de aprendizado, tanto na sala de aula quanto fora dela (nos churrascos e almoços...). Foi muito bom compartilhar esta experiência com todos vocês.

Aos colegas do laboratório de Neuro-Imuno Fisiologia e Malária, em especial a técnica Márcia Campos, pelo suporte nos trabalhos.

Ao professor Mauro Martins Teixeira por disponibilizar a infra-estrutura do laboratório de Imunofarmacologia para parte de meus experimentos.

Aos alunos do laboratório de Imunofarmacologia, que muitas vezes me socorreram...

Ao Flávio Amaral que contribuiu no experimento de permeabilidade. Agradeço, em

especial, ao David Herinque que acompanhou parte dos experimentos, estando a disposição para ajudar e compartilhar.

As colegas de república, Cíntia e Kézia. Agradeço a experiência de dividir.

Aos amigos da minha Montes Claros: Dalila, Ângela, Thereza, Tiana, Virgínia, Hilla, Renato, Alessandro e Tiago, pelos anos de amizade e cumplicidade. Foi muito bom contar com todos mesmo à distância.

Aos amigos conquistados em Belo Horizonte, especialmente a Carol e a Leidi.

Aos meus familiares, especialmente meus avós (Antônia, Dja e Marcelino), minha querida bisavó Regina e meus tios e tias (Clício, Marly, José Geraldo e Darcy).

Aos professores do Departamento de Parasitologia pela transmissão de conhecimentos.

Ao professor Ricardo Wagner de Almeida Vitor que atenciosamente cumpriu o papel de relator desta dissertação.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Aos funcionários, especialmente a secretária Sumara, ao Seu Neri e a Rose, a quem eu guardo tanto carinho.

Enfim, aqueles que, de alguma forma, passaram pela minha vida e deixaram alguma contribuição.

Meu muito obrigada a todos!!!

Resumo

A malária é a doença parasitária mais grave da humanidade, sendo um problema de saúde pública em mais de 100 países. A malária cerebral (MC), causada pelo *Plasmodium falciparum*, é uma das formas de manifestação mais grave da malária humana e a principal causa de óbitos, apresentando mecanismos ainda desconhecidos. A patogênese da malária está associada a uma resposta imune inapropriada ou excessiva desenvolvida pelo hospedeiro para eliminar o parasito. Devido às dificuldades em acompanhar casos humanos e da limitada possibilidade de examinar os processos patológicos, modelos experimentais de MC foram desenvolvidos. Embora nenhum modelo reproduza totalmente a condição humana, o modelo experimental utilizando roedores é bem caracterizado e a grande diversidade de linhagens de camundongos, associada à infecção com diferentes espécies de *Plasmodium*, tem contribuído para elucidar aspectos envolvidos na patogênese da doença.

Assim, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar a resposta inflamatória cerebral envolvida na patogênese da malária experimental induzida por *Plasmodium berghei* cepa NK65 em camundongos jovens (seis semanas de idade) das linhagens BALB/c e C57Bl/6.

Camundongos BALB/c e C57Bl/6 foram infectados com inóculo padronizado de 10^6 hemácias parasitadas por injeção intraperitoneal. A parasitemia foi monitorada diariamente, a partir do terceiro dia pós-infecção (dpi), e apresentou uma evolução gradual, com diferença significativa entre as duas linhagens ao longo da infecção ($p < 0.01$). Sinais clínicos e sobrevivência dos animais foram avaliados durante doze dias, com expressiva perda de massa corporal nos animais infectados em relação aos animais controles, em ambas as linhagens. A mortalidade também apresentou um perfil diferente entre as linhagens de camundongos, estando concentrada nos dias seis e sete pós-infecção para C57Bl/6 e oitavo dia para BALB/c. Camundongos das duas linhagens foram submetidos à análise histopatológica para determinação da progressão das alterações morfológicas no cérebro. Animais C57Bl/6 apresentaram alterações teciduais precoces, porém discretas, já no terceiro dia pós-infecção. As alterações cerebrais, semelhantes às descritas na MC, tornaram-se mais evidentes ao longo do tempo e foram mais intensas em camundongos da linhagem C57Bl/6 em relação à linhagem BALB/c, o que justifica a morte precoce daquela linhagem. A interação leucócito-endotélio na microcirculação cerebral foi avaliada através de microscopia intravital nos vasos da pia-máter de animais infectados (5 dpi) e animais controle (não-infectados). Os animais

infectados apresentaram aumento do número de leucócitos em rolamento e aderidos na parede do endotélio em relação aos animais controle. A contagem total e diferencial de leucócitos (linfócitos, monócitos neutrófilos, eosinófilos e basófilos) presentes no sangue periférico dos animais exibiu um padrão alterado da população celular geral e/ou específica nos animais infectados em relação aos controles. A quantificação do extravasamento do corante azul de Evans para o parênquima cerebral sugeriu modificações na permeabilidade vascular da BHE, em decorrência da infecção. Utilizando o método de ELISA, verificamos que houve um aumento significativo das concentrações da citocinas TNF- α e IFN- γ , e das quimiocinas murinas MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 e MIG/CXCL9 em homogenato de cérebro e no soro dos animais infectados (5 dpi) quando comparado aos animais controle.

Este trabalho sugere que a infecção por *P. berghei* cepa NK65 em camundongos BALB/c e C57Bl/6 foi capaz de induzir manifestações clínicas e alterações morfológicas cerebrais, típicas da malária grave por *P. falciparum*, especialmente na linhagem C57Bl/6, o que pode representar um bom modelo para o estudo da MC.

Abstract

Malaria is the most important parasitic disease of the humankind, representing a public health problem in more 100 countries. Cerebral malaria (CM), caused by *Plasmodium falciparum*, is one of more serious manifestations of human malaria and the main cause of death by an as-yet unknown mechanism. The pathogenesis is associated with an inappropriate or excessive immune response by the host in response to the parasite. Due the difficulty to following human cases and the restriction to examine the pathologies, experimental models of CM have been developed. However, there is any model that repeats the human condition. The suitability of rodents experimental models is well characterized and the huge diversity of mouse strains associated with the infection by different species of *Plasmodium* have contributed to elucidated some features involved in the pathogenesis of the disease.

The aim of the present study was to evaluate the cerebral inflammatory response involved in the pathogenesis of experimental malaria induced by *Plasmodium berghei* NK65 in young BALB/c and C57Bl/6 mice (six weeks).

BALB/c and C57Bl/6 mice were infected with standard inoculums of 10^6 parasitized erythrocytes by intraperitoneal injection. The parasitemia was monitored daily, until the third day post-infection (dpi), and presented a gradual evolution, with significant differences between strains ($p < 0.01$). Clinical signals and survival of the animals were evaluated over twelve days, and exhibited a significant loss of weight in infected mice compared to controls, in both strains. Mortality was also different between the strains of mice, occurring during six - seven days post-infection for C57Bl/6 and on the eighth day for BALB/c. Brain samples from C57Bl/6 and BALB/c mice were evaluated by histopathological techniques in order to determinate progress of the morphological changes. C57Bl/6 mice showed early tissues alterations, however mild brain alterations were observed on the third day post-infection, as described for human CM. The cerebral alterations, as in human CM, became more evident over time and were more intense in C57Bl/6 mice compared to BALB/c, explaining the early death. Leukocyte-endothelium interactions in the cerebral microcirculation were evaluated by intravital microscopy in the pial matter vessels in infected animals (5 dpi) and control animals (non-infected). The infected animals showed an increase in the number of leukocyte rolling and adhesion on the vessel wall in comparison to control animals. The total and differential number of leukocytes (lymphocytes, monocytes, neutrophils,

eosinophils and basophils) in the peripheral blood showed a different profile of the global and/or specific cellular population in infected animals, when compared to controls. The evaluation of Evans blue leakage to cerebral parenchyma suggests changes in vascular permeability of blood-brain barrier (BBB), as consequence of the infection. Using ELISA methods, we noted a significant increase in TNF- α and IFN- γ cytokines concentrations, as well as in MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 and MIG/CXCL9 levels, in brain and serum of infected animals (5 dpi) in comparison to controls animals.

This work showed that young mice BALB/c and C57Bl/6 infected by *P. berghei* strain NK65 were able to induce clinical manifestations and cerebral morphological alterations typical of severe malaria by *P. falciparum*. Finally, experimental malaria model induced by *P. berghei* NK65 may represent a good model to study the pathogenesis of CM.

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas	1
Lista de Gráficos	3
Lista de Figuras, Quadros e Tabelas	4
1 - INTRODUÇÃO	5
1.1 - A SITUAÇÃO DA MALÁRIA NO MUNDO	6
1.2 - A DOENÇA	6
1.3 - MALÁRIA CEREBRAL HUMANA	10
1.4 - MODELOS EXPERIMENTAIS DE MALÁRIA CEREBRAL	12
1.5 □INTERAÇÕES PARASITO-HOSPEDEIRO	14
1.6 □CARACTERÍSTICAS DO <i>PLASMODIUM BERGHEI</i>	15
1.7 - MEDIADORES INFLAMATÓRIOS	16
1.8 - RECRUTAMENTO CELULAR	17
1.9 - QUIMIOCINAS	18
2 - JUSTIFICATIVA	22
3 - OBJETIVOS	25
3.1 - OBJETIVO GERAL	26
3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4 - MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 - ANIMAIS	28
4.2 - PARASITO E INFECÇÃO DOS ANIMAIS	28
4.3 - DETERMINAÇÃO DA PARASITEMIA	28
4.4 - HISTOLOGIA	29
4.4.1 - Fixação do tecido e recorte dos órgãos	29
4.4.2 - Desidratação, diafanização e inclusão em parafina	30
4.4.3 - Microtomia	30
4.4.4 - Coloração	30
4.4.4.1 - Hematoxilina-Eosina	30
4.4.4.2 □Cresil Violeta	31
4.4.5 - Análise Histopatológica	31
4.5 - MICROSCOPIA INTRAVITAL	32
4.6 □CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS	33
4.7 - AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE VASCULAR	34
4.8 - MEDIDA DOS NÍVEIS DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS NO SORO E CÉREBRO POR ELISA	35
4.8.1 - Preparo de homogenato de cérebro de camundongo	35
4.8.2 - Obtenção de soro de camundongos	35
4.8.3 - Determinação de citocinas por ELISA	35
4.9 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5 - RESULTADOS	38
5.1 - EVOLUÇÃO DA PARASITEMIA	39
5.2 - MORTALIDADE	42
5.3 - SINAIS CLÍNICOS	42
5.4 - HISTOLOGIA	45
5.5 - INTERAÇÃO LEUCÓCITO-ENDOTÉLIO	50
5.6 □CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS	53
5.7 - AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE VASCULAR	56
5.8 - DOSAGEM DAS CITOCINAS TNF- α E IFN- γ E DAS QUIMIOCINAS KC/CXCL8, MIG/CXCL9, MIP-1 α /CCL3, MCP-1/CCL2 E RANTES/CCL5	58
6 - DISCUSSÃO	62
7 - CONCLUSÕES	75

<i>8. PERSPECTIVAS</i>	78
<i>9 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	80

Lista de Abreviaturas e Siglas

- ANOVA □ Análise de variância
- BHE □ barreira hematoencefálica
- BSA □ Albumina de soro bovino
- CEBIO □ Centro de Bioterismo
- CETEA □ Comitê de Ética em Experimentação Animal
- CCL2/MCP-1 □ proteína quimioatraente de macrófagos e monócitos (monocyte-chemotactic protein-1)
- CCL3/MIP-1 α □ proteína quimioatraente de macrófagos, monócitos e linfócitos T CD8+ (macrophage-inflammatory protein-1 alpha)
- CCL5/RANTES □ proteína quimioatraente de linfócitos T ativados e eosinófilos (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted)
- CXCL8/Kc □ proteína quimioatraente de neutrófilos
- CXCL9/MIG □ monocina induzida por IFN- γ (monokine induced by IFN- γ)
- CCR □ receptor de quimiocina tipo CC
- CSF □ fluido cerebroespinal (cerebrospinal fluid)
- CXCR □ receptor de quimiocina tipo CXC
- dpi □ dias pós-infecção (days post-infection)
- ELISA □ Ensaio imuno-sorvente por enzima ligada (Enzyme-linked immunosorbent assay)
- EPM □ erro padrão da média
- GAG □ glicosaminoglicanos
- HE □ coloração Hematoxilina-Eosina
- ICAM □ Molécula de adesão intercelular (Intercellular adhesion molecule)
- IFN- γ □ Interferon gamma
- Ig - imunoglobulina
- IL □ interleucina
- i.p. □ intraperitoneal
- i.v. □ intravenoso
- Kg □ kilograma
- LPS □ lipopolissacarídeo
- MC □ malária cerebral
- MCE □ malária cerebral experimental

MHC □ Complexo principal de histocompatibilidade (Major Histocompatibility Complex)

μL □ microlitro

NO □ óxido nítrico

NK □ célula Natural Killer

nm □ nanômetro

OMS □ Organização Mundial de Saúde

PBS □ salina tampão fosfato (Phosphate buffered saline)

PfEMP1 □ proteína 1 de membrana do eritrócito do *P. falciparum*

r.p.m. □ rotações por minuto

SNC □ Sistema Nervoso Central

TNF- α □ fator de necrose tumoral alfa

Lista de Gráficos

Gráfico 1 □ Média das parasitemias diárias de camundongos BALB/c e C57Bl/6 jovens, a partir do terceiro dia pós-infecção.....	40
Gráfico 2 □ Curva de sobrevivência de camundongos BALB/c e C57Bl/6 jovens.....	43
Gráfico 3 □ Determinação da variação da massa corporal (%) de animais BALB/c e C57Bl/6 jovens.	44
Gráfico 4 □ Número de leucócitos em processo de rolamento e de adesão na microvasculatura da pia-máter de camundongos BALB/c e C57Bl/6 jovens.	52
Gráfico 5 □ Número total de leucócitos no sangue periférico de camundongos BALB/c e C57Bl/6 jovens.....	53
Gráfico 6 □ Níveis de azul de Evans extravasado para o parênquima cerebral em camundongos BALB/c e C57Bl/6 jovens.....	56
Gráfico 7 □ Níveis da concentração da citocina TNF- α em sobrenadante de homogenato de cérebro e em soro de camundongos BALB/c e C57Bl/6 jovens.....	59
Gráfico 8 □ Níveis da concentração da citocina IFN- γ e das quimiocinas Kc/CXCL8, MIG/CXCL9, MIP-1 α /CCL3, MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5 em sobrenadante de homogenato de cérebro de camundongos BALB/c e C57Bl/6 jovens.....	60

Lista de Figuras, Quadros e Tabelas

Figura 1 - Ciclo do <i>Plasmodium</i>	8
Figura 2 - Mecanismo de recrutamento de leucócitos	17
Figura 3 - Interações das moléculas de quimiocinas com os diferentes receptores..	21
Figura 4 - Foto do sistema de microscopia intravital.	32
Figura 5 - Fotomicrografias de esfregaços sangüíneos corados com Giemsa.....	40
Figura 6 - Fotomicrografias do córtex cerebral de camundongos BALB/c e C57Bl/6 não-infectados.....	45
Figura 7 - Fotomicrografias do córtex cerebral de camundongos C57Bl/6 infectados, eutanaziados no terceiro dia de infecção.....	46
Figura 8 - Fotomicrografias do córtex-cerebral de camundongos infectados, eutanaziados no sexto dia de infecção.....	47
Figura 9 - Fotomicrografias do córtex-cerebral de camundongos BALB/c infectados, eutanaziados no nono dia de infecção.....	48
Figura 10 □Micrografia de videomicroscopia intravital.....	50
Quadro 1 □Infecção por <i>Plasmodium</i> em diferentes linhagens de camundongos.....	13
Tabela 1 - Número percentual dos tipos celulares presentes no sangue periférico de camundongos BALB/c e C57Bl/6 jovens.....	54
Tabela 2 □Quantificação diferencial dos tipos celulares presentes no sangue periférico de camundongos BALB/c e C57Bl/6 jovens (x 10 ⁶ células/mL).....	54

1 - Introdução

1.1 - A situação da malária no mundo

A malária é a doença parasitária mais grave da humanidade, considerada uma doença negligenciada que permanece como grave problema de saúde pública, apesar dos esforços dispensados para seu controle. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2006), em torno de 3,2 bilhões de pessoas vivem em áreas de transmissão da doença, compreendendo 107 países e territórios. Apresenta incidência anual de 350-500 milhões de casos, que resultam na morte de 1,5-2 milhões de pessoas. Os países da África Tropical respondem por mais de 90% dos casos clínicos de malária no mundo e pela maioria dos casos letais, sendo as crianças as principais vítimas. A prevalência restante está distribuída entre o Sudeste Asiático, Oceania e América Latina.

Na América Latina, o maior número de casos (99%) é verificado na Amazônia brasileira (incluindo os Estados do Amazonas, Pará, Acre, Roraima, Rondônia, Amapá, Mato Grosso, Tocantins e Maranhão), com uma incidência anual de 400-700 mil casos. Além disso, o grande fluxo migratório da região Amazônica para outros estados brasileiros tem levado ao surgimento de surtos de malária em áreas consideradas livres de transmissão da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 2005).

Apesar das campanhas mundiais de erradicação da malária iniciadas na década de 1960 e das intensas ações de controle atuais, a doença permanece afligindo as populações mais carentes. O desenvolvimento de resistência às drogas antimaláricas usuais, muitas vezes utilizadas indiscriminadamente, a dificuldade do controle eficiente do mosquito vetor, em decorrência das mudanças nos parâmetros ecológicos e ambientais, e o crescimento econômico limitado de muitos países têm justificado a incapacidade dos países em desenvolvimento, da faixa tropical, no controle da malária. Em adição, a doença contribui, significativamente, para a permanente estagnação econômica destes países (GOOD *et al.*, 2005).

1.2 - A doença

A malária é uma doença causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*, parasito descoberto em 1880, por Laveran. São parasitos intracelulares obrigatórios que apresentam dois hospedeiros, um vertebrado e outro invertebrado (GARNHAN, 1966). Exibe notável complexidade biológica, com formas evolutivas apresentando diferentes características antigênicas e variado potencial patogênico, somado ao desenvolvimento

de vários mecanismos de escape do parasito à ação do sistema imunológico (GOOD *et al.*, 2005). É naturalmente transmitido ao hospedeiro vertebrado através da picada da fêmea do mosquito *Anopheles* infectado, considerado o único vetor nos casos humanos. O principal vetor no Brasil, *Anopheles darlingi*, apresenta hábitos antropofílicos com atividade cíclica contínua durante toda a noite, com pico nos crepúsculos matutino e noturno (TADEI & THATCHER, 2000).

Durante o repasto sangüíneo, o mosquito vetor inocula esporozoítos na derme do hospedeiro, que inicia um processo de migração para o fígado. Esta forma infectante apresenta um comportamento de migração complexo e singular, muito estudado através de microscopia de epifluorescência associado à expressão de uma proteína fluorescente pelo parasito (NATARAJAN *et al.*, 2001; FRANKE-FAYARD *et al.*, 2004). Os esporozoítos apresentam na derme seu movimento, denominado *gliding*, de forma tortuosa e intensa. Esta motilidade exibida na derme difere do perfil manifestado *in vitro*, que ocorre em uma velocidade constante e de forma circular. Para abandonar o sítio de inoculação, os esporozoítos, como esperado, são capazes de invadir vasos sangüíneos através de uma interação direta com a parede do vaso. Adicionalmente, foi demonstrado que são capazes de invadir vasos linfáticos. A presença de esporozoítos no interior de vasos linfáticos foi confirmada por microscopia confocal após a injeção intradermal com formas marcadas. Esporozoítos drenados para vasos linfáticos podem eventualmente alcançar a corrente sangüínea e, posteriormente, o fígado, onde podem invadir as únicas células as quais podem desenvolver *in vivo*, isto é, os hepatócitos (AMINO *et al.*, 2006).

No interior dos hepatócitos, os esporozoítos iniciam um processo de esquizogonia tecidual e diferenciam em uma nova forma invasiva, denominada merozoíto hepático, capaz de invadir eritrócitos. Para ganhar a corrente circulatória, e assim ter acesso aos eritrócitos, os merozoítos liberados pela esquizogonia tecidual necessitam alcançar o lúmen do sinusóide hepático através do espaço de Disse, uma camada de matriz extracelular e o endotélio sinusóide. Desta forma, os merozoítos hepáticos precisam ganhar a corrente sangüínea de modo a evitar a fagocitose por macrófagos residentes, as células de Kupffer, presentes em grande número nos sinusóides hepáticos. Recentemente, foi descrita a formação de vesículas, denominadas merosomos, contendo merozoítos hepáticos maduros e infectantes, que se destacam de hepatócitos. Merosomos de vários tamanhos são formados e liberados após o destaque da célula do hospedeiro. Este processo garante uma liberação segura dos merozoítos para a circulação, evitando a destruição pelas células fagocíticas presentes nos capilares

sinusóides hepáticos (STURM *et al.*, 2006). Desta forma, os merozoítos que chegam à circulação são capazes de invadir eritrócitos, iniciando a fase eritrocítica da infecção (Figura 1).

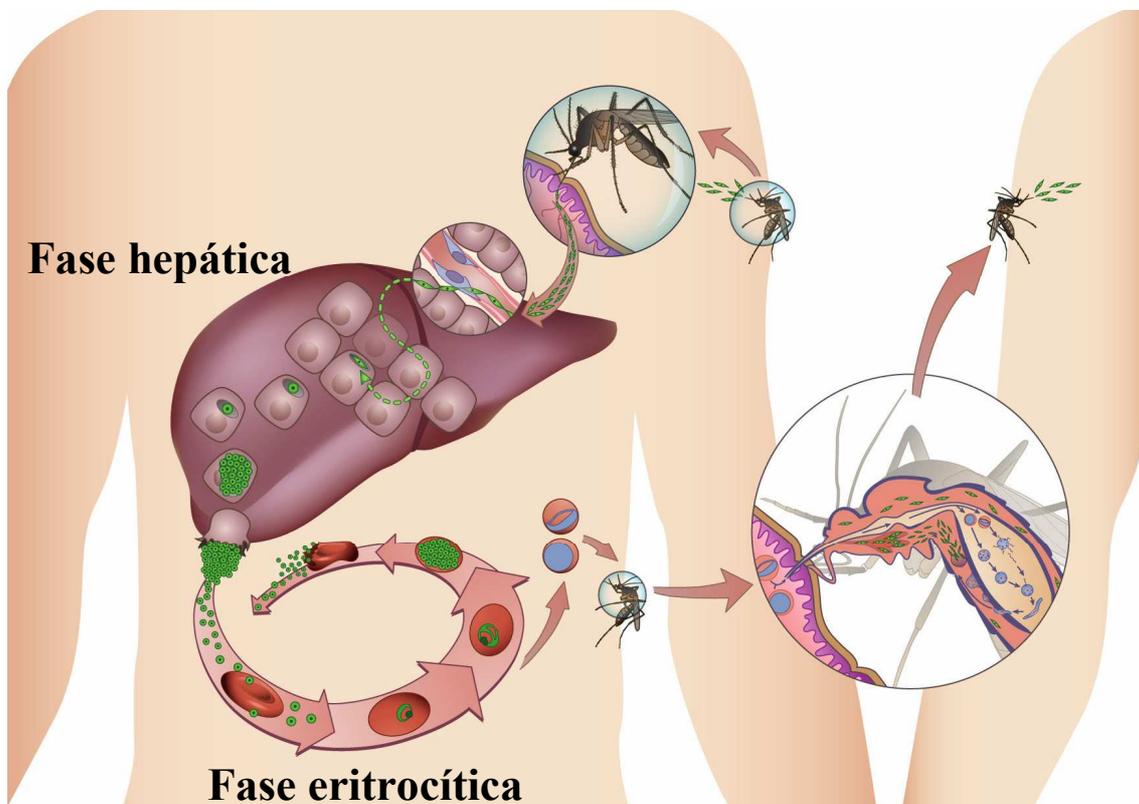


Figura 1- Ciclo do *Plasmodium*. Retirado de www.imm.ul.pt.

Os sintomas clínicos da malária são, primariamente, decorrentes da ruptura de eritrócitos parasitados, já que nesta etapa ocorre a liberação na circulação sangüínea de antígenos constituintes do parasito e os formados em consequência de seu metabolismo, que causam uma intensa ativação do sistema imune (DE SOUZA & RILEY, 2002). Adicionalmente, o parasito altera dramaticamente a fisiologia e processos bioquímicos dos eritrócitos, com alterações na permeabilidade da membrana do eritrócito infectado e aumento do consumo de glicose (KIRK, 2001). Vale ressaltar que a proporção significativa do ciclo de vida do *Plasmodium* ocorre dentro dos eritrócitos e, como estes não são contidos em um sítio tecidual específico, mecanismos imunes contra o parasito podem afetar vários órgãos (GOOD *et al.*, 2005). O baço exerce um papel crucial na eliminação do parasito da circulação e proporciona uma forte resposta hematopoiética

durante a infecção (ALVES *et al.*, 1996). Outra manifestação clínica observada em indivíduos infectados é o quadro de anemia, que pode ser decorrente de um somatório de eventos responsáveis pelo seu desenvolvimento, entre eles o processo de destruição de eritrócitos durante a liberação do parasito, o aumento da eritrofagocitose esplênica e a deficiência do mecanismo de eritropoiese (CHANG & STEVENSON, 2004).

Dezenas de espécies de *Plasmodium* são capazes de infectar uma ampla faixa de espécies animais, como répteis, aves e mamíferos. Quatro espécies de *Plasmodium* são descritas como agentes causadores da doença em humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*, sendo a primeira mais virulenta e a principal causadora de morte. Nas infecções por *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, predomina a forma não complicada da doença, caracterizada por febre intermitente, sudorese, mal estar, vômitos e intensa debilidade física. As infecções por *P. falciparum* podem levar a forma complicada, denominada malária grave, considerada uma doença multissistêmica capaz de causar malária cerebral (MC), anemia grave, insuficiência renal aguda, edema pulmonar, hipoglicemia, colapso circulatório e acidose metabólica. Entretanto, é importante ressaltar que o curso clínico da doença depende de fatores associados tanto ao parasito quanto ao hospedeiro, além de questões geográficas e sociais (MILLER *et al.*, 2002).

O grande número de óbitos se concentra em crianças africanas, especialmente aquelas que vivem em áreas rurais remotas, com difícil acesso aos serviços de saúde. As manifestações que predominam nesta faixa etária são, principalmente, a anemia grave e a MC, freqüentemente associadas à hipoglicemia (MARSH *et al.*, 1996). Quando o diagnóstico da malária ocorre precocemente e o tratamento é instituído de forma correta, a doença costuma ter curso benigno e evoluir sem complicações. Entretanto, o tratamento retardado ou inadequado aumenta a tendência para evolução desfavorável da doença.

Sabe-se que o desenvolvimento de complicações na malária está diretamente relacionado à resposta imune do hospedeiro. Habitantes de áreas de intensa transmissão da doença, como em algumas regiões da África, após vários anos de exposição desenvolvem certo tipo de imunidade protetora contra as manifestações clínico-patológicas da malária, embora não estejam protegidos da presença do parasito na circulação ou da reinfeção (GOOD *et al.*, 2005).

1.3 - Malária cerebral humana

A MC humana é a manifestação mais grave e principal causa de óbitos em crianças jovens (menores de cinco anos) e primíparas vivendo em área endêmica, formando os principais grupos de risco (MARSH *et al.*, 1996). Esta síndrome apresenta uma patogênese complexa, sendo definida como um estado de coma, com exclusão de outras encefalopatias, associado às manifestações neurológicas resultantes do dano endotelial e seqüestro de eritrócitos parasitados na microcirculação cerebral. Alterações morfológicas, como ativação da micrógliia, redistribuição de astrócitos, modificações na barreira hematoencefálica (BHE) e dano neuronal, já foram identificadas nos portadores da MC. Entretanto, o perfil da patologia não é uniforme entre os pacientes (TURNER, 1997). O curso desta síndrome não é obrigatoriamente letal, porém, os sobreviventes desta manifestação podem desenvolver danos neurológicos permanentes (MEDANA *et al.*, 2002).

O seqüestro de eritrócitos é um mecanismo complexo que envolve interações entre antígenos polimórficos localizados na superfície de eritrócitos infectados com estágios maduros assexuados e receptores expressados nas células endoteliais do hospedeiro. Este mecanismo é importante para a sobrevivência do parasito, evitando sua destruição no baço, não obstante pode ter grave conseqüência para o hospedeiro (BERENDT *et al.*, 1990).

O parasito se desenvolve no interior de eritrócitos, células que não expressam moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Entretanto, os eritrócitos parasitados com estágios maduros expõem, na sua superfície, antígenos produzidos pelo parasito (GOOD *et al.*, 2005). A proteína 1 de membrana do eritrócito do *P. falciparum* (PfEMP1) é a molécula de maior destaque, sendo codificada por uma larga e diversa família de genes que está envolvida na variação antigênica clonal e tem um papel central na patogênese. Os múltiplos domínios localizados na região extracelular da PfEMP1 podem simultaneamente reconhecer vários receptores expressados pelo hospedeiro. Diversos receptores do hospedeiro, incluindo CD36, molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), sulfato de condroitina A (CSA), molécula de adesão celular plaquetária/endotelial-1 (PECAM-1/CD31), molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), trombospondina e E-seletina, têm sido identificados nas células endoteliais como potentes mediadores para a citoaderência de eritrócitos infectados (revisado por SHERMAN *et al.*, 2003). A molécula ICAM-1 parece ser o

principal ligante envolvido no seqüestro nos capilares cerebrais. Um aumento da expressão deste receptor no endotélio cerebral resulta em citoaderência, cujos danos são responsáveis pelas complicações da MC (MILLER *et al.*, 2002). Além de apresentarem um papel importante no mecanismo de interação eritrócito-endotélio, estudos em modelos experimentais de malária grave têm demonstrado que as moléculas de adesão também podem estar envolvidas nas interações leucócito-endotélio (GRAU & KOSSODO, 1994; SUN *et al.*, 2003) e plaquetas-endotélio (CHANG *et al.*, 2003; GRAU *et al.*, 2003).

Existem duas grandes teorias para explicar a patogênese da MC humana. A teoria da obstrução mecânica, proposta por Marchiafava e Bignami há mais de cem anos e confirmada por numerosos estudos posteriores, sugere que a MC é uma consequência direta do seqüestro de eritrócitos, que acarreta na obstrução do fluxo cerebral e hipóxia cerebral (BERENDT *et al.*, 1994). Por outro lado, a teoria da inflamação sugere que a MC é resultado de uma resposta imune exacerbada, na qual citocinas tipo Th1, especialmente TNF- α e IFN- γ , apresentam um papel central no processo (CLARK & ROCKETT, 1994). O mérito relativo destas duas teorias tem sido extensivamente debatido, com um consenso em considerar uma hipótese conciliatória (VAN DER HEYDE *et al.*, 2006).

Estudos recentes têm demonstrado o envolvimento de micropartículas como um elemento chave na patogênese da MC. Estas estruturas são produzidas através de remodelamento da membrana de diversos tipos celulares, especialmente plaquetas e leucócitos, tanto de forma constitutiva quanto induzida, durante uma condição inflamatória. A produção de citocinas, como TNF- α , induz a vesiculação e liberação contínua destas micropartículas, que mantém um ambiente inflamatório favorável ao agravamento da lesão endotelial, através de propriedades pró-coagulantes e pró-inflamatórias destes elementos (COLTEL *et al.*, 2006).

Vários estudos demonstram que a secreção de citocinas é um evento importante no desenvolvimento da MC humana (BROWN *et al.*, 1999). Porém, a análise da resposta imune em humanos muitas vezes é confinada ao estudo de células e moléculas do sangue periférico (LAMB *et al.*, 2006). Uma vez que os mecanismos envolvidos na patogênese da MC humana são complexos, seu entendimento permanece com lacunas ainda não elucidadas (HUNT *et al.*, 2006).

1.4 - Modelos experimentais de Malária Cerebral

Devido às dificuldades em acompanhar casos de MC humana e da limitada possibilidade de examinar os processos patológicos, alguns modelos experimentais de MC foram desenvolvidos. O modelo experimental utilizando roedores é bem caracterizado e útil para a pesquisa científica. Modelos murinos (Quadro 1) oferecem a oportunidade de desvendar mecanismos imunológicos que podem estar envolvidos na doença, uma vez que há similaridades entre a resposta imune e características patológicas da infecção em humanos e camundongos (LAMB *et al.*, 2006).

A grande diversidade de linhagens de camundongos associada à infecção com diferentes espécies de *Plasmodium* tem contribuído para elucidar alguns aspectos envolvidos na patogênese da doença (DE SOUZA & RILEY, 2002).

Entretanto, a maioria dos estudos provém do modelo de infecção por *P. berghei* ANKA, que apresenta uma divisão segura entre linhagens de camundongos resistentes (BALB/c e A/J) e susceptíveis (C57Bl/6 e CBA). Estudos demonstraram que camundongos geneticamente susceptíveis e infectados com a cepa ANKA podem apresentar angústia respiratória com acidose láctica, anemia e nefrite, indicando que os mesmos podem desenvolver manifestações clínicas semelhantes à malária por *P. falciparum* (VAN DER HEYDE *et al.*, 2001). Estas linhagens também desenvolvem sinais neurológicos e sintomas típicos da MC (coma, paralisia e convulsão), assim como alterações morfológicas cerebrais, como ativação de células endoteliais e micróglia, identificadas em portadores desta manifestação (MEDANA *et al.*, 1997a). Em contrapartida, as linhagens resistentes exibem uma resposta diferencial ao parasito, não desenvolvem MC e morrem, aproximadamente, 20 dias após a infecção devido à anemia grave e hiperparasitemia (KOSSODO & GRAU, 1993).

Estudos em camundongos BALB/c infectados com *P. berghei* ANKA demonstraram que estes não desenvolvem nenhuma lesão cerebral (GRAU *et al.*, 1987). Entretanto, pouco se sabe sobre a infecção utilizando a cepa NK65 de *P. berghei*. Este é um aspecto importante a ser considerado, uma vez que tem sido amplamente estudado na malária humana e experimental o envolvimento do polimorfismo de cepas do parasito na determinação da resposta imunológica e da patogênese da infecção (HEY, 1999).

Parasito	Cepa	Linhagem do camundongo	Letalidade	Uso experimental
<i>P. chabaudi chabaudi</i>		CBA C57Bl/6 BALB/c	Não letal	Mecanismo imune Sinais clínicos associados à malária e seqüestro
	AS	129sv A/J DBA/2	Letal	Patogênese Quimioterapia Resistência e susceptibilidade Mecanismo imune
	CB	CBA C57Bl/6 C57Bl/6 BALB/c	Não letal	Mecanismo imune
<i>P. chabaudi adami</i>		CBA C57Bl/6 BALB/c	Não letal	Mecanismo imune
<i>P. berghei</i>	ANKA	C57Bl/6 BALB/c CBA	Letal	Patogênese Malária cerebral experimental (MCE) Seqüestro
	K173	C57Bl/6 BALB/c CBA DBA	Letal	Controle para MCE e patogênese
<i>P. yoelii</i>	17XL	C57Bl/6 BALB/c CBA DBA Swiss	Letal	Mecanismo imune Patogênese Seqüestro Malária cerebral experimental (MCE)
	YM	C57Bl/6 BALB/c CBA DBA	Letal	Vacina Patogênese Hipoglicemia Resposta imune Vacinação
	17XNL	C57Bl/6 BALB/c CBA DBA	Não letal	
<i>P. vinckei vinckei</i>		BALB/c	Letal	Sinais clínicos associados a malária e seqüestro Patogênese Quimioterapia
<i>P. vinckei petteri</i>	CR	C57Bl/6 BALB/c	Não letal	Mecanismos imunes

Quadro 1. Infecção por *Plasmodium* em diferentes linhagens de camundongos.
Extraído de Li *et al.*, 2001.

Entretanto, é importante ser cauteloso quando se relaciona o modelo animal à doença humana. A extrapolação dos resultados obtidos no modelo murino de MC deve ser realizada com cuidado, pois estes apresentam diferenças significativas. No modelo murino, o leucócito é o tipo celular predominantemente seqüestrado na microcirculação cerebral de camundongos, e não os eritrócitos, como na MC humana (ADAMS *et al.*, 2000; NEILL & HUNT, 1992). Desta forma, muitos autores consideram que não existem modelos para a MC. Entretanto, a presença de monócitos no endotélio cerebral já foi comprovada, pelo menos, na MC pediátrica (GRAU & KOSSODO, 1994).

Uma vantagem do modelo experimental murino é a disponibilidade de diferentes ferramentas genéticas (animais *knockout*) e moleculares que facilitam a compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese. Desta forma, modelos de malária experimental podem providenciar informações valiosas sobre os mecanismos básicos envolvidos no desenvolvimento da doença (HUNT & GRAU, 2003).

1.5 □ Interações parasito-hospedeiro

As interações resultantes das características genéticas do parasito e do hospedeiro estão associadas à virulência da infecção, sendo esta definida como a severidade com que um agente infeccioso provoca lesões no hospedeiro. A especificidade desta interação fornece a base da dinâmica da infecção. Entretanto, a literatura ignora como a especificidade do genótipo do parasito ou da linhagem do hospedeiro participa na virulência e patogênese, enfatizando somente o papel de um destes componentes. Desta forma, alguns modelos assumem que uma determinada linhagem de um parasito apresenta fenótipo de virulência que é estável em amplo genótipo do hospedeiro. Porém, sabe-se que a virulência do parasito sofre variação em diferentes hospedeiros. Em alguns casos, algumas linhagens de patógenos podem causar mais danos, com efeitos mais pronunciados em certos genótipos de hospedeiro (GRECH *et al.*, 2006).

Na malária, tem sido reconhecido que fatores do hospedeiro e do parasito podem afetar o curso da doença. Exemplos de fatores de resistência/susceptibilidade associados ao hospedeiro humano são: a anemia falciforme e alelos MHC particulares. Já alguns fenótipos produzidos pelo parasito, como a citoaderência e formação de rosetas, contribuem para a gravidade da doença (revisado por GRECH *et al.*, 2006).

Além disso, perfis de susceptibilidade e resistência coexistem em camundongos na geração F1 (BALB/c X C57Bl/6) infectados com *P. berghei* ANKA. Os animais velhos

(15-20 semanas) apresentam reversão dos sintomas da MC (HEARN *et al.*, 2000). Logo, a susceptibilidade pode estar também associada à idade dos animais utilizados no estudo.

Em síntese, podemos sugerir que o curso da infecção e o progresso da doença dependem da combinação dinâmica e específica das propriedades do hospedeiro e do parasito.

1.6 □ Características do *Plasmodium berghei*

A espécie *Plasmodium berghei* é a mais utilizada nos estudos experimentais e pertence ao grupo das espécies de *Plasmodium* que infectam roedores murinos da África Central, juntamente com *P. vinckei*, *P. chabaudi* e *P. yoelii*. A espécie *P. berghei* foi isolada em 1948, por Vincke e Lips no Zaire, em glândulas salivares da espécie silvestre de *Anopheles durenii*. Posteriormente (1954), Vincke encontrou o parasito no sangue dos roedores silvestres *Thamnomys surdaster*, *Praomys jacksoni* e *Leggada bella* (GARNHAN, 1966). Trabalhos recentes têm demonstrado a capacidade de *Anopheles stephensi*, *Anopheles gambiae* e *Aedes aegypti* atuarem como vetores de *P. berghei* (ALAVI *et al.*, 2004).

Uma cepa do parasito é considerada uma amostra retirada em uma única ocasião do seu hospedeiro natural e, também, pode ser referida como isolado. A cepa NK65 de *P. berghei* foi isolada em 1964, em um exemplar de *Anopheles durenii*, enquanto a cepa ANKA foi isolada posteriormente, em 1966, na mesma espécie (KILLICK-KENDRICK, 1978). A cepa NK65 de *P. berghei* causa uma infecção fulminante com altas taxas de parasitemia que evolui rapidamente para um curso letal (YOSHIMOTO *et al.*, 1998).

O ciclo de vida, bem como a morfologia dos estágios de desenvolvimento do parasito, está conservado nas diferentes espécies que infectam mamíferos. Algumas diferenças restritas ao tempo de desenvolvimento dos diferentes estágios do ciclo e outras relacionadas com a interação do parasito com seu hospedeiro foram identificadas (GARNHAN, 1966).

O *P. berghei*, no hospedeiro vertebrado, apresenta preferência em invadir reticulócitos, podendo também invadir eritrócitos maduros (DEHARO *et al.*, 1996). Em geral, prevalece a produção de 12-18 merozoítos por esquizonte quando há desenvolvimento em reticulócitos. O ciclo assexuado em laboratório requer 22-25 horas, sendo usualmente assincrônico, com os diferentes estágios sangüíneos presentes,

simultaneamente, no sangue ao longo da infecção. Infecções múltiplas de eritrócitos são descritas, com poliparasitismo tão extensivo que a massa citoplasmática parece ser contínua, com aspecto de esquizonte maduro. A retenção de esquizontes maduros no baço e fígado é um evento comum e já relatado para esta espécie (LANDAU & BOULARD, 1978). Nenhuma proteína de superfície de eritrócitos infectados, equivalente a membros da PfEMP, foi descrita em espécies de roedores, com os mecanismos do seqüestro ainda desconhecidos.

A imunidade para malária em uma diversidade de hospedeiros, inclusive humanos, é marcadamente dependente da espécie do parasito, linhagem e variante-específica. Em adição a fatores genéticos, fatores do hospedeiro como idade, via e dose de infecção, também influenciam o curso da infecção (BAKKER *et al.*, 1992).

1.7 - Mediadores inflamatórios

O fator de necrose tumoral (TNF- α) induz, em humanos e camundongos, a superexpressão de moléculas de adesão endotelial que têm sido implicadas no seqüestro de células na microvasculatura cerebral e outros órgãos. Na resposta imune inflamatória, uma função do TNF- α é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para o sítio de infecção e induzir a expressão de outros mediadores inflamatórios, em uma cascata de eventos (BROWN *et al.*, 1999). Porém, a produção excessiva desta citocina por monócitos/macrófagos desempenha um papel chave na patogênese da MC humana e MC experimental (GRAU *et al.*, 1987).

O desenvolvimento de complicações na malária está diretamente relacionado à resposta imune do hospedeiro. Acredita-se que a susceptibilidade seja dependente das diferenças na sensibilidade das células endoteliais ao TNF- α , com evidências favoráveis de que esta é a citocina chave na patogênese da MC (LUCAS *et al.*, 1997). Entretanto, outro estudo demonstrou que o TNF- α pode ter um papel na gravidade da doença, porém não está diretamente relacionada à MC (LOOAREESUWAN *et al.*, 1999).

Em adição a produção sistêmica, a liberação local destas citocinas pode contribuir para a patogênese órgão-específica. Um estudo demonstrou a produção de TNF- α por astrócitos e micróglia em modelo de MCE e seu envolvimento com a imunopatogênese (MEDANA *et al.*, 1997b).

1.8 - Recrutamento celular

Sob condições normais, os leucócitos são mantidos no centro dos vasos sanguíneos, onde o fluxo é rápido. Durante uma resposta inflamatória, o aumento dos níveis de TNF- α estimula a expressão sequencial de diferentes moléculas de adesão no endotélio, envolvidas no recrutamento de leucócitos do sangue para o espaço intersticial. É um processo multifásico, envolvendo uma seqüência de etapas controladas por moléculas de adesão, fatores de ativação e quimiocinas. As etapas da migração celular ocorrem geralmente nas vênulas pós-capilares e consistem de um contato inicial de leucócitos com a parede do vaso, rolamento destes ao longo do endotélio, seguido de uma adesão firme e migração transendotelial (Figura 2) (PICCIO *et al.*, 2002). O termo recrutamento de leucócitos abrange todos os eventos que mobilizam a saída de leucócitos circulantes para o tecido inflamado.

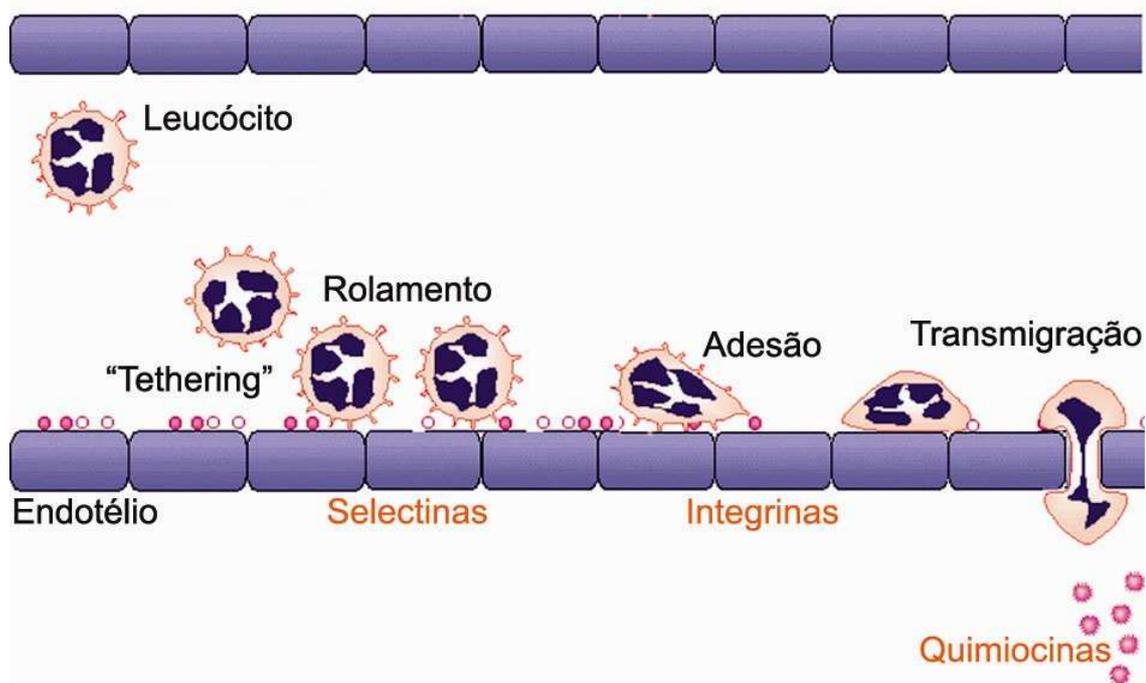


Figura 2: Mecanismo de recrutamento de leucócitos.

Nas últimas décadas, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nas interações leucócito-endotélio têm sido largamente investigados nos mais diversos tecidos e condições inflamatórias. A utilização da técnica de microscopia intravital para avaliar o recrutamento celular em modelos inflamatórios tem ampliado as informações a

respeito deste processo (LEY, 2001). Entretanto, deve-se salientar que a primeira descrição do recrutamento de leucócitos durante o processo inflamatório, através de microscopia intravital, foi realizada há mais de um século por Cohnheim (citado por KUBES & KERFOOT, 2001).

O mecanismo de rolamento é mediado por uma família de moléculas de adesão, glicoproteínas conhecidas como seletinas (P-seletina, E-seletina e L-seletina), que promovem uma fraca ligação inicial dos leucócitos às vênulas nos sítios de inflamação (KERFOOT & KUBES, 2002). Em presença do fluxo sanguíneo, após um primeiro contato com a parede do vaso, os leucócitos diminuem sua velocidade e começam a rolar ao longo da superfície endotelial, o que favorece as interações entre leucócitos e endotélio (KUBES & KERFOOT, 2001). Posteriormente, os leucócitos podem ser ativados através de mudança conformacional de integrinas, moléculas presentes em sua superfície celular, (CD11/CD18, VLA-2, VLA-4, $\alpha 4\beta 7$, $\alpha 3\beta 1$) e, conseqüentemente, podem aderir de forma estável ao endotélio via membros da superfamília das imunoglobulinas (ICAM, VCAM, PECAM, MAdCAM) (KERFOOT & KUBES, 2002; KUBES, 2002).

A última etapa é a migração dos leucócitos através de espaços inter-endoteliais para o tecido extravascular, o que requer uma reorganização do citoesqueleto, com formação e retração de pseudópodes. Moléculas presentes em junções intercelulares do endotélio, como PECAM-1 (CD31), também estão envolvidas na migração. Uma vez no tecido conectivo, os leucócitos aderem a matriz extracelular via integrinas $\beta 1$ e CD44 (KERFOOT & KUBES, 2002; KUBES, 2002).

O recrutamento de leucócitos também envolve a participação das quimiocinas, que agem sobre a expressão de moléculas de adesão e estão envolvidas na migração dirigida das células através de um gradiente de concentração (ONO *et al*, 2003).

1.9 - Quimiocinas

As quimiocinas constituem uma família de proteínas de baixo peso molecular (8-14 kDa), importantes tanto para a organização celular dos órgãos linfóides em condições fisiológicas, como na regulação do recrutamento de células durante a inflamação (BIBER *et al.*, 2002). As quimiocinas são produzidas por diferentes tipos celulares (linfócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e células endoteliais), apresentando uma expressão temporal durante o processo inflamatório. Em adição, estas proteínas também podem atuar na apoptose, hematopoiese, angiogênese, mitose,

metástase tumoral, cicatrização e secreção de mediadores inflamatórios, como citocinas, radicais livres e óxido nítrico (D'AMBROSIO *et al.*, 2003).

A classificação das quimiocinas é baseada no número e disposição de resíduos de aminoácidos entre os resíduos de cisteína conservados na cadeia N-terminal da molécula. Desta forma, as famílias foram agrupadas em C, CC, CXC e CX3C e seus receptores XCR, CCR, CXCR e CX3CR (BIBER *et al.*, 2002). As quimiocinas que pertencem ao grupo CC são caracterizadas por duas cisteínas adjacentes; as do grupo CXC ou CX3C apresentam um e três aminoácidos entre as cisteínas, respectivamente, enquanto que as XC apresentam apenas um resíduo de cisteína (BANISOR *et al.*, 2005). Os pares receptor-ligante das quimiocinas não apresentam especificidade absoluta, demonstrando uma alta redundância neste sistema (Figura 3). Por exemplo, o receptor CCR1 pode interagir com múltiplas quimiocinas (CCL3, CCL5, CCL7 e CCL8) (ONO *et al.*, 2003).

A estrutura dos receptores baseia-se em uma cadeia polipeptídica, composta por aproximadamente 350 aminoácidos, com sete domínios transmembrana que sinalizam através de uma proteína G acoplada. A interação entre uma quimiocina e seu receptor é iniciada pela ativação da proteína G, que induz um influxo de Ca^{++} , efetivo para estimulação de outras quimiocinas e ampliação da resposta inflamatória (ONO *et al.*, 2003). A ativação de vias de sinalização intracelulares culmina no rearranjo de filamentos de actina, modificação da forma e movimentação da célula (BAGGIOLINI, 1998).

Além da interação com seus receptores, as quimiocinas também podem se ligar a glicosaminoglicanos (GAGs) de superfície celular do endotélio vascular e da matriz extracelular (KUSCHERT *et al.*, 1999). Tem sido sugerido que esta interação seja capaz de inibir a difusão das quimiocinas localmente produzidas e, conseqüentemente, promover a formação de um gradiente de concentração, por imobilização dessas quimiocinas, que favorece a migração celular (KUSCHERT *et al.*, 1999; PROUDFOOT, 2006).

Os membros da família CXC, que incluem IL-8/CXCL8, MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 e MIP-2/CXCL2, são, preferencialmente, quimiotáticos para neutrófilos, monócitos e células T. Este grupo apresenta uma uniformidade estrutural, porém é subdividido em duas classes, de acordo com a presença da seqüência de aminoácidos Glu, Leu, Arg (ELR) presente na região N-terminal. Membros expressando este motivo, como IL-8/CXCL8, são geralmente quimiotáticos para neutrófilos (BAGGIOLINI *et al.*,

1994), que são as primeiras células a chegarem em grande número aos locais de infecção (ONO *et al.*, 2003). Entre as que não possuem o motivo ERL, destacam-se IP-10/CXCL10 e MIG/CXCL9, ambas induzidas por IFN- γ , que apresentam atividade em outras populações celulares. Em humanos, MIG/CXCL9 tem sido associada com infiltrado de células T em doenças inflamatórias no SNC, como na esclerose múltipla (SIMPSON *et al.*, 2000).

A família das quimiocinas CC é a mais diversa e numerosa, apresentando moléculas de expressão constitutiva e induzida. Os membros da família CC incluem MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4 e RANTES/CCL5, que atraem e ativam monócitos, linfócitos T, basófilos e eosinófilos que são recrutados tardiamente para os sítio de infecção (ONO *et al.*, 2003).

Trabalhos anteriores mostraram a expressão de algumas quimiocinas (MIP-1 α /CCL3 e IL-8/CXCL8) no soro de pacientes portadores de malária aguda (BURGMANN *et al.*, 1995). Um estudo comparativo da produção de citocinas e quimiocinas em modelos experimentais de MC induzida por *P. berghei* ANKA demonstrou um aumento na expressão localizada das quimiocinas IP-10/CXCL10, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 em tecido cerebral de camundongos infectados (HANUM *et al.*, 2003).

As células residentes do SNC, como astrócitos, oligodendrócitos, micróglia e neurônios, quando induzidas por um estímulo inflamatório são capazes de expressar receptores funcionais de quimiocinas (BIBER *et al.*, 2002).

O Sistema Nervoso Central (SNC) é considerado um sítio imunologicamente privilegiado, possuindo uma limitada reatividade imune e inflamatória. Tal fato deve-se à presença da barreira hematoencefálica (BHE), formada por uma bainha de endotélio, composta por junções intercelulares especializadas. Este complexo juncional recobre continuamente a superfície dos capilares cerebrais, sendo responsável por limitar o acesso celular e o tráfego de moléculas para o microambiente cerebral. Porém, durante condições inflamatórias, a permeabilidade da barreira pode ser alterada, permitindo o desenvolvimento de resposta imune no SNC (ADAMS *et al.*, 2002). A disfunção na permeabilidade da BHE, acarretada por condições patológicas, pode ser avaliada através da quantificação do extravasamento do corante azul de Evans da circulação para o parênquima cerebral (BELAYEV *et al.*, 1996)

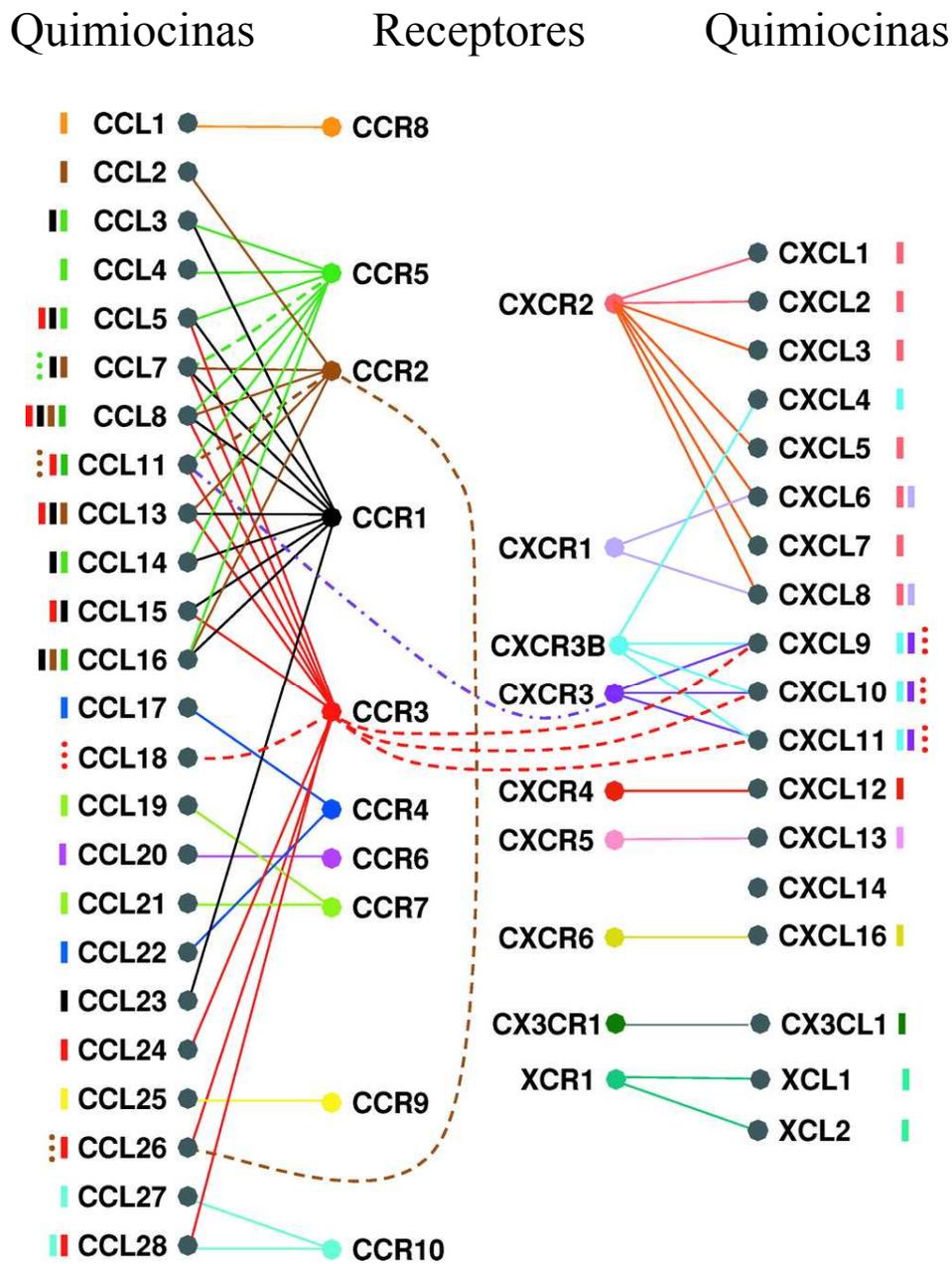


Figura 3: Interações das moléculas de quimiocinas com os diferentes tipos de receptores. Extraído de Rot & von Andrian, 2004.

2 - Justificativa

As dificuldades na definição de mecanismos patogênicos em humanos por razões éticas e as similaridades entre vias de resposta imune em camundongos e humanos justificam o uso do modelo murino de MC. Modelos experimentais utilizando camundongos são versáteis e permitem a análise completa de interações moleculares e celulares. Estudos detalhados da progressão da infecção ajudam a esclarecer informações relevantes da seqüência de eventos que levam ao quadro de malária grave.

Devido às diferenças significativas entre o modelo animal e a doença humana, muitos autores consideram que não existem modelos apropriados para a MC. Entretanto, estudos recentes indicam um acúmulo significativo de plaquetas e leucócitos na MC humana, que têm favorecido a comparação dos achados da infecção de camundongos com *P. berghei* com a infecção humana.

A maioria dos estudos de imunopatogênese da malária grave provém do modelo de infecção por *P. berghei* ANKA, com uma definição segura de resistência e susceptibilidade entre linhagens de camundongos. Entretanto, é reconhecido o envolvimento de polimorfismo de cepas do parasito na determinação da resposta imunológica e na patogênese da infecção. Outra característica que deve ser levada em consideração é a presença de múltiplas vias de progressão da doença. Logo, o estudo em modelos murinos não deve se deter em apenas um único modelo já definido, o que pode limitar a compreensão dos mecanismos envolvidos na MC.

Neste estudo avaliamos a resposta inflamatória cerebral da infecção experimental por *P. berghei* cepa NK65 em camundongos jovens das linhagens BALB/c e C57Bl/6, que apresentam perfis de resistência e de susceptibilidade bem determinados para a infecção por *P. berghei* ANKA.

Desta forma, buscou-se associar estudos de microscopia intravital com parâmetros histopatológicos e perfil de quimiocinas em camundongos jovens infectados com *P. berghei* NK65 para a compreensão de fatores determinantes da resposta inflamatória na MC. A escassez de estudos que empregam a técnica de microscopia intravital no cérebro para estudar recrutamento celular e de dados sobre o perfil de quimiocinas no tecido cerebral, torna o trabalho original, com informações que vão além das já descritas na literatura.

O estudo de microscopia intravital neste modelo inflamatório serve de ferramenta para ampliar as informações a respeito das interações leucócito-endotélio, e/ou endotélio-plaqueta-leucócito. A análise das interações leucócito-endotélio cerebral e dos níveis de quimiocinas, *in locu*, em camundongos infectados é relevante para

compreender os mecanismos de resposta imune e o envolvimento do SNC na progressão da doença.

3 - Objetivos

3.1 - Objetivo geral

Caracterizar a infecção por *P. berghei* cepa NK65 em linhagens de camundongos BALB/c e C57Bl/6 jovens, avaliando suas implicações inflamatórias no Sistema Nervoso Central.

3.2 - Objetivos específicos

3.2.1 - Avaliar parasitemia e parâmetros clínicos da malária em camundongos BALB/c e C57Bl/6 infectados com *P. berghei* cepa NK65.

3.2.2 - Determinar as alterações histopatológicas cerebrais nos camundongos BALB/c e C57Bl/6 ao longo da infecção por *P. berghei* cepa NK65.

3.2.3 - Avaliar *in vivo* os processos de rolamento e adesão de leucócitos no endotélio vascular da pia-máter nos camundongos infectados através da técnica de microscopia intravital.

3.2.4 - Quantificar o número total e diferencial de leucócitos presentes no sangue periférico dos animais controle e infectados.

3.2.5 - Verificar as possíveis alterações na permeabilidade vascular da BHE acarretadas pela infecção.

3.2.6 - Quantificar a concentração das citocinas TNF- α e IFN- γ e das quimiocinas murinas Kc/CXCL8, MIG/CXCL9, MIP-1 α /CCL3, MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5 no tecido cerebral e no soro do modelo de malária experimental induzida por *P. berghei* cepa NK65.

4 - Material e Métodos

4.1 - Animais

Camundongos das linhagens BALB/c e C57Bl/6, fêmeas, jovens, com idade de seis semanas, obtidos no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-ICB-UFMG) foram utilizados neste estudo. Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum*. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA), protocolo número 005/05.

4.2 - Parasito e infecção dos animais

A cepa NK65 de *P. berghei* foi isolada na África em 1964, em um exemplar de *Anopheles dureni* e vem sendo conservada como um isolado desde então (KILLICK-KENDRICK, 1978). Uma amostra foi cedida pela Dra. Luzia Helena Carvalho do Laboratório de Malária do Centro de Pesquisa René Rachou FIOCRUZ/MG e vem sendo mantida no laboratório de Malária do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais desde o ano de 2000. O parasito é criopreservado e para a infecção, uma amostra foi estavelmente descongelada e inoculada em animal para uma primeira passagem que serviu de fonte dos parasitos.

Os camundongos foram infectados intra-peritonealmente (i.p.) com inóculo padronizado de 10^6 hemácias parasitadas em solução tampão fosfato estéril (PBS) para garantir um grau de infecção uniforme nos diferentes grupos (GRAU *et al.*, 1986).

4.3 - Determinação da parasitemia

Para determinação da evolução diária da parasitemia, um grupo de dez animais de cada linhagem foi infectado e monitorado até o óbito. Esfregaços sangüíneos foram confeccionados a partir do terceiro dia pós-infecção, fixados em metanol (P.A.) e posteriormente corados pelo Giemsa (solução a 10%). Os esfregaços foram utilizados para a contagem da parasitemia, permitindo evidenciar a presença do parasito dentro das hemácias, confirmando a infecção. Os esfregaços sangüíneos, devidamente identificados, foram examinados ao microscópio óptico (aumento 1000X - imersão) com um retículo acoplado à ocular. Uma área do esfregaço com distribuição uniforme de eritrócitos foi selecionada e o número total de eritrócitos do campo foi contado. A

parasitemia foi estimada em 1000 eritrócitos contados. A contagem foi realizada em campos adjacentes para evitar variações intensas.

O eritrócito contendo dois ou mais parasitos foi considerado como um eritrócito parasitado. A parasitemia foi expressa em percentagem:

$$\% \text{ parasitemia} = \frac{\text{número de eritrócitos parasitados}}{1000} \times 100$$

Um acompanhamento da variação de peso dos animais foi realizado ao longo da infecção, juntamente com observações qualitativas de manifestações clínicas nos animais. Os animais que sobreviveram ao longo da realização de todas as etapas dos experimentos foram adicionados à curva de sobrevivência.

4.4 - Histologia

Para avaliar a cinética das alterações histopatológicas cerebrais pós-infecção, 40 animais de cada linhagem foram utilizados. Em cada grupo, três animais foram retirados e utilizados como controles (sem infecção). O restante, isto é 37 animais de cada linhagem, foram infectados com o *P. berghei* NK65 e a partir desta data, três camundongos foram sacrificados diariamente, o que permitiu um acompanhamento das mudanças patológicas acarretadas pela infecção. Este acompanhamento foi realizado até o nono dpi para os animais da linhagem BALB/c e sétimo dpi para animais C57Bl/6, em virtude da mortalidade de alguns animais ao longo do tempo.

4.4.1 - Fixação do tecido e recorte dos órgãos

Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical. Durante a necropsia, o cérebro foi coletado e fixado por imersão em solução de formol tamponado a 4%, pH 7.2, com o objetivo de preservar a morfologia e a composição do tecido. Após o período de fixação, os tecidos foram recortados e seccionados transversalmente. A cada animal foi dado um código que apenas foi revelado ao final de todas as análises.

4.4.2 - Desidratação, diafanização e inclusão em parafina

Os tecidos foram submetidos à desidratação em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e absoluto) sendo que os fragmentos permaneceram imersos por um período de 30 minutos em cada álcool.

Após a etapa de desidratação, foi realizado o processo de diafanização, que tem como objetivo tornar o tecido translúcido. A diafanização consistiu em submeter os fragmentos a dois banhos de xilol com duração de 20 minutos cada. Posteriormente, os tecidos foram impregnados e incluídos em parafina.

4.4.3 - Microtomia

Os blocos de parafina, contendo o fragmento do órgão, foram submetidos à microtomia, sendo obtidos dois cortes seriados com 4 micrômetros de espessura. Cada corte foi colocado em banho-maria para que as fitas fossem esticadas e logo depois as lâminas foram colocadas na estufa para secarem a temperatura de 60° C.

4.4.4 - Coloração

4.4.4.1 - Hematoxilina-Eosina

A coloração de rotina HE (Hematoxilina-Eosina) foi realizada nas lâminas com cortes do tecido cerebral para uma observação geral das alterações histopatológicas.

O processo de coloração se iniciou com a imersão das lâminas em dois banhos de xilol, de duração de 15 minutos cada, para desparafinização. Em seguida estas lâminas foram imersas em banhos de álcool absoluto, álcool 90%, álcool 80%, álcool 70%, e água sendo cada um dos banhos de 5 minutos para hidratação. Após a hidratação, as lâminas foram imersas no corante Hematoxilina (corante ácido) por 10 minutos, em seguida lavadas em água corrente por 5 minutos. A seguir foi feita a diferenciação com a passagem rápida das lâminas em álcool-acidulado. Novamente as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos. Finalizada esta etapa, as lâminas foram imersas no corante Eosina (corante básico), por 30 segundos, e em seguida lavadas em água corrente por 1 minuto. Logo após, as lâminas foram imersas em três banhos de álcool

absoluto rapidamente e levadas à estufa a 60° C por alguns minutos para secagem. Depois de secas, as lâminas foram imersas em xilol e montadas com Entellan (Merck) e lamínula.

4.4.4.2 □ Cresil Violeta

Em adição a coloração Hematoxilina-Eosina, foi realizada a coloração pelo método do Cresil Violeta no tecido cerebral, o qual permite a identificação do dano neuronal, além das observações histopatológicas gerais. Para a realização desta coloração, as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas assim como na coloração pela HE. Depois foram coradas pelo Cresil Violeta por 10 minutos e diferenciadas em solução tampão ácido acético/acetato, por tempo variável (observação visual) até a descoloração parcial das estruturas. Em seguida as lâminas foram colocadas na estufa a 60°C para secagem. A montagem das lâminas foi realizada com Entellan e lamínula.

4.4.5 - Análise Histopatológica

As lâminas coradas pela HE e Cresil violeta foram avaliadas utilizando-se a objetiva de 10 e 40X. Nos cortes histológicos o processo inflamatório foi avaliado de forma qualitativa e caracterizado como: ausente, discreto (pequeno número de células inflamatórias ou apresentando degeneração □ até 10 células por campo), moderado (moderado número de células inflamatórias ou apresentando degeneração □ entre 10 e 50 células por campo) ou intenso (acentuado número de células inflamatórias ou apresentando degeneração □ mais de 50 células por campo). Nos vasos foram avaliados o acúmulo e extravasamento de hemácias e leucócitos também caracterizados como discreto, moderado ou intenso de acordo com a quantidade de vasos comprometidos utilizando-se a objetiva de 10 X (discreto: um vaso por campo; moderado: entre dois e três vasos por campo e intenso: mais de três vasos por campo).

4.5 - Microscopia intravital

Animais controle, não-infectados, (n=7) e animais com cinco dias de infecção (n=7) de cada grupo foram submetidos à técnica da microscopia intravital, para visualização da microvasculatura cerebral.

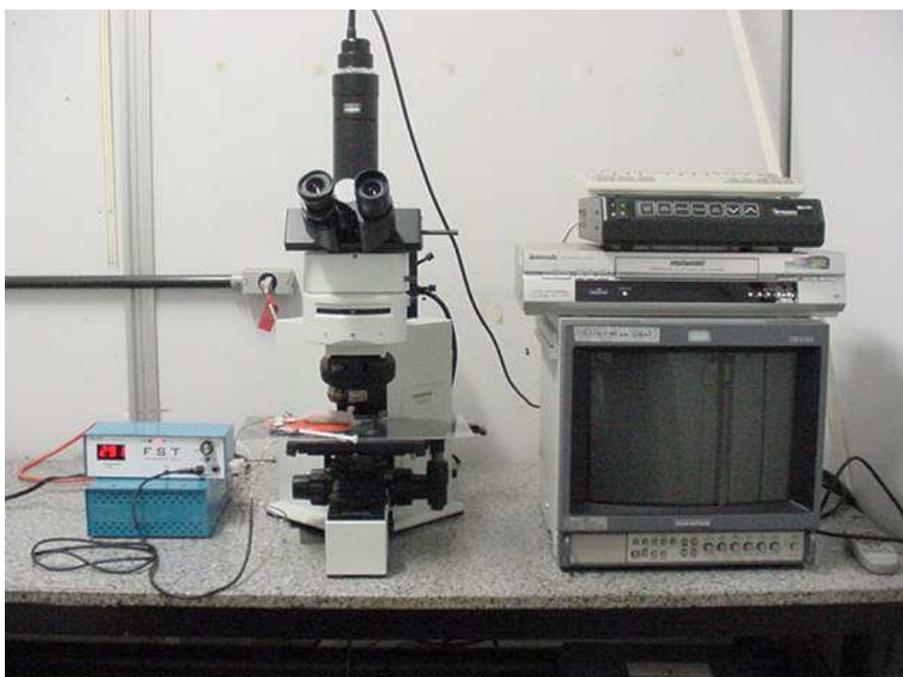


Figura 4- Foto do sistema de microscopia intravital.

Os animais foram anestesiados via intra-peritoneal com uma mistura de xilazina (10 mg/kg, Rompun[®], Bayer) e Ketamina (150 mg/Kg, Laboratório Cristália, SP). A veia da cauda foi canulada para administração do corante rodamina 6G (Sigma) e volumes adicionais de anestésico quando necessário. A rodamina 6G é um corante fluorescente, com a habilidade de marcar mitocôndrias seletivamente. Devido a esta propriedade, o corante tem sido usado para o estudo de leucócitos em ensaios de microscopia intravital, com o objetivo de examinar a cinética *in vivo* destas células mesmo na presença da alta velocidade do fluxo sanguíneo (BAATZ *et al.*, 1995). A temperatura corporal dos animais foi continuamente monitorada com um sensor e mantida a 37°C com uma manta térmica (Fine Science Tools, Canadá) colocada em contato com o corpo do animal. A craniotomia foi realizada na região parietal utilizando uma mini-broca (Dremel, USA). A dura-máter e a aracnóide foram removidas, sendo

formada uma janela para visualização dos vasos sanguíneos da pia-máter. Este procedimento não rompe a barreira vascular cerebral. A superfície cerebral dos animais foi continuamente superfundida com uma solução de fluido cerebrospinal (CSF) artificial (composição iônica em mmol/L: NaCl 132, KCl 2.95, CaCl₂ 1.71, MgCl₂ 0.64, NaHCO₃ 24.6, dextrose 3,71 e uréia 6.7) à temperatura de 37°C, pH 7,35, que mantém a preparação estável, sem evidência de inflamação no nível basal (CARVALHO-TAVARES *et al.*, 2000).

Um microscópio (Olympus BX40), com objetiva 10X, foi utilizado para observar os eventos microcirculatórios nos vasos cerebrais. Após a localização dos vasos a serem estudados, injetou-se intravenosamente (i.v.) uma pequena quantidade (0,5mg/kg) do corante rodamina 6G. A fluorescência associada à rodamina 6G foi visualizada com epi-iluminação a 510-560 nm, usando um filtro de emissão de 590 nm. Uma câmera de vídeo (Optronics) projetou as imagens que foram gravadas em vídeo-cassete (VHS, Semp Toshiba, modelo x685) para posterior análise. O número de leucócitos em rolamento e adesão foi determinado através da análise dos vídeos, em uma área determinada (100µm). O rolamento de leucócitos é definido como células movendo a uma velocidade menor que o fluxo sanguíneo. Os leucócitos são considerados aderidos quando permanecem estacionários ao endotélio por um período de 30 segundos. O rolamento, por ser um processo dinâmico, foi expresso como número de células /minuto. A adesão leucocitária foi expressa como células aderidas ao endotélio vascular (em 100µm de comprimento do vaso).

4.6 □ Contagem total e diferencial de leucócitos

Para a contagem total de leucócitos, 5µl do sangue de cada animal foi coletado e diluído em 95µl de solução de Turk. Após homogenização, 10µl da solução foi colocada em câmera de Neubauer para a contagem total das células. A contagem foi realizada em microscópio óptico, em aumento de 10X. O valor encontrado foi multiplicado pela diluição e o fator de correção da câmera de Neubauer.

$$\text{n}^\circ \text{ total de leucócitos} = n \times 20 \text{ (diluição)} \times 10^4 \text{ (fator de correção)/mL}$$

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaços sangüíneos corados com May-Gruwald e Giemsa, o que permite a identificação dos tipos celulares presentes no sangue periférico dos animais infectados e controles. Os esfregaços sangüíneos, devidamente identificados, foram examinados ao microscópio óptico (aumento 1000X - imersão). A contagem percentual dos diferentes tipos celulares foi estimada em 100 células, com auxílio de um contador diferencial.

Para o cálculo do número diferencial dos tipos celulares presentes no sangue periférico foi utilizada a seguinte regra:

$$\text{n}^\circ \text{ diferencial} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de leucócitos} \times \text{n}^\circ \text{ percentual}}{100}$$

4.7 - Avaliação da permeabilidade vascular

Para a avaliação da permeabilidade da BHE, utilizou-se o corante azul de Evans como um marcador do extravasamento de albumina, como descrito previamente por Belayev *et al.*, (1996), em protocolo modificado. O método consiste na determinação espectrofotométrica da quantidade de azul de Evans extravasado para o parênquima cerebral.

Animais controle (n=6) e com cinco dias de infecção (n=6), de cada linhagem, foram anestesiados via intra-peritoneal com uma mistura de xilazina (10 mg/kg, Rompun[®], Bayer) e Ketamina (150 mg/Kg, Laboratório Cristália, SP). Posteriormente, a veia da cauda foi canulada e foi administrado 0,2 mL de Azul de Evans (2%) intravenosamente. Ao final de uma hora, os animais foram sacrificados e perfundidos com salina fisiológica (5 mL por animal). O cérebro foi retirado e colocado em uma placa de petri para secagem por 48 horas em estufa a 40°C. Em seguida, as amostras foram pesadas e foi acrescentado ao tecido 1mL de formamida para extração do corante por 48 horas. O corante extraído do tecido foi quantificado em leitor de ELISA (650nm) (Molecular Devices, USA) e a concentração determinada através de uma curva padrão com concentração inicial de 20 pg/mL de Azul de Evans. O resultado da leitura espectrofotométrica foi normalizado e expresso em pg de Azul de Evans por 100mg de tecido seco.

4.8 - Medida dos níveis de citocinas e quimiocinas no soro e cérebro por ELISA

4.8.1 - Preparo de homogenato de cérebro de camundongo

Os cérebros de oito animais não-infectados (controle) e de dez animais com cinco dias de infecção foram retirados, devidamente acondicionados e, quando necessário, estocados a -20°C . As amostras foram posteriormente pesadas (100 mg) e colocadas em 1 mL de solução inibidora de protease, adequada para extração de citocinas [NaCl 0,4 M; Tween 20 0,05%; Albumina de soro bovino (BSA) 0,5%; Fluoreto de fenilmetilsufonila (PMSF) 0,1mM; cloreto de benzetônio 0,1 mM; EDTA 10 mM; 20 UI de aprotinina], preparada a partir de uma solução de tampão fosfato (NaCl 8 g, KCl 0,2 g e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,89 g diluídos em 1 litro). As amostras foram maceradas por um homogenizador de tecidos (Ultra-Turrax) e o homogenato foi centrifugado a 10000 r.p.m./10 min, a 4°C . O sobrenadante foi recolhido, aliqotado e estocado a -20°C até o uso (DOS SANTOS *et al.*, 2005).

4.8.2 - Obtenção de soro de camundongos

Após anestesia, oito camundongos infectados (5dpi) e sete animais controle de cada linhagem sofreram exsanguinação através do plexo retro-orbital, e o sangue foi coletado em tubos individuais. Para obtenção do soro, as amostras foram mantidas durante uma hora em temperatura ambiente e uma hora a 4°C . Posteriormente, o material foi centrifugado a 3000 r.p.m./10 min e o soro foi recuperado e estocado a -20°C até o uso.

4.8.3 - Determinação de citocinas por ELISA

Os kits para ELISA para dosagem das citocinas TNF- α e IFN- γ e das quimiocinas murinas Kc/CXCL8, MIG/CXCL9, MIP-1 α /CCL3, MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5 foram obtidos da R&D Systems (DuoSet) e utilizados de acordo com os procedimentos previamente descritos pelo fabricante. As concentrações das citocinas

TNF- α e IFN- γ e das quimiocinas MCP-1/CCL2, Kc/CXCL8, RANTES/CCL5, MIG/CXCL9 e MIP-1 α /CCL3 foram avaliadas no sobrenadante de homogenato de cérebro em diluição 1:3 em PBS contendo 0,1% de soro albumina bovina (BSA). Adicionalmente, a concentração sistêmica de TNF- α foi avaliada no soro dos animais em um protocolo semelhante (diluição 1:3 em PBS/BSA 0,1%).

Em placas de 96 poços (Nunc. Immunosorb, Naperville), foram adicionados 100 μ l/poço do anticorpo de captura, sendo este específico para cada molécula e em concentração adequada. Esta solução permaneceu em contato com a placa durante 18 h a 4°C e foi, posteriormente, lavada cinco vezes com PBS/Tween 0,1%, utilizando um lavador de placas automático (ELX50, Bio-Tet Instruments, INC). Logo após, foram adicionados 200 μ l/poço de solução de bloqueio (PBS/BSA 1%). O tempo de bloqueio foi de duas horas sob agitação. Transcorrido este tempo, houve nova lavagem das placas e 100 μ l de cada amostra foram adicionados à placa. Paralelamente, para o estabelecimento de cada curva padrão, foram utilizadas diferentes diluições das quimiocinas, a partir das seguintes concentrações iniciais: TNF- α , 2000 pg/mL; IFN- γ , 2000 pg/mL; Kc/CXCL8, 1000pg/mL; MCP-1/CCL2, 500pg/mL; RANTES/CCL5, 2000pg/mL; MIG/CXCL9, 1000 pg/mL; MIP-1 α /CCL3, 1000 pg/mL. As placas foram incubadas por mais 18 h a 4°C. As placas foram lavadas e foram adicionados 100 μ l/poço de solução de anticorpo de detecção, biotilado e específico para cada molécula. As placas foram incubadas por uma hora e foram lavadas em seguida. Transcorrida esta etapa, foram adicionadas a cada placa uma solução contendo estreptavidina ligada à peroxidase (HRP, Pharmingen). Após 30 minutos, a placa foi novamente lavada, a continuação foi adicionado o tampão substrato contendo o-fenilenodiamina (OPD, Sigma) e H₂O₂ (Merck). Após cerca de 30 minutos, a reação foi interrompida com 50 μ l de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1M. O produto da oxidação do OPD foi detectado por colorimetria em leitor de placas a 492 nm (Molecular Devices, USA). A concentração referente a cada amostra foi calculada a partir da curva padrão correspondente.

4.9 - Análise estatística

Os dados foram analisados no programa Prisma 4.0 e apresentados com média \pm erro padrão da média (EPM). Dados de parasitemia foram avaliados através do teste

Two-way ANOVA. Para análise estatística da sobrevida foi utilizado o teste Generalized Wilcoxon. Os resultados da microscopia intravital foram submetidos à análise de variância (One-way ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls, que realiza comparações múltiplas. Para a contagem de leucócitos, dosagem de quimiocinas e avaliação de permeabilidade vascular, o teste *t*-student foi realizado. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

5 - Resultados

5.1 - Evolução da parasitemia

O curso da infecção foi monitorado diariamente e a evolução da parasitemia foi acompanhada através de esfregaços sangüíneos, a partir do terceiro dia pós-infecção. A observação microscópica dos esfregaços sangüíneos confirmou a infecção em todos os animais que desenvolveram aumento gradual de parasitemia (Gráfico 1), demonstrando uma alta capacidade de multiplicação do parasito. Os animais C57Bl/6 tiveram a parasitemia avaliada até sétimo dia pós-infecção, devido à morte precoce destes. Esta linhagem, ainda, desenvolveu uma parasitemia menor quando comparado com os animais BALB/c. Através de análise estatística, verificamos que esta evolução foi significativamente diferente ao longo do tempo ($p < 0.0001$) e, entre as linhagens no sexto dia pós-infecção ($p < 0.01$).

Diferentes formas evolutivas de *P. berghei* NK65 foram visualizadas nos esfregaços sangüíneos analisados. Trofozoítos jovens e maduros e esquizontes foram detectados no esfregaço. Também foram verificadas, nos esfregaços sangüíneos, anormalidades morfológicas envolvendo a membrana celular dos eritrócitos (Figura 5).

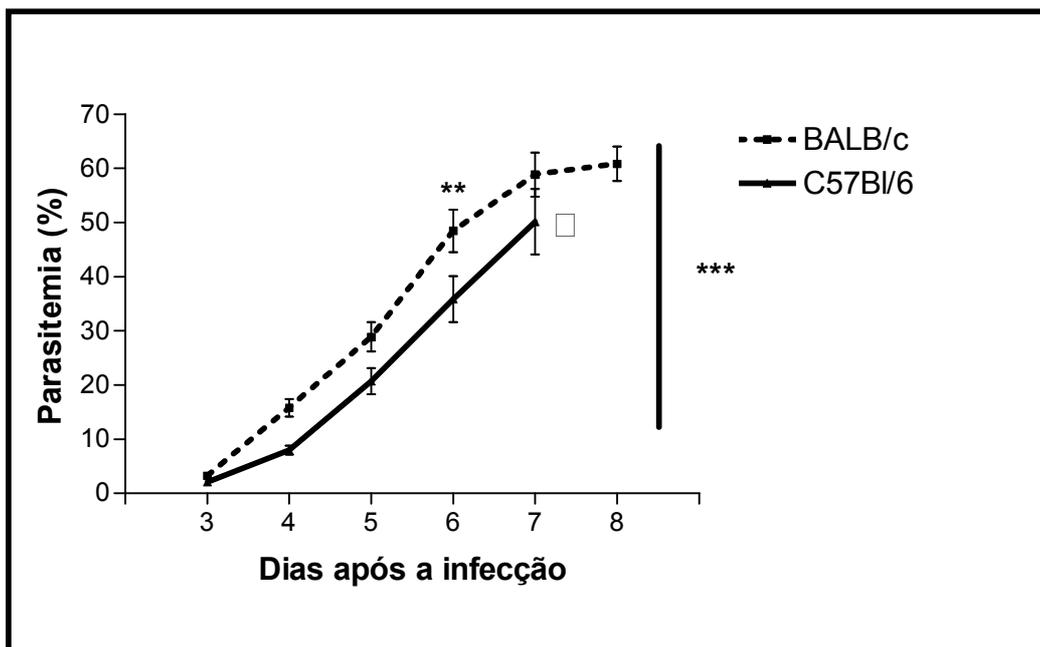


Gráfico 1 □ Média das parasitemias diárias de camundongos BALB/c e C57Bl/6, a partir do terceiro dia pós-infecção, infectados com *P. berghei* NK65 com um inóculo padronizado de 10^6 hemácias parasitadas pela via intraperitoneal. A parasitemia foi avaliada através de esfregaços sangüíneos sob microscopia óptica (aumento 1000X - imersão). Os dados foram analisados pelo teste Two-way ANOVA, onde ** ($p < 0.01$) e *** ($p < 0,0001$) indicam diferenças significativas entre os níveis de parasitemia entre as linhagens, tanto no sexto dia pós-infecção quanto ao longo do curso da infecção ($n=10$ para cada grupo). O experimento foi repetido e confirmado. □ representa a morte dos animais.

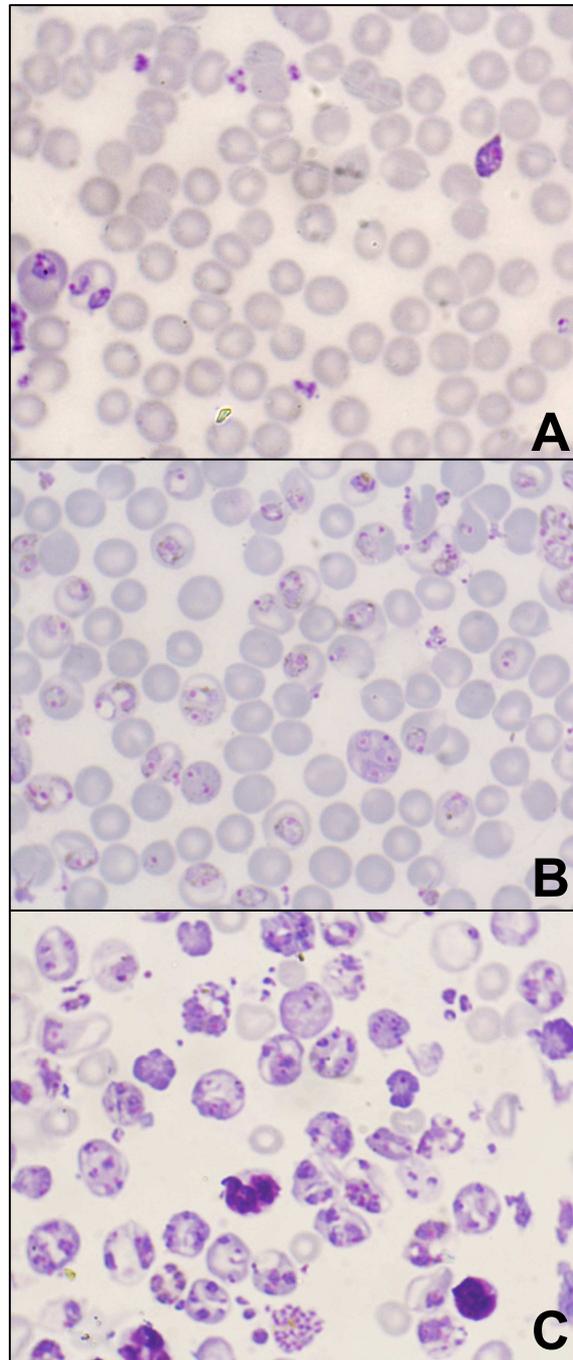


Figura 5- Fotomicrografias de esfregaços sangüíneos corados com Giemsa, X1000. A- Parasitemia leve, com 3% de hemácias parasitadas, B- Parasitemia moderada, com 35% de hemácias parasitadas e C- Parasitemia acentuada, com 66% de hemácias parasitadas, estas apresentando deformidades estruturais.

5.2 - Mortalidade

A infecção por *P. berghei* cepa NK65 desenvolveu-se de forma aguda com curso letal para as duas linhagens. A mortalidade foi expressa como percentagem de sobrevivência e apresentou um perfil diferente para as duas linhagens (Gráfico 2). A mortalidade dos animais da linhagem BALB/c iniciou-se no sétimo dia e perdurou até o décimo primeiro, com um pico no oitavo dia pós-infecção. Os animais C57Bl/6 apresentaram uma letalidade precoce, com intervalo de confiança (95%) nos dias seis e sete pós-infecção. Houve diferenças significativas na sobrevivência em relação ao tempo ($p < 0.0001$) e entre as linhagens ($p < 0.001$).

5.3 - Sinais clínicos

A análise de variação da massa corporal dos animais de cada linhagem foi mensurada em animais controle e infectados, ao longo do tempo (Gráfico 3). Os animais infectados apresentaram uma perda de massa acentuada ao longo da infecção, sendo compatíveis com as altas parasitemias e com a mortalidade dos animais. Animais controle da linhagem BALB/c apresentaram um aumento gradual da massa ao longo das observações. Já os animais infectados desta linhagem, no sexto dia pós-infecção, apresentaram uma queda expressiva da massa ($-10,99 \pm 1,99$ %), um quadro que persiste no oitavo dia ($-24,11 \pm 0,60$ %) (Gráfico 3-A). Para a linhagem C57Bl/6 foi encontrado um perfil semelhante após a infecção. Os animais controle C57Bl/6 mantiveram o peso ao longo das observações, enquanto animais infectados apresentaram uma perda da massa no sexto dia pós-infecção ($-13,26 \pm 2,38$ %), que também persistiu no oitavo dia ($-14,69 \pm 12,16$ %) (Gráfico 3-B).

A observação das vísceras de camundongos infectados durante a necropsia confirmou hepatoesplenomegalia, uma característica comum na infecção humana. Notou-se também nestes animais, a partir do quinto dia pós-infecção, um processo de anorexia, através da ausência de conteúdo estomacal e intestinal nos animais, o que pode justificar a perda de peso nos animais. Os camundongos de ambas as linhagens, BALB/c e C57Bl/6, também apresentaram hemoglobinúria a partir do sexto dia de infecção.

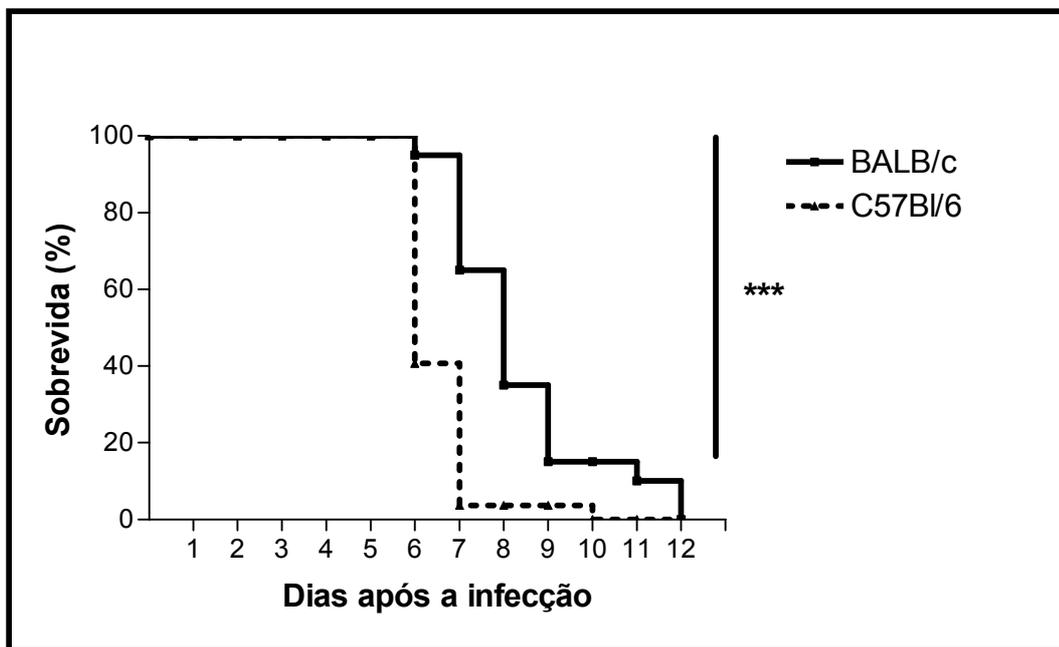


Gráfico 2 □ Curva de sobrevivência de camundongos BALB/c e C57Bl/6 expressa como porcentagem durante o curso da infecção. Os animais de ambas as linhagens foram monitorados diariamente a partir da infecção com *Plasmodium berghei* NK65, com um inóculo padronizado de 10^6 hemácias parasitadas pela via intraperitoneal. Para análise estatística foi utilizado o teste Generalized Wilcoxon e *** indica diferença significativa ($p < 0.001$) na sobrevivência entre as duas linhagens. (n=20 para linhagem BALB/c e n=27 para animais C57Bl/6). Os resultados foram obtidos de três experimentos independentes.

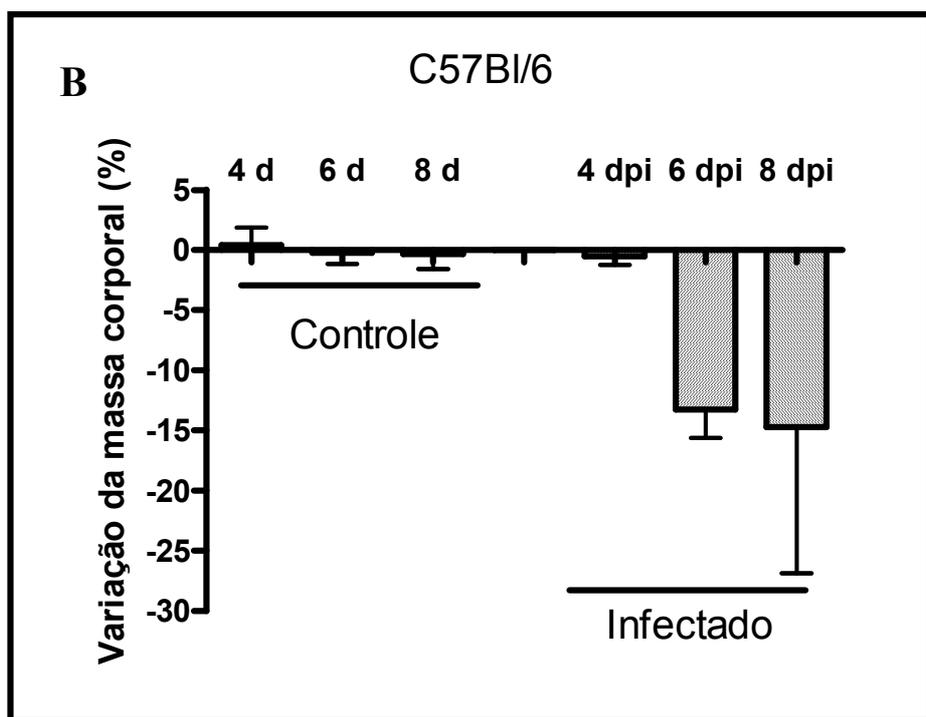
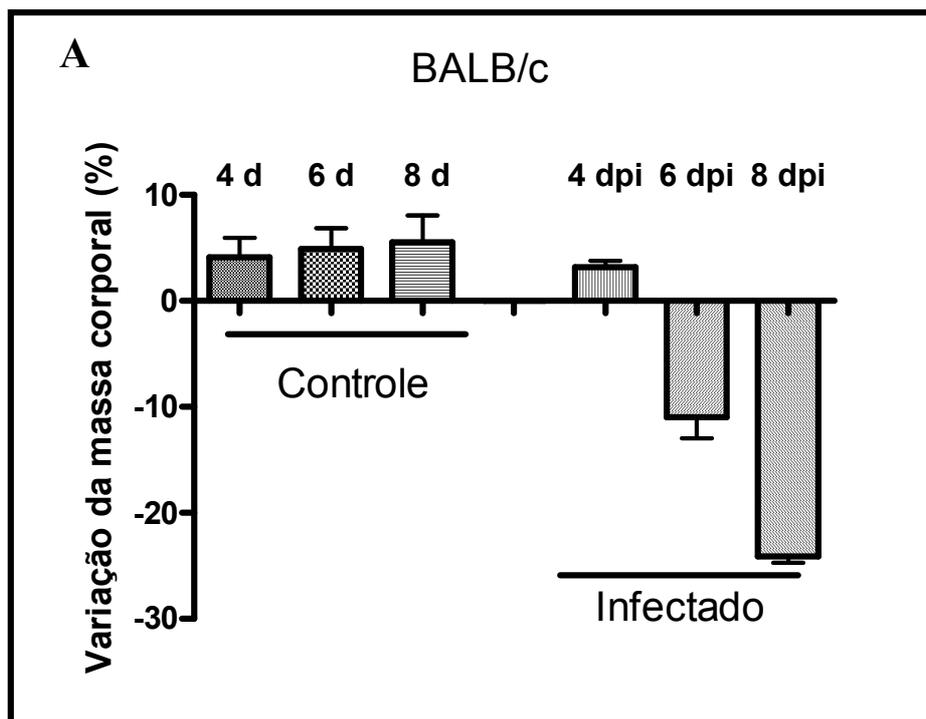


Gráfico 3- Variação da massa corporal (%) de animais BALB/c (A) e C57Bl/6 (B) infectados com *Plasmodium berghei* NK65, inóculo padronizado de 10^6 hemácias parasitadas pela via intraperitoneal, em relação aos controles não-infectados. (n=10 para o grupo infectado de cada linhagem e n=5 para o grupo controle).

5.4 - Histologia

Os animais não-infectados (Figuras 6A-D), juntamente com aqueles sacrificados no primeiro e segundo dia pós-infecção, apresentaram aspecto histológico cerebral compatível com quadro de normalidade.

A análise morfológica do cérebro confirmou que as alterações histopatológicas tornaram-se mais evidentes ao longo da infecção. No terceiro dia pós-infecção, os animais BALB/c mantiveram o padrão histológico compatível com normalidade. Por outro lado, os animais C57Bl/6 já mostraram discretas alterações teciduais (Figura 7 A-D). Foi possível observar neste grupo a presença de congestão, raros focos de hemorragia e um predomínio de linfócitos no parênquima cerebral circunvizinho ao vaso sanguíneo (Figura 7-D). A partir deste dia, em ambos os grupos, verificaram-se alterações semelhantes às descritas na MC tais quais: congestão, hemorragia parenquimal, discreto extravasamento de linfócitos, proliferação da glia, obstrução vascular, edema, acúmulo de eritrócitos e acúmulo e adesão de leucócitos nos vasos.

O parasitismo das hemácias na luz dos vasos ou no parênquima tecidual foi confirmado, a partir do sexto dia pós-infecção e variou entre os animais.

No sexto dia pós-infecção os animais BALB/c apresentaram alterações moderadas (Figura 8 A-D) quando comparados aos animais C57Bl/6 (Figura 8 E-H) onde estas alterações foram intensas. Em contrapartida, no nono dia pós-infecção, as alterações histológicas dos animais BALB/c que sobreviveram até este período foram intensas (Figura 9 A-H), semelhantes àquelas descritas para os animais C57Bl/6 no sexto dia de infecção (Figura 8 E-H).

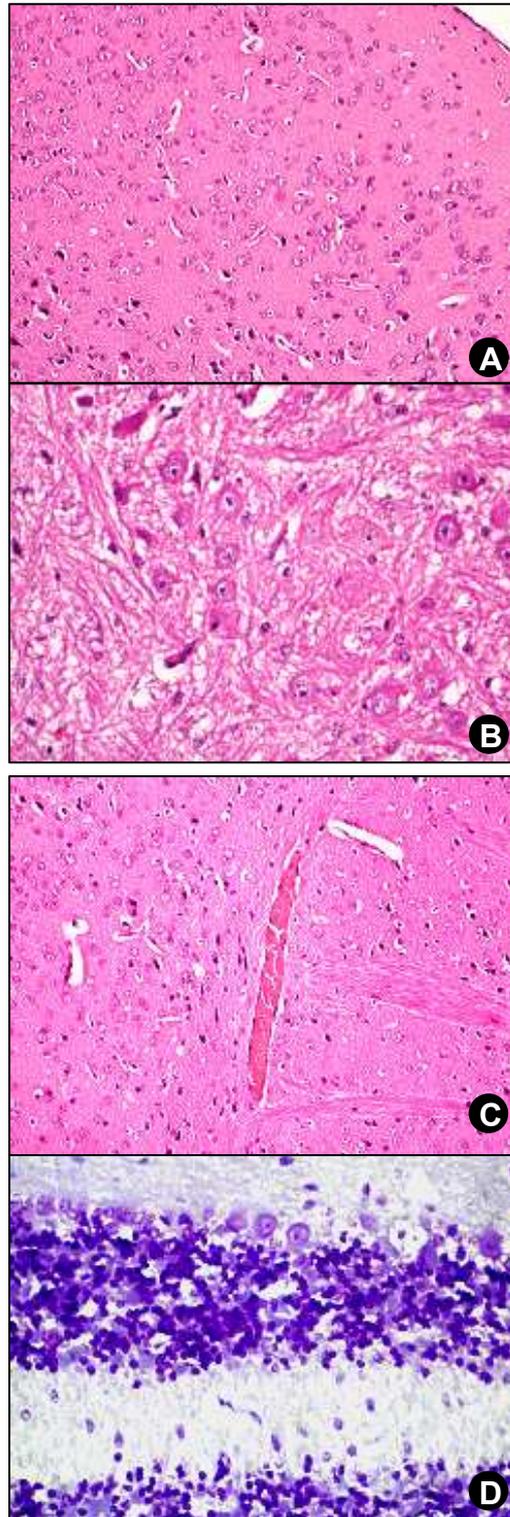


Figura 6 - Fotomicrografias representativas do córtex cerebral de camundongos BALB/c e C57Bl/6 não-infectados. A- Aspecto histológico normal: ausência de infiltrado inflamatório, alterações degenerativas ou hemorrágicas, 300X; **B-** Detalhe da figura anterior, 600X; **C-** Grande vaso apresentando hemácias em sua luz, 300X, Hematoxilina Eosina. **D-** Cerebelo: aspecto histológico normal, 600X, Cresil violeta.

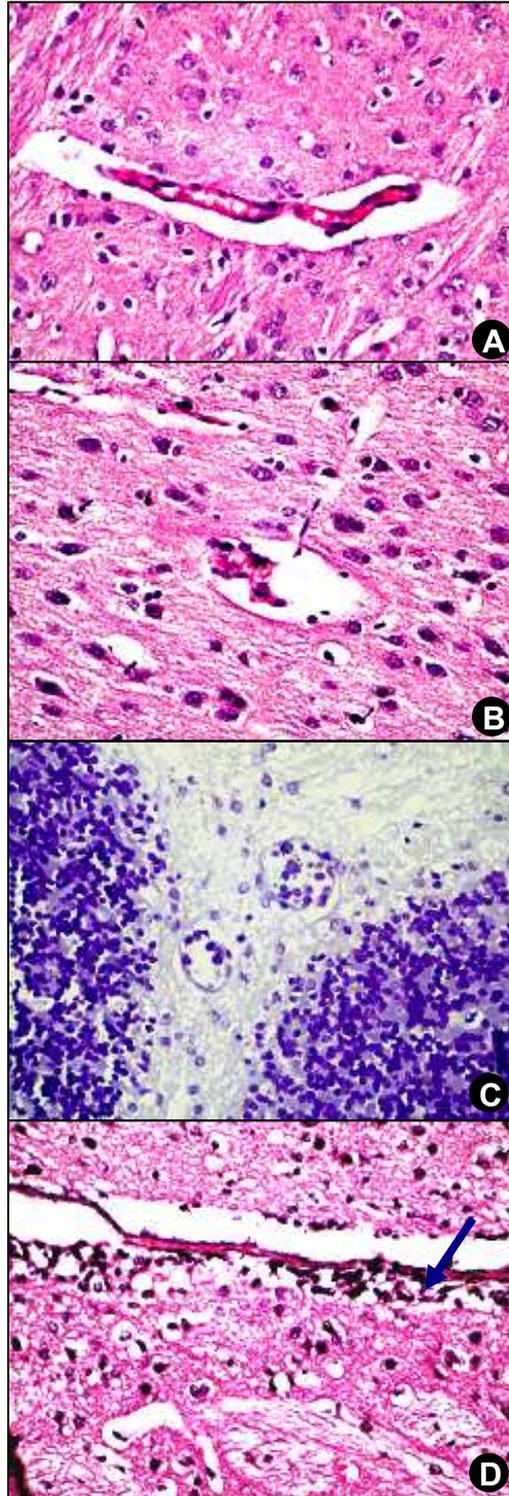


Figura 7 - Fotomicrografias do córtex cerebral de camundongos C57Bl/6 infectados eutanaziados no terceiro dia de infecção. A, B e C- Vasos apresentando hemácias e leucócitos aderidos ao endotélio, 600X; D- Infiltrado inflamatório discreto e difusamente distribuído com predomínio de linfócitos (seta), 600X. A, B e D: Hematoxilina Eosina. C: Cresil violeta.

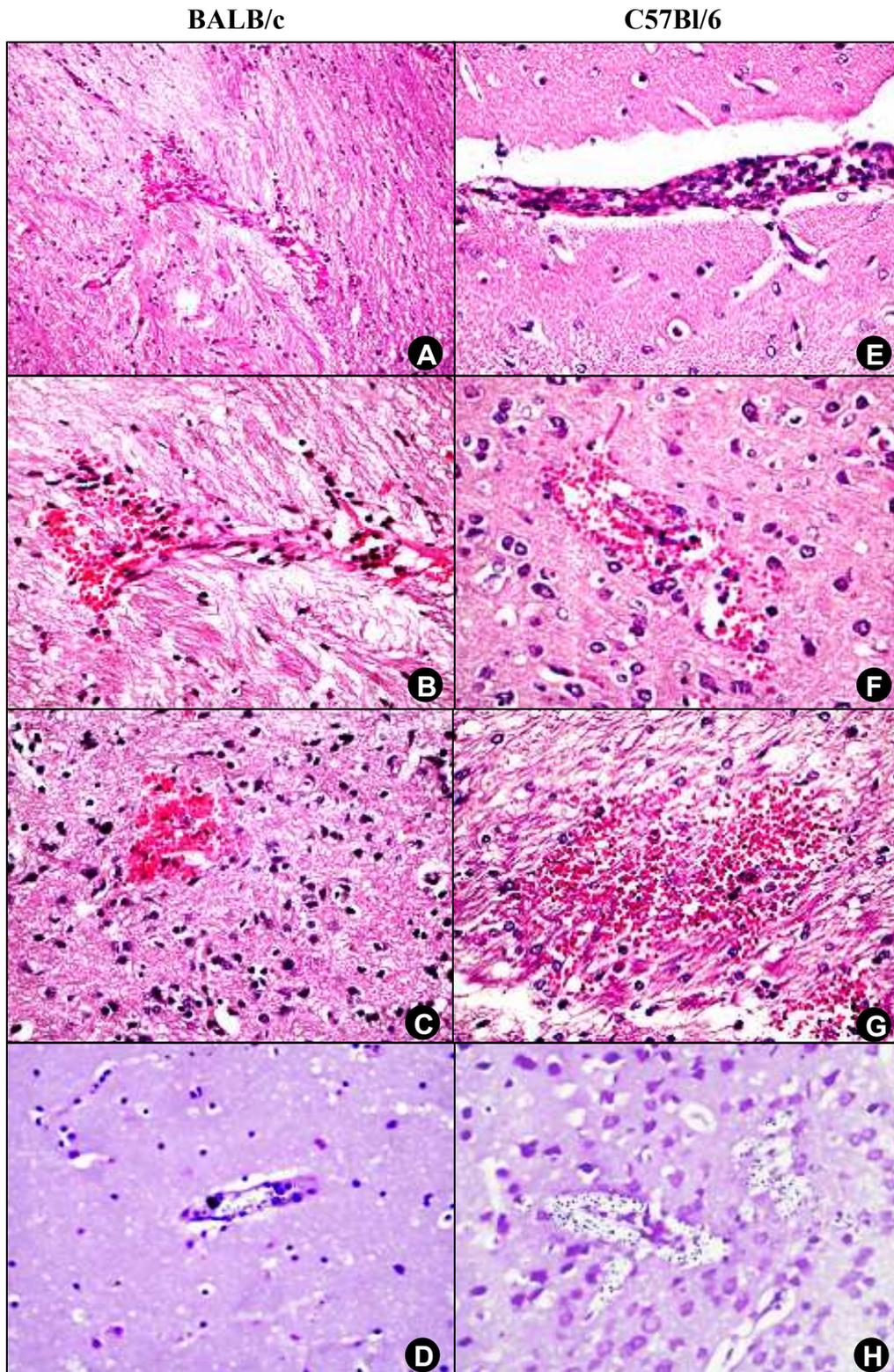


Figura 8- Fotomicrografias do córtex-cerebral de camundongos infectados, eutanaziados no sexto dia de infecção. BALB/c (A-D) e C57Bl/6 (E-H) A- Vaso apresentando acúmulo moderado de hemácias e leucócitos na luz e aderidos ao endotélio; hemorragia moderada, 300X; B- Detalhe da figura anterior, 600X; C- Foco hemorrágico moderado e presença de infiltrado inflamatório moderado e difuso, 600X; E- Intenso acúmulo e adesão de leucócitos e hemácias à parede endotelial, 600X; F e G: Intensos focos hemorrágicos, X600, Hematoxilina Eosina. D e H- Vasos repletos de hemácias; H- Hemorragia, 600X, Cresil violeta.

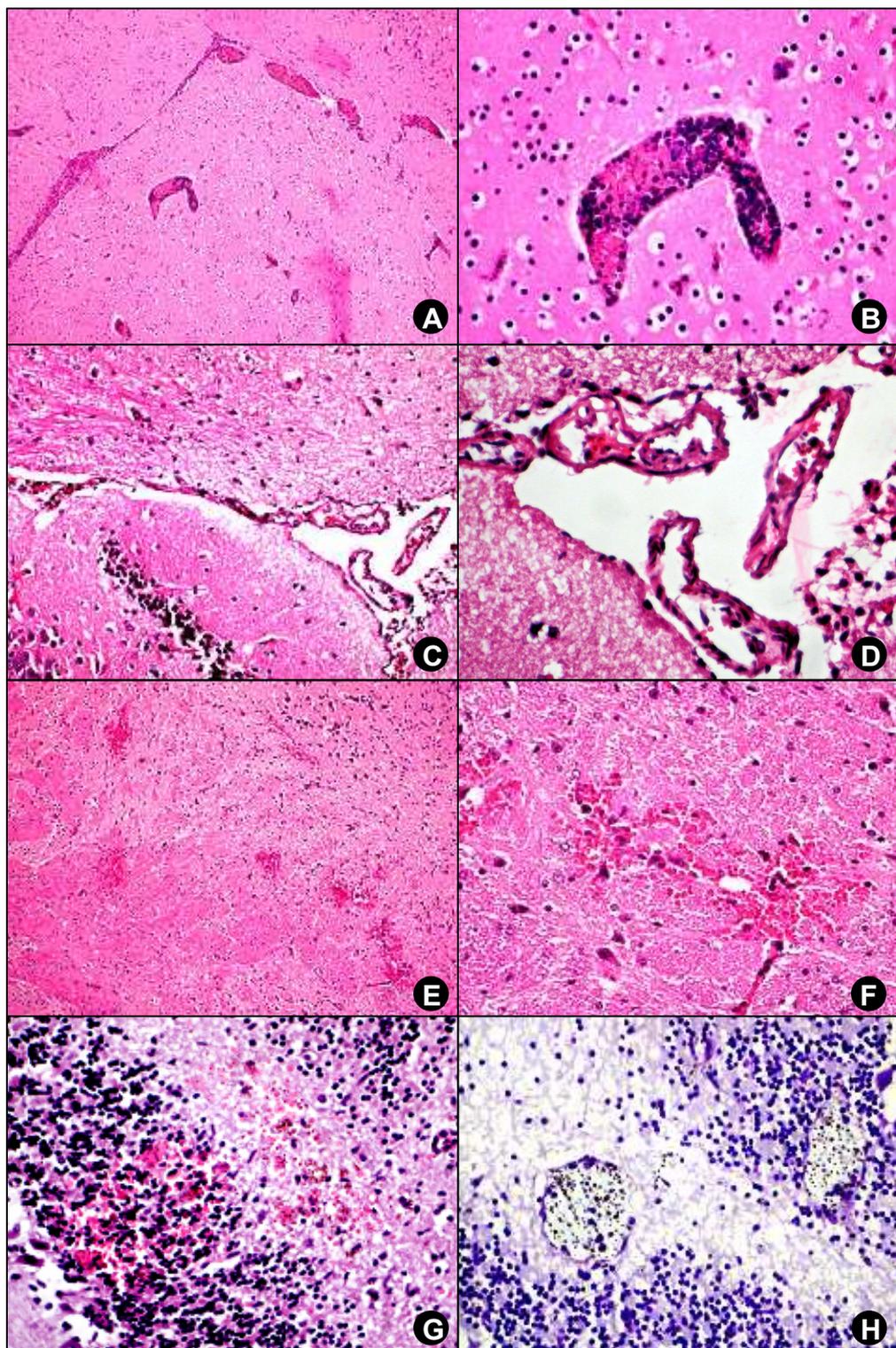


Figura 9 - Fotomicrografias do córtex-cerebral de camundongos BALB/c infectados, eutanaziados no nono dia de infecção. A- Córtex cerebral: inúmeros vasos com intensa quantidade de hemácias e células inflamatórias, com adesão ao endotélio, 100X; B- Detalhe da figura anterior, 600X; C- Grande vaso apresentando hemácias e monócitos acumulados na luz e aderidos ao endotélio com extravasamento de hemácias para o interstício, 300X; D- Detalhe da figura anterior, 600X; E- Presença intensa de focos hemorrágicos, 100X; F- Detalhe da figura anterior, 600X. G e H- Cerebelo: hemorragia intensa, 600X. A-G: Hematoxilina Eosina H: Cresil Violeta.

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. A partir dos resultados da histopatologia cerebral, demonstrando alterações morfológicas marcantes no quinto dia pós-infecção, determinou-se esta data para a realização da microscopia intravital nos animais infectados. Animais que foram submetidos à técnica em uma data posterior ao 5º dia de infecção não sobreviveram aos procedimentos, uma vez que estavam muito debilitados. Animais infectados de ambas as linhagens apresentaram aumento nos processos de rolamento e adesão leucocitária no endotélio cerebral, etapas envolvidas no mecanismo de recrutamento de leucócito durante processo inflamatório (Figura 10).

Camundongos BALB/c com cinco dias de infecção apresentaram aumento no processo de rolamento de leucócitos ($11,74 \pm 3,17$ leucócitos rolando/min) em relação aos animais controle da mesma linhagem ($0,51 \pm 0,22$ leucócitos rolando/min). A diferença foi significativa quando comparamos estes grupos (** $p < 0,01$). Os animais C57Bl/6 apresentaram o mesmo perfil, com aumento significativo (** $p < 0,001$) no processo de rolamento no grupo infectado ($25,82 \pm 3,21$ leucócitos rolando/min) em relação aos animais controle ($0,72 \pm 0,12$ leucócitos rolando/min) (Gráfico 4-A).

Ao compararmos o perfil dos eventos de rolamento de leucócitos entre os animais infectados das duas linhagens (BALB/c X C57Bl/6) também encontramos diferença significativa (** $p < 0,01$), com o grupo C57Bl/6 apresentando o maior valor neste parâmetro (Gráfico 4-A).

Nos camundongos BALB/c infectados, o número de leucócitos aderidos no endotélio dos vasos da pia-máter ($37,29 \pm 9,69$ leucócitos aderidos/100 μ m) foi superior ao observado no grupo de animais controle ($1,29 \pm 0,61$ leucócitos aderidos/100 μ m). A diferença foi estatisticamente significativa quando comparamos estes grupos (** $p < 0,01$). Os animais C57Bl/6 apresentaram o mesmo perfil, com aumento significativo (** $p < 0,001$) no número de leucócitos aderidos no endotélio dos vasos da pia-máter do grupo infectado ($18,45 \pm 1,555$ leucócitos aderidos/100 μ m) em relação aos animais controle ($1,18 \pm 0,22$ leucócitos aderidos/100 μ m) (Gráfico 4-B).

Ao avaliarmos o perfil dos eventos de adesão entre os animais infectados das duas linhagens (BALB/c X C57Bl/6) também observamos diferença significativa

($p < 0.001$), sendo os animais Balb/c os que apresentam maior número de adesão (Gráfico 4-B).

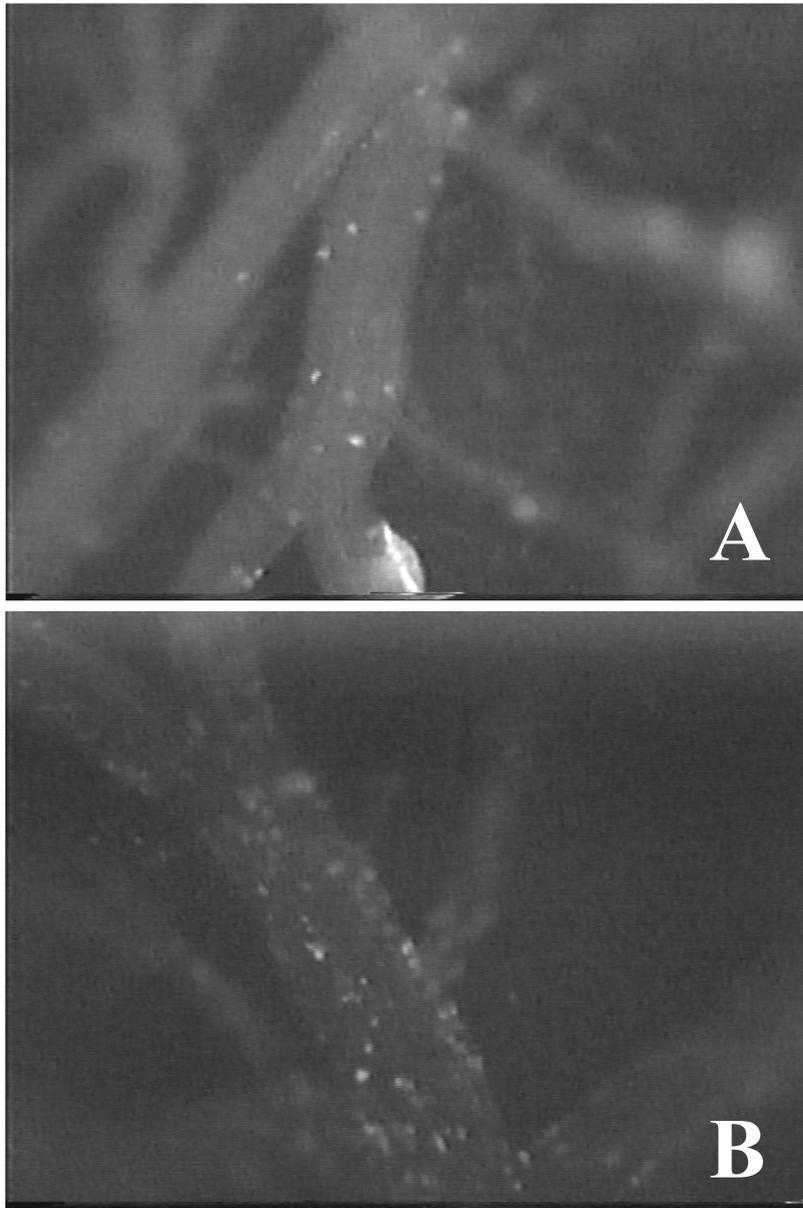


Figura 10 □ Micrografia de videomicroscopia intravital demonstrando o aumento de leucócitos em processo de rolamento e adesão na microvasculatura da pia-máter de camundongos infectados com *P. berghei* NK65 (B) em relação a animais controle (A).

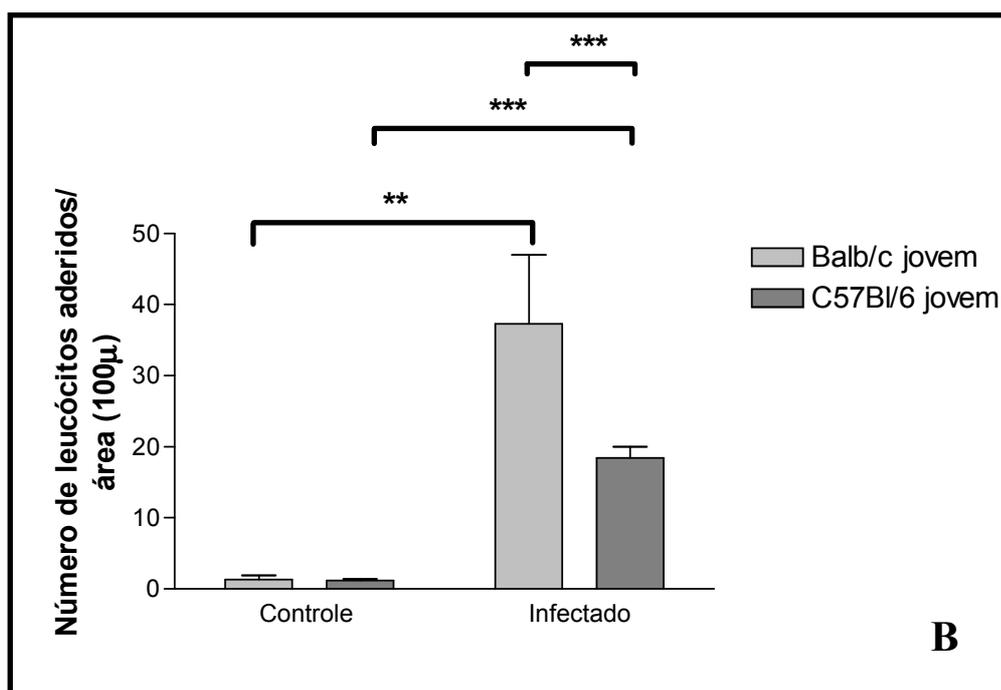
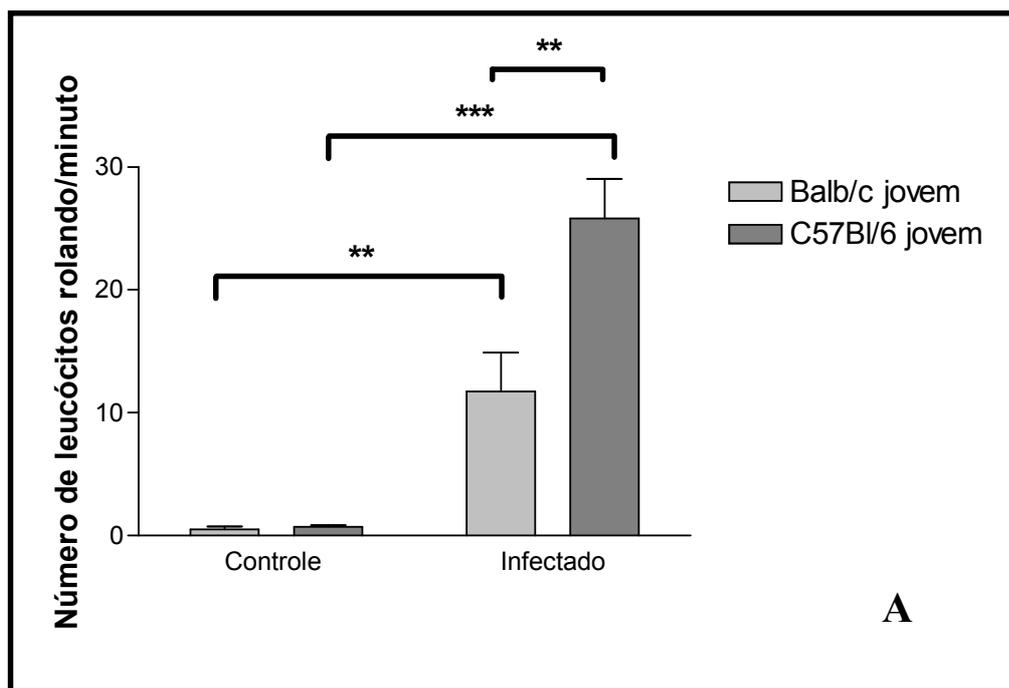


Gráfico 4 □ Número de leucócitos em processo de rolamento (A) e de adesão (B) na microvasculatura da pia-máter de camundongos BALB/c e C57Bl/6. Grupo de animais com cinco dias de infecção (n=7 para cada linhagem), com inóculo padronizado de 10^6 hemácias parasitadas pela via intraperitoneal, em comparação ao grupo controle não-infectado (n=7 para cada linhagem). Os resultados foram submetidos à análise de variância seguida do teste de Newman-Keuls, onde ** (p<0.01) e *** (p<0.001) representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos assinalados.

5.6 □ Contagem total e diferencial de leucócitos

A contagem total de leucócitos no sangue periférico dos diferentes grupos experimentais demonstrou uma diminuição destas células nos animais infectados em relação aos respectivos controles. Animais BALB/c infectados apresentaram uma média inferior de células totais ($5,13 \times 10^6 \pm 7,62 \times 10^5$ leucócitos/mL) em relação a animais controle ($7,71 \times 10^6 \pm 1,06 \times 10^6$ leucócitos/mL), com $p=0,0646$. Tal dado demonstra uma tendência para a diminuição do número de leucócitos no sangue periférico de animais infectados, porém sem diferença significativa. Os animais da linhagem C57Bl/6 apresentaram um perfil diferenciado, com animais infectados apresentando um menor número de leucócitos totais ($2,68 \times 10^6 \pm 3,62 \times 10^5$ leucócitos/mL) em relação ao grupo controle ($6,14 \times 10^6 \pm 8,21 \times 10^5$ leucócitos/mL), com $p < 0,01$ (Gráfico 5).

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaços sangüíneos corados com May-Gruwald e Giemsa, o que permitiu a identificação e quantificação dos diferentes tipos celulares presentes no sangue periférico dos animais infectados e controles. As médias percentuais (Tabela 1) demonstram que animais BALB/c infectados (5dpi) e controles mantiveram o perfil dos tipos celulares. Já os animais infectados da linhagem C57Bl/6 apresentaram uma modificação nas médias percentuais dos tipos celulares, em relação aos animais controle. Houve uma diminuição significativa ($p < 0,001$) na proporção de linfócitos presentes no sangue periférico de animais infectados ($33,9 \pm 4,5\%$) em relação ao grupo controle ($62,4 \pm 2,5\%$). Um perfil semelhante foi obtido para monócitos ($p < 0,001$), com valores de $37,7 \pm 3,7\%$ e $18,6 \pm 1,7\%$ para animais infectados e controle, respectivamente. Já a população percentual de neutrófilos sofreu um incremento significativo ($p < 0,05$) nos animais infectados $28,1 \pm 1,7\%$ em relação ao controle $18,8 \pm 1,7\%$.

Entretanto, a avaliação mais adequada para verificar a alteração da quantidade de determinado tipo celular é realizada através da quantificação do tipo celular/mL. A mudança significativa no perfil de células em animais infectados em comparação aos controles ocorreu apenas na população de linfócitos, com diminuição nos animais infectados. Nos animais BALB/c, houve uma redução de linfócitos, $p < 0,01$, nos animais infectados ($2,06 \times 10^6 \pm 0,31 \times 10^6$ linfócitos/mL) em relação ao grupo controle ($3,95 \times 10^6 \pm 0,94 \times 10^6$ linfócitos/mL). Na linhagem C57Bl/6, o perfil foi semelhante, com $p < 0,001$ (Tabela 2).

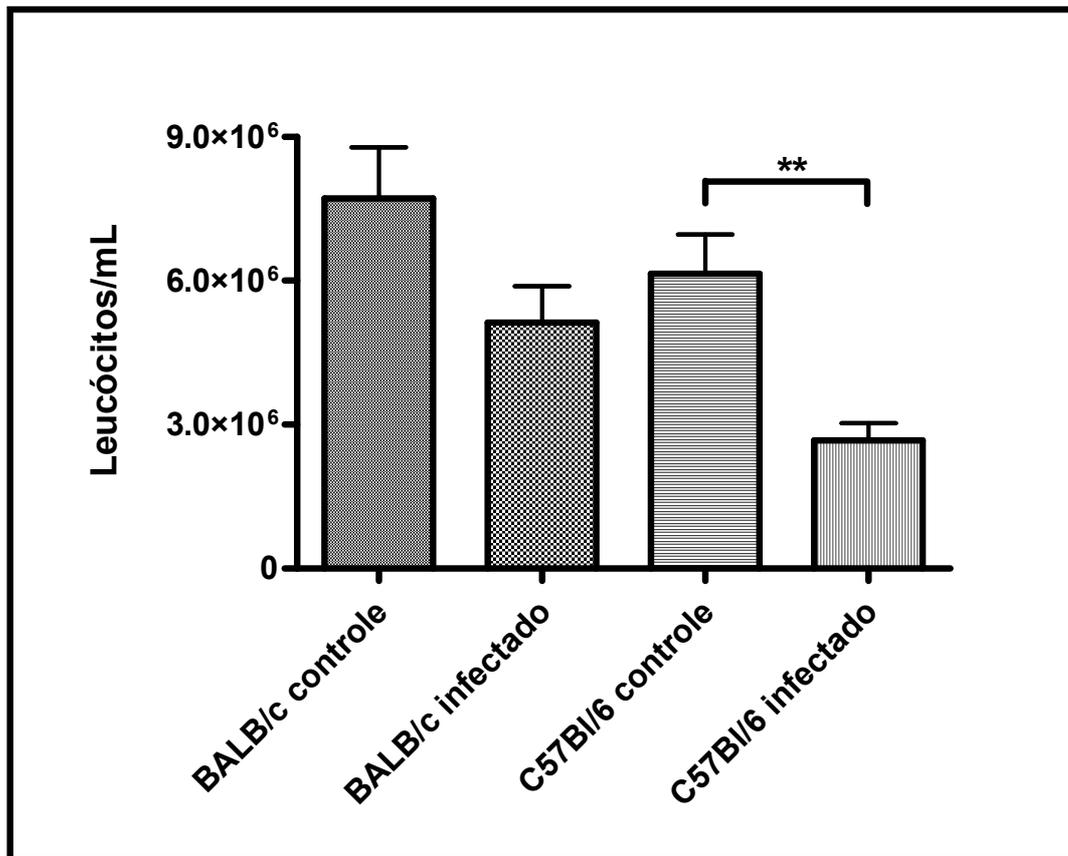


Gráfico 5 □ Número total de leucócitos no sangue periférico de camundongos BALB/c e C57Bl/6. Animais com cinco dias de infecção (n=8 para ambas as linhagens), inóculo padronizado de 10⁶ hemácias parasitadas pela via intraperitoneal, em relação ao grupo controle não-infectado (n=7 para ambas as linhagens). Os resultados de cada linhagem foram submetidos ao teste *t*-student, onde ** (p<0.01) representa diferença significativa.

Tabela 1. Número percentual dos tipos celulares presentes no sangue periférico de camundongos BALB/c e C57Bl/6 (%).

Grupos	Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos	Eosinófilos
BALB/c controle	40,0 ± 3,7	37,9 ± 3,1	22,1 ± 2,7	0,0 ± 0,0
BALB/c infectado	40,6 ± 2,2	43,2 ± 3,7	15,6 ± 2,1	0,4 ± 0,3
C57Bl/6 controle	62,4 ± 2,5	19,9 ± 2,5	18,6 ± 1,7	0,6 ± 0,3
C57Bl/6 infectado	33,9 ± 4,5 ^a	28,1 ± 1,7 ^b	37,7 ± 3,7 ^a	0,2 ± 0,2

Número percentual de leucócitos no sangue periférico de camundongos BALB/c e C57Bl/6. Animais infectados (n=8 para ambas as linhagens), cinco dias pós-infecção, com *Plasmodium berghei* NK65, com inóculo padronizado de 10⁶ hemácias parasitadas pela via intraperitoneal, em relação aos controles não-infectados (n=7 para ambas as linhagens). Os resultados de cada tipo celular foram submetidos ao teste *t*-student, onde ^a p<0,001 e ^b p<0,05 quando comparados com o grupo C57Bl/6 controle.

Tabela 2. Quantificação diferencial dos tipos celulares presentes no sangue periférico de camundongos BALB/c e C57Bl/6 (x 10⁶ células/mL).

Grupos	Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos	Eosinófilos
BALB/c controle	3,95 ± 0,94	2,98 ± 0,41	1,03 ± 0,20	0,00 ± 0,00
BALB/c infectado	2,06 ± 0,31 ^a	2,18 ± 0,36	0,85 ± 0,22	0,02 ± 0,01
C57Bl/6 controle	3,73 ± 0,62	1,09 ± 0,20	1,15 ± 0,20	0,03 ± 0,02
C57Bl/6 infectado	0,88 ± 0,17 ^b	0,74 ± 0,10	1,05 ± 0,21	0,00 ± 0,00

Número diferencial de leucócitos no sangue periférico de camundongos BALB/c e C57Bl/6. Animais infectados (n=8 para ambas as linhagens), cinco dias pós-infecção, com *Plasmodium berghei* NK65, com inóculo padronizado de 10⁶ hemácias parasitadas pela via intraperitoneal, em relação aos controles não-infectados (n=7 para ambas as linhagens). Os resultados de cada tipo celular foram submetidos ao teste *t*-student, onde ^a p<0,01 quando comparado com BALB/c controle e ^b p<0,001 quando comparado com C57Bl/6 controle.

5.7 - Avaliação da permeabilidade vascular

Através da quantificação do extravasamento do corante de azul de Evans para o parênquima cerebral pode-se avaliar indiretamente a permeabilidade da BHE. Através da determinação espectrofotométrica da quantidade de azul de Evans presente no tecido cerebral, verificou-se um aumento significativo da concentração do corante no parênquima cerebral de animais infectados (5dpi) em relação ao grupo controle, para ambas as linhagens. Desta forma, há indícios de modificações na permeabilidade da BHE em decorrência da infecção.

Animais infectados da linhagem BALB/c apresentaram uma concentração superior do corante no parênquima cerebral ($9,65 \pm 1,08$ pg de azul de Evans/100mg de tecido cerebral), quando comparados com o grupo controle ($6,40 \pm 0,38$ pg de azul de Evans/100mg de tecido cerebral), com $p < 0,05$ (Gráfico 6).

Camundongos C57Bl/6 não-infectados apresentaram uma concentração menor de azul de Evans no tecido cerebral ($4,28 \pm 0,67$ pg de azul de Evans/100mg de tecido cerebral) em relação ao grupo dos animais infectados ($9,26 \pm 1,23$ pg de azul de Evans/100mg de tecido cerebral), com $p < 0,01$ (Gráfico 6).

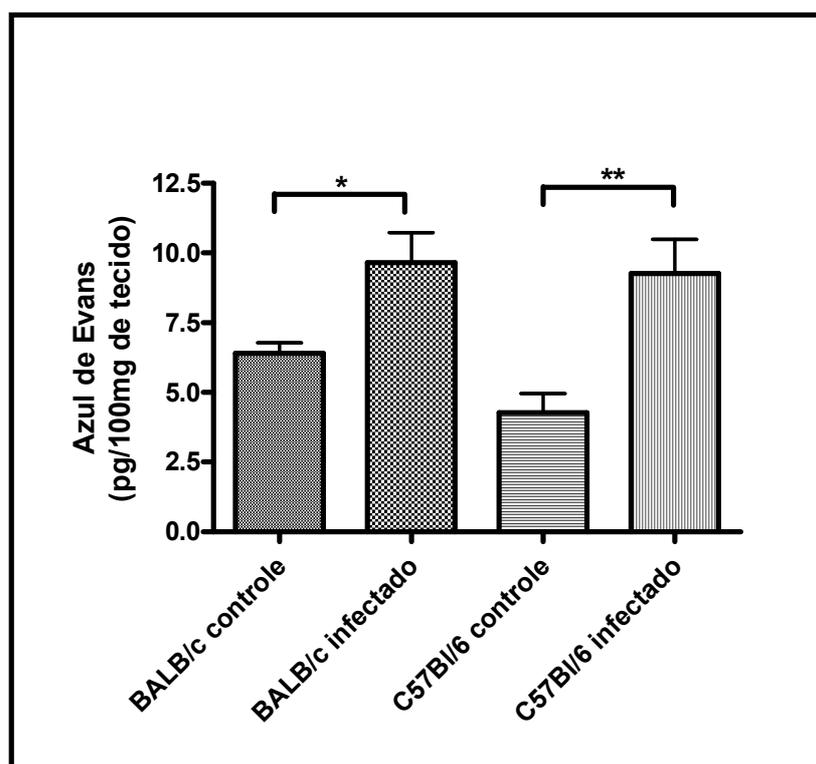


Gráfico 6 - Concentração do corante azul de Evans extravasado para o parênquima cerebral de camundongos BALB/c e C57Bl/6. Animais com cinco dias de infecção (n=6 para ambas as linhagens), inóculo padronizado de 10^6 hemácias parasitadas pela via intraperitoneal, em relação ao grupo controle não-infectado (n=6 para ambas as linhagens). Os resultados de cada linhagem foram submetidos ao teste *t*-student, onde * (p<0,05) e ** (p<0.01) representam diferenças significativas.

5.8 - Dosagem das citocinas TNF- α e IFN- γ e das quimiocinas Kc/CXCL8, MIG/CXCL9, MIP-1 α /CCL3, MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5.

Considerando que houve um aumento no recrutamento de leucócitos na microcirculação cerebral após a infecção com *P. berghei* NK65, foi realizada a quantificação, *in locu*, de citocinas e quimiocinas no tecido cerebral de animais controle e infectados. Adicionalmente, a concentração de TNF- α foi mensurada também no soro dos animais para avaliar uma possível participação sistêmica desta citocina na patogênese da infecção.

Portanto, avaliamos as concentrações das citocinas TNF- α e IFN- γ e quimiocinas Kc/CXCL8, MIG/CXCL9, MIP-1 α /CCL3, MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5 em sobrenadante de homogenato de cérebro e soro de camundongos infectados (n=10) com *P. berghei* NK65 e animais controle sem infecção (n=8) das diferentes linhagens.

A concentração de TNF- α no homogenato de cérebro apresentou aumentada nos animais BALB/c infectados ($63,25 \pm 4,53$ pg/mL) em relação ao seu controle ($48,64 \pm 5,15$ pg/mL), porém sem nível de significância. Em contrapartida, um perfil distinto foi encontrado nos animais da linhagem C57Bl/6, onde animais infectados ($63,38 \pm 5,43$ pg/mL) apresentaram uma concentração maior que os animais controles ($41,65 \pm 3,41$ pg/mL), com $p < 0,01$ (Gráfico 7-A).

A quantificação desta citocina no soro dos animais demonstrou um aumento significativo da sua concentração nos animais infectados em relação a animais controle. Em animais da linhagem BALB/c, a concentração foi de $15,23 \pm 8,09$ pg/mL nos controles e $108,2 \pm 31,16$ pg/mL em animais infectados ($p < 0.001$). Em animais C57Bl/6 do grupo controle e infectado, as concentrações foram, respectivamente, $0,0 \pm 0,0$ pg/mL e $43,99 \pm 5,72$ pg/mL, com $p < 0.001$ (Gráfico 7-B).

A concentração da citocina IFN- γ em homogenato de cérebro não apresentou diferença estatística entre animais infectados ($131,5 \pm 8,6$ pg/mL) e controle ($145,0 \pm 5,64$ pg/mL) da linhagem BALB/c. Contudo, animais da linhagem C57Bl/6 apresentaram aumento da concentração no grupo infectado ($169,1 \pm 10,69$ pg/mL) em relação ao controle ($134,9 \pm 4,77$ pg/mL), com $p < 0,05$ (Gráfico 8-A).

O nível da quimiocina Kc/CXCL8 no cérebro não sofreu variação após a infecção. Camundongos BALB/c não-infectados apresentaram a concentração desta quimiocina de $237,9 \pm 31,00$ pg/mL enquanto no grupo infectado foi de $310,2 \pm 30,49$ pg/mL, com

$p > 0.05$. Animais controles da linhagem C57Bl/6 apresentaram uma concentração de $265,7 \pm 35,34$ pg/mL e os animais infectados $340,0 \pm 31,57$ pg/mL, com $p > 0,05$ (Gráfico 8-B).

A concentração da quimiocina MIG/CXCL9 sofreu variação significativa no tecido cerebral após a infecção. Camundongos BALB/c não-infectados apresentaram a concentração desta quimiocina de $66,24 \pm 10,11$ pg/mL enquanto no grupo infectado foi de $352,1 \pm 60,25$ pg/mL ($p < 0,001$). Animais controles da linhagem C57Bl/6 apresentaram uma concentração de $63,71 \pm 9,06$ pg/mL e os animais infectados $169,2 \pm 16,19$ pg/mL, com $p < 0,001$ (Gráfico 8-C).

Após a infecção com *P. berghei* NK65, houve um aumento não-significativo da quimiocina MIP-1 α /CCL3 no cérebro de camundongos BALB/c ($13,39 \pm 4,39$ pg/mL) em relação aos animais não infectados (0 ± 0 pg/mL), com $p > 0.05$. Já nos camundongos C57Bl/6, a concentração desta quimiocina em condição controle foi $30,1 \pm 7,16$ pg/mL e em animais infectados foi $45,08 \pm 12,31$ pg/mL, com $p < 0,05$ (Gráfico 8-D).

Ao avaliarmos a quimiocina MCP-1/CCL2 em camundongos BALB/c, houve um aumento significativo ($p < 0.001$) na produção desta quimiocina. No grupo controle a concentração foi de $295,3 \pm 29,53$ pg/mL e no grupo infectado uma concentração de $900,5 \pm 111,6$ pg/mL. Da mesma forma, nos camundongos C57Bl/6, encontramos uma diferença significativa ($p < 0,001$) entre os animais controle ($267,6 \pm 25,33$ pg/mL) e os animais infectados ($1023 \pm 101,7$ pg/mL) (Gráfico 8-E).

Adicionalmente, observamos um aumento da concentração da quimiocina RANTES/CCL5 no tecido cerebral de camundongos BALB/c infectados ($310,8 \pm 85,66$ pg/mL) quando comparamos com o grupo controle ($154,3 \pm 25,54$ pg/mL), entretanto este aumento não foi significativo ($p > 0.05$). Camundongos C57Bl/6 infectados apresentaram um aumento significativo da concentração desta quimiocina ($232,0 \pm 37,93$ pg/mL) quando comparado com os animais controle ($27,24 \pm 6,64$ pg/mL), com $p < 0,001$ (Gráfico 8-F).

Houve, portanto, um aumento significativo dos níveis das citocinas TNF- α e IFN- γ e das quimiocinas MIG/CXCL9, MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5 nos animais C57Bl/6 infectados, com relação aos respectivos controles. Enquanto o aumento das concentrações na linhagem BALB/c foi significativo apenas para o TNF- α sistêmico e para as quimiocinas MIG/CXCL9 e MCP-1/CCL2.

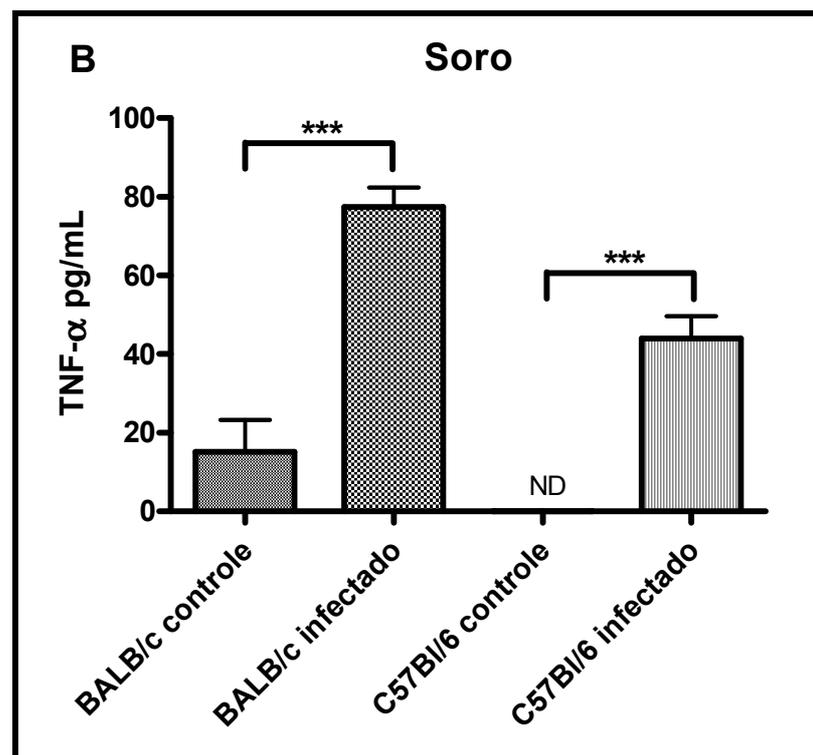
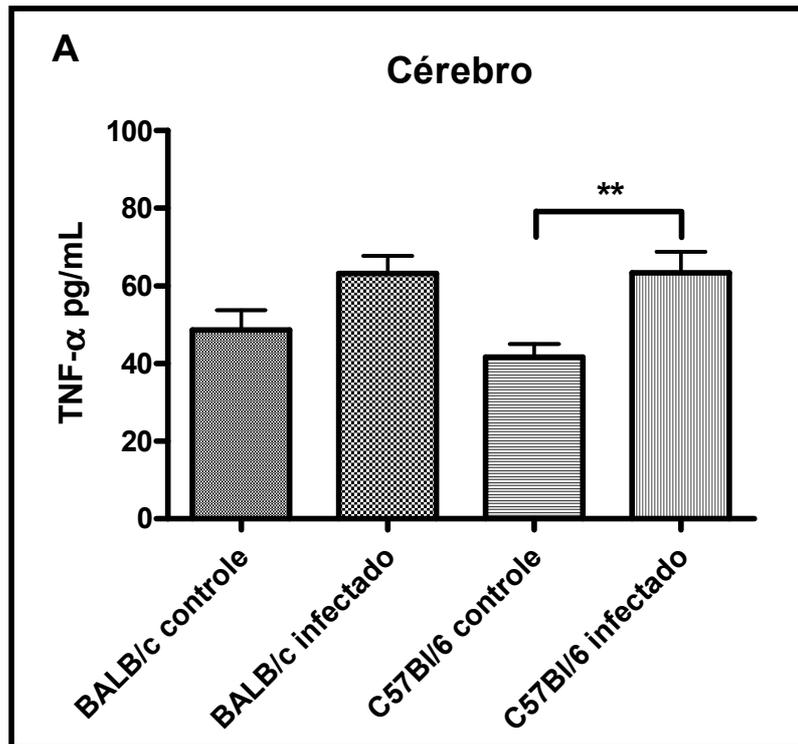


Gráfico 7 - Níveis da concentração da citocina TNF- α em sobrenadante de homogenato de cérebro (A) e em soro (B) de camundongos BALB/c e C57Bl/6. Animais com cinco dias de infecção (n=10 para ambas as linhagens), inóculo padronizado de 10^6 hemácias parasitadas pela via intraperitoneal, em relação ao grupo controle não-infectado (n=8 para ambas as linhagens). Os resultados de cada linhagem foram submetidos ao teste *t*-student, onde ** (p<0.01) e *** (p<0.001) representam diferenças significativas. ND- não detectado.

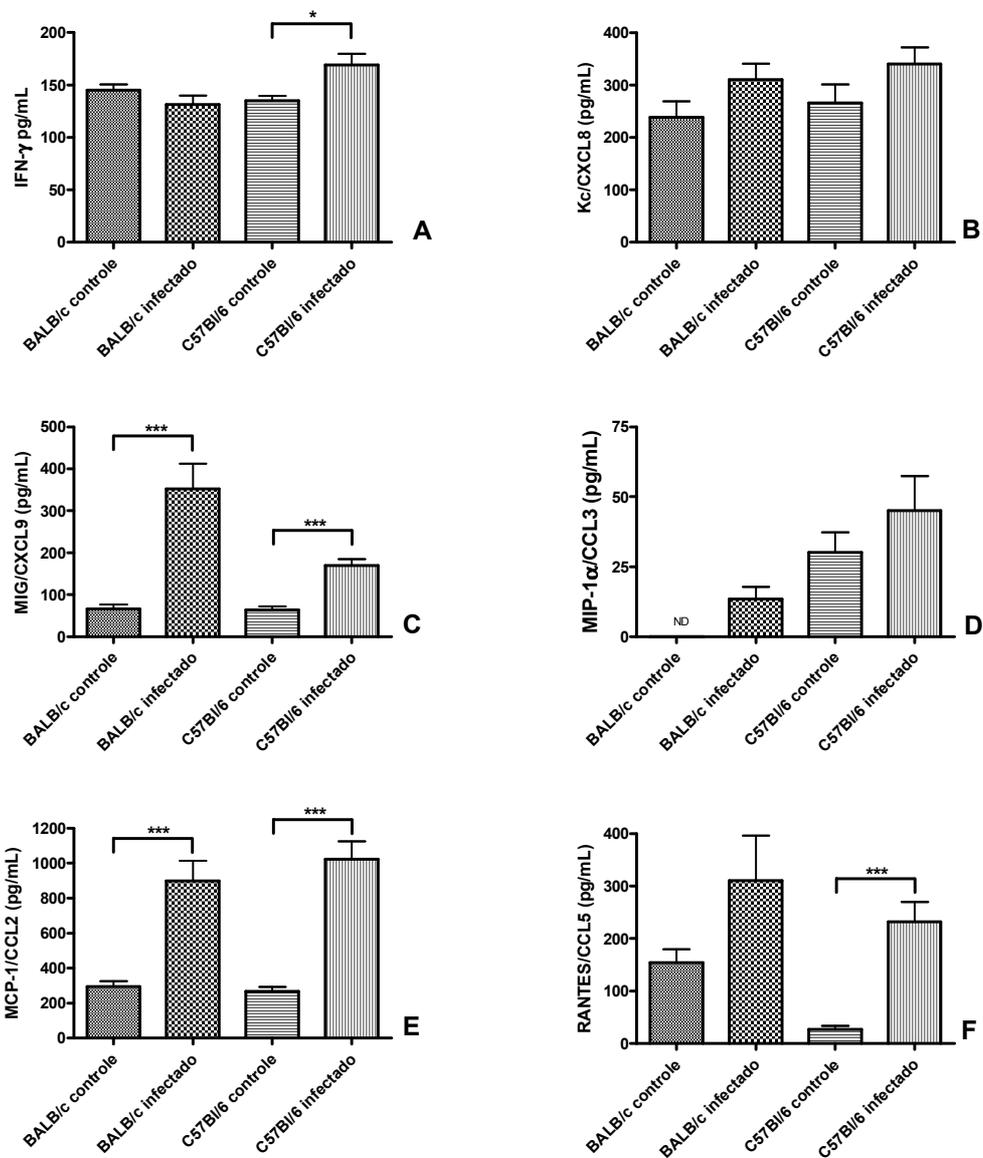


Gráfico 8 - Níveis da concentração da citocina IFN- γ (A) e das quimiocinas Kc/CXCL8 (B), MIG/CXCL9 (C), MIP-1 α /CCL3 (D), MCP-1/CCL2 (E) e RANTES/CCL5 (F) em sobrenadante de homogenato de cérebro de camundongos BALB/c e C57Bl/6. Animais com cinco dias de infecção (n=10 para ambas as linhagens), inóculo padronizado de 10^6 hemácias parasitadas pela via intraperitoneal, em relação ao grupo controle não-infectado (n=8 para ambas as linhagens). Os resultados de cada linhagem foram submetidos ao teste *t*-student, onde * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) e *** ($p < 0.001$) representam diferenças significativas. ND- não detectado.

6 - Discussão

Parâmetros parasitológicos e clínicos da infecção em camundongos BALB/c e C57Bl/6 jovens

Este estudo permitiu caracterizar, através de parâmetros parasitológicos e imunológicos, a infecção por *P. berghei* NK65 e avaliar aspectos envolvidos na patogênese do modelo de MC experimental em duas linhagens, BALB/c e C57Bl/6, descritas na literatura com perfis distintos de resistência e susceptibilidade para a cepa de *P. berghei* ANKA.

Ambas as linhagens apresentaram uma evolução gradual e progressiva da parasitemia. Porém, os animais C57Bl/6 desenvolveram uma parasitemia de forma mais branda, quando comparada com os animais BALB/c, com diferença significativa no sexto dia pós-infecção. Em contrapartida, aquela linhagem apresentou mortalidade precoce. Desta forma, a taxa de parasitemia e a sobrevivência não podem ser explicadas por uma relação direta. Portanto, diante destes dados, podemos sugerir que *P. berghei* NK65 causa uma infecção de curso agudo e letal mais pronunciado na linhagem C57Bl/6, considerada susceptível pela literatura.

Os animais infectados das duas linhagens apresentaram perda de peso acentuada ao longo da infecção, sendo compatível com as altas parasitemias e o óbito dos animais. Animais com parasitemia acentuada apresentaram uma tendência para deformidades estruturais dos eritrócitos. Sabe-se que o parasito é capaz de induzir inúmeras alterações no eritrócito parasitado, evidentes principalmente na membrana celular. Alterações em proteínas de membrana, como a calmodulina e ATPase, são descritas e acarretam em modificações no equilíbrio iônico da célula (Kirk, 2001).

Diferentes formas evolutivas do *P. berghei* NK65 foram observadas nos esfregaços sangüíneos analisados durante o curso da infecção. Desta forma, podemos sugerir uma multiplicação assincrônica das diferentes formas de desenvolvimento sangüíneo do parasito. Infecções múltiplas de eritrócitos, com poliparasitismo extensivo, também foram identificadas, um fato que pode ser decorrente da baixa especificidade de invasão das hemácias pelos merozoítos desta espécie.

Sabe-se que o baço exerce um papel crucial na eliminação do parasito da circulação (ALVES *et al.*, 1996). A hepatoesplenomegalia verificada durante a necropsia pode ser sugestiva para o quadro de retenção destas formas nestes órgãos. Os animais de ambas as linhagens também apresentaram hemoglobinúria a partir do sexto dia de

infecção, sugerindo uma hemólise intravascular excessiva e intensa em conjunto com o comprometimento renal nestes animais.

Cabe ressaltar que componentes do parasito, liberados após a ruptura dos eritrócitos infectados, são potencialmente envolvidos na produção de resposta inflamatória, como o glicosilfosfatidilinositol (GPI). A GPI é uma molécula ubíqua e expressa em abundância em parasitos, sendo envolvida primariamente no ancoramento de certas proteínas de superfície celular. Esta molécula, em sinergismo com o IFN- γ , é capaz de induzir a liberação de citocinas (TNF- α e IL-1) envolvidas no desenvolvimento da resposta imune pelo hospedeiro (SCHOFIELD & HACKETT, 1993).

O processo de anorexia verificado nos animais, através da ausência de conteúdo estomacal e intestinal, pode ser conseqüência da produção prolongada e sistêmica de TNF- α , capaz de gerar graves distúrbios metabólicos (GRIMBLE, 1998; TRUJILLO *et al.*, 2003). A caquexia, que leva à supressão do apetite, é caracterizada pelos eventos de anorexia, perda de peso e depleção das reservas protéicas e lipídicas (MATTHYS & BILLIAU, 1997). O envolvimento de TNF- α nesta síndrome tem sido amplamente estudado, inclusive em outros modelos animais de doenças parasitárias. Animais BALB/c infectados por *Trypanosoma cruzi* desenvolvem os processos de caquexia durante a fase aguda da infecção, um quadro que pode ser revertido após tratamento com anticorpo monoclonal anti-TNF- α (TRUYENS *et al.*, 1995). Os sinais da manifestação e a conseqüente perda de massa corporal verificados nos animais infectados por *P. berghei* NK65 guardam relação direta com as altas taxas de parasitemia e aumento sistêmico da concentração de TNF- α , em ambas as linhagens, dado constatado no quinto dia pós-infecção.

A falta de sinais clínicos evidentes para avaliar de forma precisa os sintomas clássicos do comprometimento cerebral (coma e paralisia), dificultou a investigação desta manifestação nos animais estudados.

Sabe-se que a infecção por *P. berghei* exibe uma resposta imune marcante, com os animais apresentando manifestações clínicas sistêmicas. Tal dado somado aos resultados obtidos neste trabalho sugere que a infecção por *P. berghei* NK65 também causa uma doença com acometimento multi-sistêmico nos animais das linhagens estudadas.

Alterações histopatológicas

É sabido que a malária é uma doença sistêmica, com acometimento em vários órgãos. Desta forma, o comprometimento cerebral pode ser extenso, caracterizado por edema cerebral, hemorragias cerebrais e infiltrado de leucócitos.

Através da análise histopatológica, demonstrou-se que animais C57Bl/6, no terceiro dia pós-infecção, apresentaram alterações cerebrais precoces em relação aos animais da linhagem BALB/c. No sexto dia pós-infecção, as alterações histopatológicas foram mais acentuadas nos animais C57Bl/6 em relação à outra linhagem. Em contrapartida, a análise histológica em animais BALB/c no nono dia pós-infecção revelou um quadro histológico semelhante àquele descrito para C57Bl/6 no sexto dia. Assim, podemos verificar que o desenvolvimento de lesões cerebrais em decorrência da infecção foi mais intenso e precoce em camundongos da linhagem C57Bl/6 em relação à linhagem BALB/c. Tal fato pode estar relacionado a morte precoce naquela linhagem e comprova uma resposta diferencial das linhagem do hospedeiro frente a infecção por *P. berghei* NK65. Este resultado corrobora os dados encontrados por Amani *et al.*, (1998), que sugeriram que diferentes linhagens do hospedeiro apresentavam relevância para o desenvolvimento de MC, da mesma forma que diferenças entre parasitos parecem ter igual importância na determinação da virulência.

As análises histopatológicas de cérebros de camundongos infectados revelaram, a partir do terceiro dia de infecção, alterações semelhantes às descritas na MC que refletem as perturbações locais induzidas pela infecção. Desta forma, não podemos descartar o envolvimento cerebral nestes animais, em conjunto com outras repercussões acarretadas pela infecção.

Um estudo utilizando a cepa NK65 de *P. berghei* demonstrou que a infecção com a forma sangüínea do parasito em camundongos C57Bl/6 causa infiltrado de células mononucleares no fígado e, conseqüentemente, dano hepático maciço (YOSHIMOTO *et al.*, 1998). No nosso estudo, através da análise histopatológica do tecido hepático, foi encontrado um perfil de lesão nas duas linhagens (dados não mostrados), que pode ser um dos fatores diretamente envolvidos na patogênese da manifestação grave que acometeu os animais. Entretanto, não foi objetivo deste trabalho avaliar o envolvimento hepático neste modelo.

Avaliação da resposta inflamatória cerebral através da técnica de microscopia intravital

Sob condições normais, os leucócitos são mantidos no centro dos vasos sanguíneos. Durante a resposta inflamatória, a indução de moléculas de adesão nas células endoteliais, bem como na superfície dos leucócitos, favorece o deslocamento destes para a periferia dos vasos e, conseqüentemente, a interação com o endotélio e extravasamento vascular. Na malária, as moléculas de adesão estão envolvidas no seqüestro das células dentro da microcirculação cerebral e em outros órgãos. Além de ICAM-1, outras moléculas de adesão, como P-seletina (UDOMSANGPECH *et al.*, 1997), VCAM-1 (JACKOBSEN *et al.*, 1994) e PECAM-1 (TREUTIGER *et al.*, 1997), parecem estar implicadas no mecanismo de adesão do eritrócito parasitado ao endotélio. Além de apresentarem um papel importante no mecanismo de interação eritrócito-endotélio, as moléculas de adesão estão envolvidas nas interações leucócito-endotélio (CHANG *et al.*, 2003) e plaqueta-endotélio (SUN *et al.*, 2003), as quais já foram descritas em modelos experimentais de malária grave. Uma característica importante de se salientar é a analogia entre seqüestro de eritrócitos parasitados e recrutamento de leucócitos. Já foi demonstrado que a ligação de eritrócitos não é unicamente estática, uma vez que pode acontecer uma interação semelhante ao processo de rolamento (COOKE *et al.*, 1994).

No presente estudo, através da técnica de microscopia intravital nos vasos da pia-máter, foram verificadas as interações leucócitos-endotélio durante o processo de recrutamento. O potencial aumento do recrutamento basal induzido pela manipulação cirúrgica foi considerado, o que justifica o uso de animais sem infecção que são submetidos a todos os procedimentos da técnica e utilizados como controle.

Foi verificado nas duas linhagens, através do uso desta técnica, um aumento significativo no número de leucócitos em processo de rolamento e adesão nos animais infectados (5dpi) em relação a animais controles não-infectados. Estes resultados foram corroborados com os dados da análise histopatológica, demonstrando um aumento do influxo de leucócitos para o parênquima cerebral e lesão inflamatória dos animais infectados quando comparados com o grupo controle. Uma importante limitação da técnica é a incapacidade de distinguir as subpopulações de leucócitos recrutados (neutrófilos, eosinófilos, monócitos, linfócitos T), o que deve ser realizado por metodologias complementares (LEY, 2001). Através da análise histopatológica realizada no tecido cerebral de animais infectados, verificou-se um acúmulo de linfócitos no

parênquima cerebral de animais C57Bl/6 infectados, como demonstrado na Figura 7-D. Desta forma, a diminuição deste tipo celular no sangue periférico de ambas as linhagens, detectada através de esfregaço sangüíneo no quinto dia pós-infecção, pode ser consequência direta do recrutamento predominante de linfócitos para o parênquima cerebral e de outros órgãos, como fígado e baço (dados não mostrados).

Para a técnica de microscopia intravital, as características do tecido avaliado apresentam relevância e devem ser consideradas. A investigação do recrutamento de leucócitos por microscopia intravital em tecidos translúcidos, como mesentério e fásia espermática, permite que as etapas de rolamento, adesão e transmigração possam ser visualizadas sem a utilização de métodos de contraste. Entretanto, para órgãos não translúcidos, como o tecido cerebral, o estudo é viável somente com a utilização da epifluorescência, e permite a visualização dos processos de rolamento e adesão (LEY, 2001). Visto que a adesão é uma etapa essencial para que ocorra a transmigração através do endotélio para o sítio de inflamação (KERFOOT & KUBES, 2002), o aumento da adesão leucocitária observado pela microscopia intravital está diretamente associado ao infiltrado inflamatório identificado nos animais infectados por técnicas histológicas.

Os resultados da microscopia intravital demonstraram uma diferença numérica não proporcional entre os eventos de rolamento e adesão de leucócitos, quando se analisa cada linhagem. Camundongos infectados da linhagem BALB/c apresentaram menor número de células rolando ($11,74 \pm 3,166$ células rolando/min) em relação ao número de células aderidas ($37,29 \pm 9,690$ células aderidas/100 μ m). Um perfil oposto foi verificado nos animais C57Bl/6 infectados, com predomínio de células em processo de rolamento ($25,82 \pm 3,212$ células rolando/min) em relação ao número de células aderidas ($18,45 \pm 1,555$ células aderidas/100 μ m). Entretanto, sabe-se que os processos de rolamento e adesão são dois eventos moleculares distintos, onde o rolamento não é um pré-requisito obrigatório para a adesão. A importância do rolamento na microcirculação cerebral não foi totalmente esclarecida. Estudos demonstraram que um rolamento transiente pode acarretar em adesão rápida de leucócitos, em um processo facilitado por plaquetas ligadas a microcirculação, que também expressam P-seletina. Assim, na microcirculação cerebral, os leucócitos podem interagir preferencialmente nas plaquetas do que diretamente no endotélio cerebral (CARVALHO-TAVARES *et al.*, 2000). Desta forma, parâmetros fisiológicos, como interação de leucócitos a outros

elementos sangüíneos e propriedades do endotélio, modulam e determinam o sucesso do recrutamento (LEY, 2001).

Adicionalmente, o acúmulo de leucócitos e plaquetas na microcirculação cerebral tem papel direto na patogênese da MC, sendo capaz de amplificar os processos inflamatórios. Estudos demonstram que plaquetas podem estar diretamente envolvidas na citoaderência de eritrócitos parasitados, uma vez que podem atuar como ponte entre as células endoteliais e o eritrócito, em um mecanismo alternativo. Entretanto, este modelo proposto não exclui o já existente □o de adesão direta do eritrócito ao endotélio (WASSMER *et al.*, 2004). A adesão de plaquetas a células endoteliais é estimulada por TNF- α , durante uma condição inflamatória (LOU *et al.*, 1997). Estudos *postmortem* em crianças africanas com MC têm demonstrado acúmulo de plaquetas no sítio de seqüestro de eritrócitos parasitados (GRAU *et al.*, 2003).

A adesão de eritrócitos parasitados, leucócitos e plaquetas podem resultar na disfunção da BHE, com efeitos deletérios sobre a integridade do endotélio (WASSMER *et al.*, 2006). Já foi reportado que neutrófilos e plaquetas podem acumular no tecido e/ou são capazes de produzir moléculas citolíticas, como metaloproteinases, que podem lesar as células endoteliais (CHEN *et al.*, 2000; GRAU *et al.*, 2003). A liberação de micropartículas por plaquetas pode alterar o metabolismo das células do endotélio, induzindo a produção de ciclooxigenase-2 (COX-2) e prostaglandinas (PG), que podem afetar a permeabilidade vascular e induzir apoptose de células endoteliais (BALLABH *et al.*, 2004).

Alteração na permeabilidade vascular da BHE

Durante condições inflamatórias, vários mediadores químicos liberados, como a bradicinina, a ciclooxigenase-2 (COX-2) e prostaglandinas (PG), induzem o aumento da permeabilidade da barreira, facilitando o acesso de leucócitos ativados para o parênquima do SNC (BALLABH *et al.*, 2004). O aumento do tráfego de leucócitos para o parênquima cerebral, comprovado por estudos de microscopia intravital e histologia, sugere possíveis alterações na permeabilidade da BHE. Vários estudos têm demonstrado que a BHE é comprometida durante a infecção por *P. berghei* ANKA (PIGUET *et al.*, 2000; THUMWOOD *et al.*, 1988). Estudos utilizando o extravasamento de corantes para o parênquima cerebral têm demonstrado que a permeabilidade vascular é marcadamente aumentada no cérebro, sendo um importante evento para a patogênese da malária (VAN

DE HEYDE *et al.*, 2001). Neill & Hunt (1992), em um estudo utilizando camundongos CBA infectados com *P. berghei* ANKA, reportaram o aumento do extravasamento do corante azul de Monastral em todos os órgãos analisados (cérebro, pulmão, fígado, baço e rim). Desta forma, para comprovar a hipótese de aumento da permeabilidade vascular da BHE neste modelo, utilizou-se um protocolo de permeabilidade da BHE através da determinação espectrofotométrica do corante azul de Evans extravasado da vasculatura para o tecido cerebral.

O azul de Evans quando injetado na corrente sanguínea se liga a proteínas plasmáticas, especialmente a albumina. Alterações na permeabilidade vascular acarretam a saída do corante do lúmen vascular para o tecido intersticial. Estudos demonstraram que na malária experimental, o escape do corante para o parênquima cerebral coincide com áreas de hemorragias (VAN DE HEYDE *et al.*, 2001). O dano endotelial acarretado por mediadores inflamatórios tem sido implicado como uma causa provável da disfunção da integridade da BHE (WASSMER *et al.*, 2006).

Os resultados da quantificação do extravasamento do azul de Evans indicam um grau de disfunção da BHE em animais infectados, com cinco dias de infecção, em relação aos animais controle. Este dado comprova a disfunção da BHE acarretada pela infecção e demonstra a capacidade desta metodologia para avaliação da permeabilidade vascular da barreira de animais infectados com *P. berghei* NK65.

Entretanto, o mecanismo de passagem de macromoléculas, como proteínas, através da barreira endotelial cerebral em condições inflamatórias tem sido extensivamente debatido, com alguns resultados controversos. O incremento desta permeabilidade vascular pode estar associado tanto ao aumento dos eventos de pinocitose quanto à disfunção das junções inter-endoteliais na BHE (RISAU & WOLBURG, 1990). Outro possível mecanismo que justifica esta disfunção pode envolver a destruição do endotélio em decorrência dos eventos apoptóticos induzidos por vários tipos celulares, como eritrócitos, plaquetas e leucócitos (WASSMER *et al.*, 2006).

Esta alteração funcional da BHE seria pré-requisito necessário para desenvolvimento e formação de edema cerebral, como demonstrado por Favre *et al.* (1999). Tal dado vai de encontro ao verificado nos achados histopatológicos do nosso trabalho, sugerindo que o edema observado é consequência do extravasamento de líquido excessivo decorrente da disfunção da barreira. Alterações do metabolismo acarretadas pela infecção, como o aumento da concentração de lactato, em conjunto

com a disfunção da BHE, podem ter implicações diretas no SNC e na mortalidade dos animais (PENET *et al.*, 2005).

Nossos resultados demonstram que o tecido cerebral apresentou uma mudança pronunciada na permeabilidade vascular nos animais infectados em relação aos animais controle.

Adicionalmente, é necessário destacar que a técnica utilizando o azul de Evans tem se mostrado eficaz e equivalente a metodologias utilizando marcação radioativa (VAN DE HEYDE *et al.*, 2001).

Quantificação da concentração das citocinas e quimiocinas

A produção de citocinas pró-inflamatórias exerce um controle da parasitemia na fase inicial da infecção. Entretanto, uma produção excessiva no sítio de infecção pode exercer um importante papel para o recrutamento e ativação de leucócitos de forma exagerada. Estudos em humanos demonstraram a expressão de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α e IFN- γ , em tecido cerebral humano *postmortem* (BROWN *et al.*, 1999). Sua produção por micróglia e astrócitos em modelo experimental de MC sugere sua participação em manter uma resposta inflamatória (MEDANA *et al.*, 1997b). Desta forma, leucócitos ativados dentro do SNC seriam capazes de ativar outras populações celulares e induzir uma maior produção de TNF- α e, conseqüente produção de moléculas de adesão (CARVALHO-TAVARES *et al.*, 2000), o que aumentaria o influxo celular. Estudos em humanos demonstraram o aumento dos níveis plasmáticos de TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-6 na malária grave, com provável contribuição para a patogênese da doença. Adicionalmente, sabe-se que o TNF- α induz apoptose e pode estar associado à disfunção da BHE durante a MC.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram um aumento significativo na concentração de TNF- α no cérebro de camundongos C57Bl/6 infectados em relação aos controles. Tal dado corrobora com a literatura que indica o aumento da expressão local desta citocina na infecção murina por *P. berghei* ANKA em linhagens consideradas susceptíveis à MC; isto é a linhagem C57Bl/6 (JENNINGS *et al.*, 1997). Desta forma, este dado fortalece que a infecção por *P. berghei* NK65 é capaz de induzir uma resposta semelhante à obtida pela cepa ANKA.

A produção exacerbada de TNF- α pelo hospedeiro em resposta a infecção têm sido capaz de provocar anormalidades sistêmicas, como a anorexia e o comprometimento renal. Os resultados obtidos da análise da concentração desta citocina no soro de animais infectados e controles demonstraram um aumento em decorrência da infecção. Adicionalmente, tal dado corrobora os resultados obtidos por Grau *et al.* (1987), que demonstraram um aumento dos níveis séricos de TNF- α , que está diretamente envolvido na patogênese da infecção por *P. berghei* ANKA.

Em conjunto com dados da literatura, a distribuição diferencial da citocina TNF- α , de acordo com a linhagem do hospedeiro, indica um perfil distinto do envolvimento na patogênese da doença. Animais da linhagem C57Bl/6 apresentaram uma infecção aguda e de letalidade precoce, juntamente com alterações histopatológicas pronunciadas. Estas características podem ser consequência da participação direta do TNF- α para o comprometimento cerebral, em adição ao envolvimento sistêmico. Para a linhagem BALB/c, que apresentou um aumento da concentração da citocina apenas no soro dos animais infectados, as repercussões seriam limitadas às manifestações sistêmicas apresentadas pelos animais infectados.

Embora os mecanismos que regulam a entrada de leucócitos no SNC ainda não estejam totalmente elucidados, estudos anteriores indicam um importante papel regulador das quimiocinas durante o recrutamento de leucócitos, inclusive nos processo de transmigração através da BHE (BABCOCK *et al.*, 2003). As quimiocinas exercem um papel central em doenças que o recrutamento celular tem um papel deletério. Sua função não é limitada ao recrutamento, uma vez que também apresenta função de ativação celular, diferenciação e degranulação. Sabe-se que as quimiocinas controlam a migração de células T, monócitos e micróglia dentro do parênquima cerebral (MAHAD *et al.*, 2003).

Entretanto, a análise da expressão de quimiocinas não pode ser focada somente no âmbito sistêmico, despertando a idéia de analisar os níveis de quimiocinas, *in locu*, uma vez que a produção local serve como evidência direta do envolvimento do SNC na doença. Considerando que há uma escassez de dados relativos à importância das quimiocinas para o estudo da malária experimental, utilizamos sobrenadante de homogenato de cérebro, a fim de quantificar a produção de quimiocinas em camundongos BALB/c e C57Bl/6, infectados com *P. berghei* NK65. Estes resultados

são relevantes para o entendimento do papel local de quimiocinas na imunopatogênese da MC.

O estudo comparativo da produção de quimiocinas neste modelo experimental de malária grave induzida por *P. berghei* NK65 demonstrou um aumento significativo dos níveis das quimiocinas RANTES/CCL5, MIG/CXCL9 e MCP-1/CCL2 nos animais infectados, com relação aos respectivos controles. Estes resultados são similares ao estudo comparativo da produção quimiocinas realizado por Hanum *et al.* (2003) que também demonstrou o aumento na expressão localizada das quimiocinas MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5 em tecido cerebral de camundongos infectados.

O aumento da concentração destas quimiocinas no tecido cerebral de animais infectados sugere uma participação destas moléculas no processo inflamatório e corrobora com os dados de microscopia intravital que demonstra aumento do processo inflamatório no parênquima cerebral. A quimiocina MIG/CXCL9, membro da família CXC, é descrita como molécula quimiotática responsável pelo recrutamento e proliferação de linfócitos T (WHITING *et al.*, 2004). Já as quimiocinas MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5, membros da família CC, atraem e ativam uma ampla diversidade de células, como monócitos, linfócitos T, basófilos e eosinófilos. O aumento da expressão destas moléculas vai de encontro aos resultados obtidos por Hanum *et al.* (2003), em um modelo de MCE. Considerando que, no nosso estudo, demonstramos um aumento no recrutamento de leucócitos, podemos sugerir que as quimiocinas poderiam estar modulando a expressão de moléculas de adesão envolvidas nestas etapas, tais como as seletinas e as integrinas.

A quimiocina MCP-1/CCL2 é responsável pela ativação de monócitos, induzindo sua migração da circulação sangüínea para tornarem-se macrófagos teciduais. É apontada como uma molécula efetiva durante a infiltração de células mononucleares para o SNC em diferentes condições inflamatórias (KELDER *et al.*, 1998; SCARPINI *et al.*, 2002). Em várias condições, astrócitos têm sido implicados como a principal fonte desta quimiocina no SNC. Desta forma, estudos têm mostrado que sua ação está associada com a alteração da integridade da BHE, que facilita sua distribuição para o compartimento vascular. Cultura de células endoteliais da microvasculatura cerebral tratada com MCP-1/CCL2, apresentou uma diminuição da expressão de proteínas associadas às junções intercelulares da BHE, como a ocludina e a caveolina. Portanto, essas evidências sugerem que a MCP-1/CCL2 possa induzir uma alteração na integridade vascular da BHE, promovendo uma maior permeabilidade (SONG &

PACHTER, 2004). Por outro lado, foi demonstrado que CCR2 não é essencial ao desenvolvimento da MCE (BELNOUE *et al.*, 2003a).

Um outro estudo demonstrou alterações marcantes no aumento da expressão de mRNA de moléculas de adesão, citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-4), iNOS e quimiocinas, incluindo RANTES/CCL5 e seus receptores (CCR1, CCR3 e CCR5), durante o pico de parasitemia de camundongos da linhagem Swiss infectados com *P. yoelii* 17XL (SARFO *et al.*, 2005). Adicionalmente, um estudo anterior, realizado em camundongos CCR5^{-/-} infectados com *P. berghei* ANKA, demonstrou uma diminuição de susceptibilidade a MCE, quando comparados com animais C57Bl/6 selvagens (BELNOUE *et al.*, 2003b). Logo, existem evidências do papel desta quimiocina, RANTES/CCL5, no envolvimento da patogênese da malária cerebral. A quimiocina RANTES/CCL5 e seu receptor estão envolvidos na formação de infiltrados inflamatórios, apresentando um importante papel, em especial na manutenção, no prolongamento da resposta inflamatória e no desenvolvimento da patologia cerebral.

A ação das quimiocinas é mediada através de receptores de superfície celular específicos. Entretanto, a interação receptor-quimiocina é caracterizada por considerável promiscuidade, onde um mesmo receptor interage com várias quimiocinas e uma quimiocina é capaz de ligar a diversos receptores. Diferentes quimiocinas, membros de uma mesma família podem ter um mesmo papel, em decorrência das características compartilhadas entre elas (ONO *et al.*, 2003). Logo, os fenômenos envolvidos no recrutamento de leucócitos para o SNC não podem ser atribuídos exclusivamente ao aumento da concentração e/ou da expressão de uma determinada quimiocina. Adicionalmente, no mecanismo de migração transendotelial, outras moléculas são atuantes, como as seletinas, as moléculas de adesão celular, expressadas na superfície das células endoteliais e as integrinas expressadas nos leucócitos (LEY, 2001).

Embora, a fonte celular responsável pela expressão das quimiocinas e citocinas no SNC não foi objetivo do estudo, um estudo demonstrou que antígenos de *P. berghei* ANKA podem induzir a produção destes mediadores inflamatórios por astrócitos (HANUM *et al.*, 2003).

Desta forma, nossos resultados demonstram que o processo inflamatório se assemelha a uma encefalite e são consistentes com a idéia de que a migração de células para o tecido cerebral constitui um processo relevante para a progressão da doença.

Considerações finais

A malária é uma doença parasitária que aflige grande parte da população mundial, apresentando uma complexa interação entre características ambientais, do parasito e do hospedeiro. Exerce uma pressão sócio-econômica e grande interesse científico em grupos de pesquisa, com uma extensa publicação sobre o tema. Muitos estudos apresentam resultados aparentemente contraditórios ou inconclusivos. Entretanto, as variações da resposta imune nos estudos em humanos podem ser, em parte, decorrente das variações geográficas das áreas de estudo, que apresentam diferenças na endemicidade. Estudos da patogênese da MC em adultos da Tailândia diferem significativamente de estudos em crianças da Malásia e Quênia, demonstrando que a MC é, na verdade um amplo espectro de entidades clínicas.

Logo, o estudo experimental da malária grave apesar dos dados conflitantes e aparentemente contraditórios não deve ser desmerecido, tendo em vista que as variações são decorrentes de um somatório de eventos exógenos e endógenos que podem interferir na progressão e no espectro da doença. Portanto, a infecção por *P. berghei* cepa NK65 em camundongos apresenta similaridades com a infecção humana, desenvolvendo manifestações clínicas típicas da malária grave por *P. falciparum*.

Estudos humanos, muitas vezes são limitados a observações *postmortem*. Logo a infecção de linhagens susceptíveis de camundongos proporciona um modelo largamente utilizado que compartilha características com a doença humana, especialmente uma resposta imune deletéria (LOU *et al.*, 2001).

De acordo com aspectos histológicos descritos para o modelo de MC utilizando *P. berghei* ANKA (MEDANA *et al.*, 2001), podemos verificar que o modelo estudado compartilha características, como hemorragias, disfunção da BHE e edema. Baseando nestes resultados podemos sugerir que há um comprometimento cerebral nos camundongos infectados com a cepa NK65 de *P. berghei*, especialmente em animais da linhagem C57Bl/6.

7 – Conclusões

No presente trabalho, utilizando o modelo murino, foi avaliada a resposta inflamatória cerebral envolvida na infecção de camundongos BALB/c e C57Bl/6 jovens com *P. berghei* cepa NK65. Os resultados obtidos demonstram que:

- ❖ A parasitemia em camundongos jovens infectados com a cepa NK65 de *P. berghei* apresentou evolução gradual, porém mais branda na linhagem C57Bl/6.
- ❖ A infecção por *P. berghei* NK65 apresenta um curso agudo e letal mais pronunciado na linhagem C57Bl/6, com manifestações clínicas mais evidentes.
- ❖ As alterações histopatológicas observadas em cérebro de camundongos C57Bl/6 foram precoces e exuberantes em relação aos animais da linhagem BALB/c, demonstrando uma maior susceptibilidade daquela linhagem a infecção por *P. berghei* NK65. O quadro histológico mimetiza alterações encontradas em infecções humanas induzidas por *P. falciparum*.
- ❖ O recrutamento de leucócitos para o SNC foi evidenciado como etapa marcante na patogenia da infecção, com um aumento de células em rolamento e aderidas na região perivascular da pia-máter. O aumento no processo de migração celular foi condizente com o aparecimento das manifestações clínicas e histopatológicas da doença.
- ❖ Através do protocolo de permeabilidade da BHE com o corante azul de Evans, demonstrou-se que a infecção por *P. berghei* NK65 é capaz de modificar a permeabilidade vascular do tecido cerebral dos animais infectados em relação aos animais controle.
- ❖ A diminuição de leucócitos totais no sangue periférico de animais infectados pode ser consequência do aumento dos eventos de recrutamento celular em decorrência da infecção.

- ❖ A redução de linfócitos no sangue periférico de animais infectados pode estar relacionada diretamente com o seqüestro deste tipo celular no parênquima cerebral de animais infectados.
- ❖ As citocinas TNF- α e IFN- γ e as quimiocinas MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 e MIG/CXCL9 mostraram-se importantes moléculas no modelo estudado, com um aumento dos seus níveis no tecido nervoso durante as manifestações clínicas da doença e os eventos recrutamento de leucócitos para o SNC.
- ❖ A investigação da interação leucocitária no endotélio da microcirculação cerebral, através da técnica de microscopia intravital, associada a avaliação da expressão das quimiocinas foram capazes de comprovar o envolvimento de uma resposta inflamatória no sistema nervoso central de camundongos experimentalmente infectados com *P. berghei* NK65.
- ❖ A infecção de camundongos jovens da linhagem C57Bl/6 com *P. berghei* NK65 pode representar um bom modelo para estudos dos mecanismos envolvidos na determinação do quadro de MC por *P. falciparum*.

8. Perspectivas

A retenção de esquizontes maduros no baço e fígado é um evento comum na infecção acarretada por *P. berghei*. Resultados preliminares da análise histopatológica realizada em baço e fígado confirmou a retenção de formas maduras e de pigmento malárico nestes órgãos. Portanto, existe o interesse para verificar as manifestações da malária grave em diferentes órgãos (fígado, baço, pulmão e rim) e realizar a quantificação de elementos associadas às manifestações clínicas em camundongos BALB/c e C57Bl/6 infectados com a cepa NK65 de *P. berghei*.

Adicionalmente, trabalhos sugerem que a idade influencia profundamente a parasitemia e sobrevida de ratos infectados com *P. berghei* (ZUCKERMAN & YOELI, 1954). Este modelo demonstrou que a idade foi inversamente relacionada à parasitemia e mortalidade dos animais (SINGER *et al.*, 1955).

Camundongos jovens infectados com *P. berghei* cepa NK65 podem apresentar uma maior susceptibilidade à infecção, devido à deficiência no controle da infecção, apresentando maiores complicações da malária grave. Esta hipótese é fortalecida por um estudo realizado com camundongos (BALB/c X C57BL/6)F1 infectados com estágio sanguíneo de *P. berghei* ANKA. Este experimento demonstrou um perfil de susceptibilidade dos camundongos relacionado com a idade. A infecção por *P. berghei* ANKA em camundongos considerados jovens (oito semanas) frequentemente resulta em sintomas neurológicos e morte precoce dos animais. Estes sintomas, característicos da MC, demonstraram ser menos frequentes em animais velhos (15-20 semanas) pertencentes a mesma linhagem (HEARN *et al.*, 2000). Resultados preliminares do nosso grupo, utilizando camundongos BALB/c velhos (15-20 semanas) infectados com *P. berghei* cepa NK65, têm demonstrado uma resposta diferencial à infecção, com controle nas taxas de parasitemia e morte retardada. Desta forma, o impacto da idade é um fator que não deve ser desconsiderado para o estudo da MC experimental (ADAM *et al.*, 2003).

Desta forma, será objetivo analisar as possíveis diferenças de susceptibilidade relacionadas à idade, através de estudos utilizando camundongos BALB/c e C57Bl/6 com 15-20 semanas de idade.

9 - Referências Bibliográficas

- 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(10): 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 in Parasitology.* 18: 360-366, 2002.
- ALAVI, Y.; ARAI, M.; MENDONZA, J.; TUFET-BAYONA, M.; SINHÁ, 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(2): 245-247, 2004.
- 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(4):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(9): 4093-4099, 1998.
- 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(2): 220-224, 2006.

- 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(21): 7922-7930, 2003.
- BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines \square CXC and CC chemokines. *Adv Immunol.* 55: 97 \square 179, 1994.
- BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature.* 392(6676): 565-568, 1998.
- BANISOR, I.; LEIST, T. P.; KALMAN, B. Involvement of β -chemokines in the development of inflammatory demyelination. *J Neuroinflammation.* 2: 1-14, 2005.
- BAKKER N.P.; ELING, W. M.; DE GROOT, A. M.; SINKELDAM, E. J.; LUYKEN, R. Attenuation of malaria infection, paralysis and lesion in the central nervous system by low protein diets in rats. *Acta Trop.* 50(4): 285-293, 1992.
- BALLABH, P.; BRAUN, A.; NEDERGAARD, M. The blood-brain barrier: an overview-structure, regulation and clinical implications. *Neurobiol. Dis.* 16: 1-13, 2004.
- BELAYEV, L.; BUSTO, R.; ZHAO, W.; GINSBERG, M. D. Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Research.* 739: 88-96, 1996.
- BELNOUE, E.; COSTA, F. T. M.; VIGÁRIO, A. M.; VOZA, T.; GONNET, F.; LANDAU, I.; VAN ROOIJEN, N.; MACK, M.; KUZIEL, W. A.; RÉNIA, L. Chemokine receptor CCR2 is not essential for the development of experimental cerebral malaria. *Infection and Immunity.* 71(6): 3648-3651, 2003a.

- BELNOUE, E.; KAYIBANDA, M.; DESCHEMIN, J. C.; VIGUIER, M.; MACK, M.; KUZIEL, W. A.; RÉNIA, L. CCR5 deficiency decreases susceptibility to experimental cerebral malaria. *Blood*. 101(11): 4253-4259, 2003b.
- BERENDT, A. R.; FERGUSON, D. J.; NEWBOLD, C. I. Sequestration in *Plasmodium falciparum* malaria: sticky cells and sticky problems. *Parasitol Today*. 6(8): 247-254, 1990.
- BERENDT, A. R.; TUMER, G. D.; NEWBOLD, C. I. Cerebral malaria: the sequestration hypothesis. *Parasitol Today*. 10(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.
- 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.
- CARVALHO-TAVAVES, J.; HICKEY, M. J.; HUTCHISON, J.; MICHAUD, J.; SUTCLIFFE, I. T.; KUBES, P. A role for platelets and endothelial selectins in tumor necrosis factor-alpha-induced leukocyte recruitment in the brain microvasculature. *Circ Res*. 87: 1141-1148, 2000.
- 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.
- CHEN, L.; ZHANG, Z.; SENDO, F. Neutrophils play a critical role in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Clin Exp Immunol.* 120(1): 125-133, 2000.
- CLARK, I. A.; ROCKETT, K. A. The cytokine theory of human cerebral malaria. *Parasitol Today.* 10(10): 410-412, 1994.
- 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.
- CONTEL, N.; COMBES, V; WASSMER, S. C.; CHIMINI, G.; GRAU, G. E. Cell vesiculation and immunopathology: implications in cerebral malaria. *Microbes and Infection.* 8: 2305-2316, 2006.
- COOKE, B. M.; BERENDT, A. R.; CRAIG, A. G.; MACGREGOS, J.; NEWBOLD, C. I.; NASH, G. B. Rolling and stationary cytoadhesion of red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum*: separate roles for ICAM-1, CD36 and thrombospondin. *Br J Haematol.* 87: 162-170, 1994.
- D'AMBROSIO, D.; PANINA-BORDIGNON, P.; SINIGAGLIA, F. Chemokine receptors in inflammation: an overview. *J. Neuroimmunol Methods.* 273(1-2):3-13, 2003.
- DE SOUZA, J. B. & RILEY, E. M. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes Infect.* 4(3): 291-300, 2002.
- 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 (2): 178-182, 1996.

- 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(1-2): 122-129, 2005.
- FAVRE, N.; DA LAPEROUSAZ, CHEN; 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 and Infection.* 1: 961-968, 1999.
- 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(1): 23-33, 2004.
- GARNHAN, P. C. C. Malaria parasites and other haemosporidia. *Oxford: Blackwell Scientific Publications*, 1966.
- 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.
- GRAU, G. E.; PIGUET, P. F.; ENGERS, H. D.; LOUIS, J. A.; VASSALI, P.; LAMBERT, P. H. L3T4+ 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. & 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(3): 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(5): 1620-1630, 2006.
- GRIMBLE, R. F. Nutritional modulation of cytokine biology. *Nutrition.* 14(7-8): 634-640, 1998.
- 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(5): 633-640, 2003.
- 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(9): 5364-5376, 2000.
- HEY, J. Parasite populations: the puzzle of *Plasmodium*. *Curr Biol.* 9(15): 565-567, 1999.
- HUNT, N. H. & GRAU, G. E. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol.* 24(9): 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. *International Journal for Parasitology.* 36: 569-582, 2006.
- JACKOBSEN, P. H.; MORRIS-JONES, S.; RONN, A.; HVIID, L.; THEANDER, T. G.; ELHASSAN, I. M.; BYGBJERG, I. C.; GREENWOOD, B. M. Increased plasma concentrations of sICAM-1, sVCAM-1 and sELAM-1 in patients with *Plasmodium falciparum* or *P. vivax* malaria and association with disease severity. *Immunol.* 83: 665-669, 1994.

- JENNINGS, V. M.; ACTOR, J. K.; LAL, A. A.; HUNTER, R. L. Cytokine profile suggesting that murine cerebral malaria is an encephalitis. *Infection and Immunity*. 65(11): 4883-4887, 1997.
- KELDER, W.; MCARTHUR, J. C.; NANCE-SPROSON, T.; MCCLERNON, D.; GRIFFIN, D. E. Beta-chemokines MCP-1 and RANTES are selectively increased in cerebrospinal fluid of patients with human immunodeficiency virus-associated dementia. *Ann Neurol*. 44(5): 831-835, 1998.
- 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(2): 1000-1006, 2002.
- KIRK, K. Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte. *Physiological Reviews*. 81(2): 495-537, 2001.
- KILLICK-KENDRICK, R. Taxonomy, Zoography and Evolution. IN: KILLICK-KENDRICK, R. & PETERS, W. *Rodent Malaria*. London: Academic Press, 1978. págs 1-52.
- KOSSODO, S. & GRAU, G. E. Profiles of cytokines production in relation with susceptibility to cerebral malaria. *J. Immunol*. 151: 4811-4820, 1993.
- 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(2): 65-72, 2002.
- KUSCHERT, G. S. V.; COULIN, F.; POWER, C. A.; PROUDFOOT, A. E.; HUBBARD, R. E.; HOOGEWERF, A. J.; WELLS, T. N. C. Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry*. 38: 12959-12969, 1999.

- LAMB, T. J.; BROWN, D. E.; POTOCNIK, A. J.; LANGHORNE, J. Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. *Expert Rev. Mol. Med.* 8(6): 1-22, 2006.
- LANDAU, I. & BOULARD, Y. Life cycles and Morphology. IN: KILLICK-KENDRICK, R. & PETERS, W. *Rodent Malaria*. London: Academic Press, 1978. págs 53-84.
- LEY, K. *Physiology of Inflammation*. New York: Oxford University Press, 2001.
- LI, C.; SEIXAS, E.; LANGHORNE, J. Rodent malarías: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite. *Med Microbiol Immunol.* 189(3): 115-126, 2001.
- 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.
- 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(5): 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(4): 810-820, 2001.
- 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.
- MAHAD, D. J. & RANSOHOFF, R. M. The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Semin. Immunol.* 15: 23-32, 2003.

- MARSH, K.; ENGLISH, M.; CRAWLEY, J.; PESHU, N. The pathogenesis of severe malaria in African children. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 90: 395-402, 1996.
- MATTHYS, P. & BILLIAU, A. Cytokines and cachexia. *Nutrition.* 13: 763-770, 1997.
- MEDANA, I. M.; HUNT, N. H.; CHAN-LING, T. Early activation of microglia in the pathogenesis of fatal murine cerebral malaria. *Glia.* 19(2): 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(4): 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(2): 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.
- 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>
- 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(6): 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.

- 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(6): 1185-1199, 2003.
- 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(32): 7352-7358, 2005.
- 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_i-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(7): 3822-3829, 2000.
- PROUDFOOT, A. E. I. The biological relevance of chemokine-proteoglycan interactions. *Biochem Soc Trans.* 34(3): 422-426, 2006.
- RISAU, W. & WOLBURG, H. Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.* 13: 174-178, 1990.
- ROT, A. & VON ANDRIAN, U. R. Chemokines in innate and adaptative host defense: Basic chemokinese grammar for immune cells. *Ann Rev Immunol.* 22: 891-928, 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. *Malaria Journal.* 4: 63-76, 2005.

- SCARPINI, E.; GALIMBERTI, D.; BARON, P.; CLERICI, R.; RONZONI, M.; CONTI, G.; SCARLATO, G. IP-10 and MCP-1 levels in CSF and serum from multiple sclerosis patients with different clinical subtypes of the disease. *J Neurol Sci.* 195(1): 41-46, 2002.
- SCHOFIELD, L. & HACKETT, F. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malarial parasites. *J Exp Med.* 177: 145-53, 1993.
- SHERMAN, I. W.; EDA, S.; WINOGRAD, E. Cytoadherence and sequestration in *Plasmodium falciparum*: defining the ties that bind. *Microbes Infect.* 5(10): 897-909, 2003.
- SIMPSON, J. E.; NEWCOMBE, J.; CUZNER M. L.; WOODROOFE, M. N. Expression of the interferon- γ -inducible chemokines IP-10 and Mig and their receptor, CXCR3, in multiple sclerosis lesions. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 26(2): 133-142, 2000.
- SINGER, I.; HADFIELD, R.; LAKONEN, M. The influence of age on the intensity of infection with *Plasmodium berghei* in the rat. *J Infect Dis.* 97(1): 15-21, 1955.
- SONG, L. & PACTER, J. S. Monocyte chemoattractant protein-1 alters expression of tight junction-associated proteins in brain microvascular endothelial cells. *Microvascular Res.* 67: 78-89, 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.
- 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(11): 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(2): 87-94, 2000.
- THUMWOOD, C. M.; HUNT, N. H.; CLARK, I. A.; COWDEN, W. B. Breakdown of the blood-brain barrier in murine cerebral malaria. *Parasitology*. 96 (3): 579-589, 1988.
- TREUTIGER, C. J.; HEDDINI, A.; FERNANDEZ, V.; MULLER, W. A.; WAHLGREN, M. PECAM/CD31, an endothelial receptor for binding *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Nat Med*. 3: 1405-1408, 1997.
- TRUJILLO, S. B.; SANCHEZ, G. A.; RESTREPO, A. V.; FONSECA, J. C.; OSORIO, L. R.; GRUPO MALARIA. Nutritional status and immunoglobulin and cytokine concentrations in children with malaria. *An Pediat*. 58(5): 418-424, 2003.
- TRUYENS, C.; TORRISCO, F.; ANGELO-BARRIOS, A.; LUCAS, R.; HEREMANS, H.; DE BAETSELIER, P.; CARLIER, Y. The cachexia associated with *Trypanosoma cruzi* acute infection in mice is attenuated by anti-TNF- α , but not by anti-IL-6 or anti-IFN- γ antibodies. *Parasite Immunol*. 17(11): 561-568, 1995.
- TURNER G. Cerebral Malaria. *Brain Pathol*. 7: 569-582, 1997.
- UDOMSANGPECH, P.; REINHARDT, P. H.; SCHOLLAARDT, T.; ELLIOT, J. F.; KUBES, P.; HO, M. Promiscuity of clinical *Plasmodium falciparum* isolates for multiple adhesion molecules under flow conditions. *J Immunol*. 158: 4358-4364, 1997.
- 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(5): 3460-3465, 2001.
- 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*. 22(11): 503-508, 2006.

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.

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(2): 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(1): 645-653, 2006.

WHITING, D.; HSIEH, G.; YUN, J. J.; BANERJI, A.; YAO, W.; FISHBEIN, M. C.; BELPERIO, J.; STRIETER, R. M.; BONAVIDA, B.; ARDEHALI, A. Chemokine monokine induced by IFN-gamma/CXC chemokine ligand 9 stimulates T lymphocyte proliferation and effector cytokine production. *J Immunol.* 172(12): 7417-7424, 2004.

www.imm.ul.pt

WHO (2006) Roll Back Malaria.

http://mosquito.who.int/cmc_upload/0/000/015/372/RBMIInfosheet_1.htm

ZUCKERMAN, A. & YOELI, M. Age and sex as factors influencing *Plasmodium berghei* infections in intact and splenectomized rats. *J Infect Dis.* 94(3): 225-236, 1954.