

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Avaliação do Papel do Receptor Imune Inato Dectina-1 e Antígenos Solúveis
de *Neospora caninum* no Tratamento da Malária Cerebral Murina**

Murilo Vieira da Silva

Uberlândia – MG

Setembro – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Avaliação do Papel do Receptor Imune Inato Dectina-1 e Antígenos Solúveis
de *Neospora caninum* no Tratamento da Malária Cerebral Murina**

**Tese apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas
da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor**

MURILO VIEIRA DA SILVA

ORIENTADOR: PROF. DR. TIAGO WILSON PATRIARCA MINEO

Uberlândia – MG

Setembro – 2017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Murilo Vieira da Silva

“Avaliação do Papel do Receptor Imune Inato Dectina-1 e Antígenos Solúveis de *Neospora Caninum* no Tratamento da Malária Cerebral Murina”

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 29 de setembro de 2017.

Profa. Dra. Érika Martins Braga
UFMG

Prof. Dr. Gerhard Wunderlich
USP

Profa. Dra. Neide Maria da Silva
ICBIM/UFU

Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Junior
ICBIM/UFU

Prof. Dr. Tiago Wilson P. Mineo – orientador
ICBIM/UFU

Dedico este trabalho a todos os animais de pesquisa que mesmo de forma irracional se doaram aos experimentos que proporcionaram o entendimento dos mais singelos processos biológicos que buscamos entender!

**De tudo na vida ficam três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que precisamos continuar...
A certeza de que seremos interrompidos...**

Portanto, devemos:

**Fazer da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada... Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro...**

(Fernando Pessoa)

AGRADECIMENTOS

A DEUS pelo dom da vida e da ciência. Por todas as bênçãos e graças, e especialmente por mais esta etapa da minha vida. Pois embora, muitas vezes indigno de sua benevolência, me concede mais que mereço e necessito.

Ao Professor Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo, por todo aprendizado e amizade. Fica aqui meu eterno agradecimento ao meu mentor científico pelos valiosos ensinamentos, incentivos e, sobretudo desafios.

Aos demais docentes do Laboratório de Imunoparasitologia - UFU, Dr. José Roberto Mineo e Dra Fernanda Maria Santiago, pela grande contribuição com ideias e auxílios durante a execução deste trabalho.

A todos os discentes do laboratório de Imunoparasitologia – UFU. Os que participaram diretamente e indiretamente deste trabalho. Especialmente, Flávia Batista ferreira, Caroline Martins Mota, Vanessa dos Santos Miranda, Eliézer Lucas Pires Ramos, Renata Cristna de Paula. Muito obrigado pelo auxilio prestado nos experimentos, bem como pelo companherismo.

Ao corpo técnico do Laboratório de Imunoparasitologia – UFU: Dra. Ana Cláudia Arantes Marquez Pajuaba, Dra. Cristina Rostkowska, Marley Dantas Barbosa, Zilda Mendonça da Silva, pelo indispensável suporte prestado.

As secretárias do programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas Lucélia e Luceleide, e ao secretário do laboratório de Imunologia Max Aor Marques, pela atenção e dedicação.

Ao corpo técnico do Centro de Bioterismo e Experimentação Animal – CBEA/UFU: Antônio Tomás Junior, Fabiano Kreston de Paiva Assis, Ivone Maria de Oliveira, Loyane Bertagnolli Coutinho, Maria Madalena da Silva, Serena Mares Malta, Taisa Carrijo de Oliveira camargos, pelo eficiente trabalho na produção, criação e experimentação animal, bem como pela minha acolhida como um integrante desta equipe, que tanto me orgulho, durante meu doutoramento.

A minha namorada Mylla Spirandelli da Costa, pela amizade, companheirismo, carinho, compreensão e paciência, muito obrigado.

A toda minha Família, em especial aos meus pais: Gésio e Rosana, meus irmãos Gesileny e Paulo Vitor, pois sem estes nada seria possível. Muito obrigado por tudo, por estarem ao meu lado em todos os momentos.

Aos animais que participaram deste estudo, com todo o respeito e dignidade, sem a presença deles não seria possível alcançar os mesmos resultados.

Aos órgãos de fomento: CAPES, CNPq, FAPEMIG que foram de fundamental importância para que esta pesquisa fosse desenvolvida.

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO GERAL	12
Patogênese e síndromes associadas à malária	14
Ciclo de vida de parasitos do gênero Plasmodium	16
Vetor da malária	17
Imunidade contra Plasmodium	18
Tratamento Malária	21
Modelo murino para estudo da malária cerebral	21
JUSTIFICATIVA.....	23
CAPITULO I	24
INTRODUÇÃO	25
Receptores do tipo Lectina C	25
Estrutura do Receptor Dectina-1	26
Dectina-1 nas diferentes infecções	30
OBJETIVOS.....	32
METODOLOGIA	33
Declaração ética.....	33
Animais.....	33
Manutenção do Parasito.....	33
Parâmetros Bioquímicos.....	34
Quantificação de Citocinas.....	34
Determinação da Parasitemia	36
Determinação do Parasitismo Tecidual	36
Sobrevivência e Morbidade	37
Histopatologia e Integridade da Barreira Hematoencefálica.....	37
Testes Hematológicos.....	37
Análises Estatísticas	38

RESULTADOS.....	39
DISCUSSÃO.....	50
CAPITULO II.....	54
INTRODUÇÃO	55
<i>Neospora caninum</i>	<i>56</i>
<i>Ciclo biológico</i>	<i>56</i>
<i>Manifestações clínicas da neosporose</i>	<i>59</i>
<i>Neosporose em Humanos</i>	<i>60</i>
<i>Infecções cruzadas.....</i>	<i>61</i>
OBJETIVOS.....	63
Objetivos específicos	63
METODOLOGIA	64
<i>Animais.....</i>	<i>64</i>
<i>Cultivo de taquizoítos de N. caninum e produção de NLA.....</i>	<i>64</i>
<i>Protocolo de tratamento e coleta de amostras</i>	<i>65</i>
<i>Preparo de homogenato de tecidos</i>	<i>65</i>
<i>Detecção de Citocinas IL-10, IFNγ, TNFα</i>	<i>65</i>
<i>Monitoramento da parasitemia</i>	<i>66</i>
<i>Análise de sobrevida.....</i>	<i>66</i>
<i>Análise estatística</i>	<i>66</i>
RESULTADOS.....	67
DISCUSSÃO.....	77
CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	80

RESUMO

A malária é uma doença que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, sendo que sua forma cerebral leva uma porcentagem significativa de indivíduos à morte, principalmente crianças. Atualmente existem no mercado algumas drogas com efeito comprovado para o tratamento desta enfermidade, principalmente drogas que atuam na replicação do parasito. Contudo, a busca por medidas eficazes no controle do quadro cerebral da malária ainda é um desafio para muitos grupos de pesquisa. Para que possíveis novas drogas sejam desenvolvidas, o entendimento pormenorizado da relação parasito-hospedeiro neste processo infeccioso precisa ser elucidado. Assim, o entendimento do papel de receptores de reconhecimento padrão, bem como de moléculas do próprio parasito precisam ser conhecidas. Neste trabalho nós avaliamos o papel do receptor de β -glucanos, Dectina-1 na resposta imune contra *Plasmodium berghei*-ANKA. Observamos que na ausência deste receptor os animais são mais resistentes à infecção, apresentando morte retardada, sinais clínicos atenuados de malária cerebral, bem como menor parasitemia. Tais resultados convergem para a hipótese de que *P. berghei*-ANKA interage com Dectina-1 para modular a resposta imune, de forma a favorecer sua replicação, por consequência induzindo malária cerebral. Por outro lado, são muitos os relatos de coinfecções e tratamentos com antígenos de diferentes parasitos como medidas terapêuticas contra malária. Protocolos esses que se baseiam em utilizar de forma benéfica os efeitos modulatórios (ativadores ou inibidores) de moléculas de origem parasitária para o controle da doença. Aqui nós utilizamos antígeno solúvel de *N. caninum* (NLA), um parasito Apicomplexa, assim como os do gênero *Plasmodium*, para o tratamento da malária cerebral. Observou-se que o tratamento com NLA resgata animais da morte precoce característica por malária cerebral. Associamos este resgate aos menores níveis de IFN γ , bem como aumento dos níveis de TNF α em animais tratados com NLA. Concluímos assim que tanto o receptor inato Dectina-1 como proteínas do antígeno solúvel de *N. caninum* são potenciais alvos para o desenvolvimento de medidas terapêuticas contra malária cerebral.

Palavras Chave: Dectina-1, Clec7a, *N. caninum*, NLA, Malária cerebral

ABSTRACT

Malaria is a disease that affects millions of people around the world, and its cerebral form carries a significant percentage of individuals to death, mainly children. Currently on the market there are some drugs with proven effect for the treatment of this disease, especially drugs acting on parasite replication. However, search for effective measures to control malaria brain picture remains a challenge for many research groups. For possible new drugs development, the detailed understanding of the parasite-host relationship in this infectious process needs to be elucidated. Thus, understand the role of standard recognition receptors as well as molecules of the parasite itself need to be known. In this work we evaluated the role of the β -glucan receptor, Dectin-1 in the immune response against *Plasmodium berghei*-ANKA. We observed that in the absence of this receptor, animals are more resistant to infection, presenting delayed death, attenuated clinical signs of cerebral malaria, and less parasitemia. These results converge to the hypothesis that *P. berghei*-ANKA interacts with Dectin-1 to modulate the immune response, in order to favor its replication, consequently inducing cerebral malaria. On the other hand, there are many reports of coinfections and treatments with antigens of different parasites as therapeutic measures against malaria. These protocols are based on the beneficial use of modulatory effects (activators or inhibitors) of parasitic origin molecules to control the disease. Here we use soluble antigen of *N. caninum* (NLA), an apicomplexan parasite, as those of *Plasmodium* genus, for treatment of cerebral malaria. It has been observed that NLA treatment rescues animals from characteristic early death of cerebral malaria. We associated this rescue to lower levels of IFN γ and increased levels of TNF α in animals treated with NLA. We concluded that both innate receptor Dectin-1 and proteins of soluble antigen of *N. caninum* are potential targets for the development of therapeutic measures against cerebral malaria.

Keywords: Dectin-1, Clec7a, *N. caninum*, NLA, Cerebral malaria

INTRODUÇÃO GERAL

De acordo com relatos da Organização Mundial da Saúde, foram registrados 212 milhões de novos casos de malária em todo o mundo no ano de 2015. Sendo que 90% dos casos ocorrem na região africana, seguido da região sudeste da Ásia (7%) e pela região do Mediterrâneo Oriental (2%). Ainda em 2015, foram relatados 429.000 mortes por malária em todo o mundo. A maioria das mortes também na região africana (92%), seguida pelo sudeste Asiático (6%) e mediterrâneo oriental (2%) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Embora significantes avanços tenham sido obtidos na busca pela erradicação da malária em países endêmicos, esta doença ainda continua sendo um grave problema de saúde pública. Nas regiões tropicais e subtropicais existem muitas áreas endêmicas, com alta porcentagem de indivíduos infectados em relação às demais áreas (WHITE et al., 2014; RECHT et al., 2017). Na América Latina, a maioria dos casos de malária ocorre na região amazônica (Figura 1) devido às condições geográficas favoráveis. Em revisão previa, foi detectado que 83% dos casos de malária das Américas ocorrem em quatro países: Brasil (24%), Venezuela (30%), Colômbia (10%), e Peru (19%) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Dentre estes países, o Brasil e Colômbia apresentaram uma redução no número de casos da doença, enquanto a incidência aumentou constantemente no Peru e Venezuela (RECHT et al., 2017).



Figura 1: Países da América do Sul endêmicos para malária. Brasil, Colômbia, Peru e Venezuela mostrados. A marcação verde indica áreas de floresta amazônica, onde são reportados a maioria dos casos de malária em cada país, exceto na Colômbia onde se tem grande contribuição da costa do pacífico para os casos de malária. As regiões da costa do Pacífico Colombiano e Costa do Caribe também estão marcadas de verde (RECHT et al., 2017).

A malária é causada em todo mundo por cinco espécies diferentes de *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. Knowlesi*. Na maioria das regiões endêmicas, a malária é causada pela infecção por *P. falciparum* ou *P. vivax*. A proporção em que cada uma das duas espécies infecta humanos depende da região geográfica, bem como da susceptibilidade da população (DAS et al., 2017; HOWES et al., 2011). Na África, existe uma predominância de indivíduos negativos para a molécula CD 234 – *Cluster of Differentiation* 234, também conhecida como *Duffy antigen* ou antígeno Fy. Nesta população existe uma predominância da infecção por *P. falciparum* sobre *P. vivax*, podendo ser explicada pela necessidade do merozoíto de *P. vivax* em se ligar ao antígeno Fy para invadir os eritrócitos. Desta forma, os indivíduos que não expressão a glicoproteína Fy seriam imunes à infecção por *P. vivax*, embora existam relatos de infecção por esta espécie em indivíduos negativos para Fy. Já em países da América latina como Brasil, Colômbia, Peru e Venezuela, onde não se tem uma predominância de humanos negativos para o antígeno Fy, existe uma maior proporção de indivíduos infectados por *P. vivax*, exceto em regiões com alta prevalência de indivíduos afrodescendentes (HOWES et al., 2011; RECHT et al., 2017).

Patogênese e síndromes associadas à malária

A malária é uma doença multifatorial e seu curso clínico depende de muitos aspectos como a genética do parasito e do hospedeiro, exposição previa ou não do hospedeiro ao parasito, idade, estado nutricional e fatores socioeconômicos e geográficos (GOHEEN et al., 2017; MILLER et al., 2013; SCHOFIELD et al., 2005; CLARK et al., 2006). Em indivíduos que não apresentam imunidade prévia ao parasito, os primeiros sintomas aparecem entre 7 e 15 dias pós infecção e são caracterizados por febre, dor de cabeça e muscular, vômitos e letargia. Geralmente tais sintomas são semelhantes ao de outras doenças, pelo fato que sua patogênese estar relacionada aos altos níveis citocinas circulantes. A ativação de células do compartimento inato e consequente inflamação sistêmica levam ao início dos sinais e sintomas da malária, e pode também influenciar no desenvolvimento das mais severas formas da doença. Em crianças com malária severa pode ocorrer o desenvolvimento de anemia, icterícia, dificuldade respiratória, acidose metabólica e doença renal. Em adultos, múltiplos órgãos podem apresentar suas funções comprometidas (WHO, 2014; GONÇALVES et al, 2014). Outro dado importante é o desenvolvimento de imunidade natural adquirida em áreas endêmicas, onde indivíduos são infectados diversas vezes pelo parasito. Nestes casos a parasitemia é baixa nestes indivíduos, não ocorrendo à ativação de

deletéria de células imunes inatas e a infecção é assintomática (GAZZINELLI et al., 2014).

Cada espécie de *Plasmodium* possui suas especificidades, causando manifestações clínicas bastante diferenciadas como observado entre *P. vivax* e *P. falciparum*. Entretanto durante as infecções por causadas por este gênero três principais eventos centrais caracterizam a patogenia da doença: A liberação de citocinas pró-inflamatórias, a adesão de eritrócitos infectados com *Plasmodium* nos vasos sanguíneos, principalmente cerebrais, bem como a ruptura e remoção destes eritrócitos infectados por macrófagos esplênicos, uma vez que durante o processo infeccioso os mesmos apresentam alterações na membrana plasmática. Estes eventos em conjunto são responsáveis pelas síndromes decorrentes da infecção (MILLER et al., 2013; SCHOFIELD et al., 2005; CLARK et al., 2006; GAZZINELLI et al., 2014).

Durante a fase aguda da infecção existe uma produção intensa de citocinas que ocorre principalmente por ação dos macrófagos e monócitos do baço. Tais macrófagos apresentam um papel crucial no reconhecimento e fagocitose de eritrócitos infectados. Este processo causa a exposição de grande número de parasitos que consequentemente levam à produção de altos níveis de mediadores pró- inflamatórios por células imunes (FRANKLIN et al., 2007; FRANKLIN et al., 2009; ATAIDE et al., 2014). Durante esta fase, indivíduos infectados apresentam frequentemente uma anemia intensa que se dá por pronunciada redução no número de eritrócitos que são eliminados por estarem infectados, bem como pelo efeito supressivo da hematopoese das citocinas pró-inflamatórias esplênicas (CHANG et al., 2004; AWANDARE et al., 2011).

Durante a fase sanguínea de replicação do parasito se tem um sincronização do crescimento do mesmo fazendo com que os picos de rompimento de eritrócitos sejam cíclicos. No caso das infecções causadas pelas espécies *P. vivax* e *P. falciparum*, as mais comuns nas infecções humanas, este ciclo ocorre a cada 48 horas, onde se tem elevadas concentrações de citocinas pirogênicas com IL-1 β e Fator de Necrose Tumoral (TNF α) que induzem o fenômeno da febre. Interessantemente, este evento não significa apenas um desconforto e mal estar ao paciente (calafrios, rigores, baixa pressão arterial, dor de cabeça e transpiração excessiva), mas é importante para restringir a proliferação parasito, que possuem preferência rigorosa de temperatura para crescimento (CLARK et al., 2006; CUNNINGTON et al., 2013; TAYLOR et al 2012; VAN DEN STEEN et al., 2013).

Como apresentado anteriormente, existe um grande número de indivíduos que sucumbem à infecção por parasitos *Plasmodium*. Grande parte deles devido ao comprometimento do sistema nervoso central, dentre outros órgãos. A patofisiologia deste

fenômeno se dá devido ao sequestro de eritrócitos parasitados em diferentes órgãos como pulmões, fígado, rins, placenta e cérebro (WHITE et al., 2013). A exposição de citocinas circulantes, em particular TNF α e IFN γ , ou de componentes liberados de eritrócitos infectados com *Plasmodium*, que reforçam a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais (MILLER et al., 2013; SCHOFIELD et al., 2005; CUNNINGTON et al., 2013). Outro fator importante neste mecanismo de adesão celular são os membros pertencentes à família de moléculas relacionadas proteínas de membrana de eritrócitos de *P. falciparum* (PfEMP1) (SCHERF et al., 2008) que são expressas na superfície de eritrócitos infectados que possuem a capacidade de interagir com diferentes moléculas distribuídas em diferentes órgãos e tecidos, como CD36 e molécula 1 de adesão intercelular (ICAM-1), molécula 1 de adesão celular endotelial de plaquetas (PECAM-1) e receptor de complemento-1. Sendo as moléculas CD36 e ICAM-1 importantes moléculas envolvidas no sequestro de eritrócitos parasitados no cérebro (WHITE et al., 2013; SHIKANI et al., 2012; IDRO et al., 2005).

Sumarizando, a inflamação sistêmica é um evento central nas síndromes associadas à malária. Tal evento ocorre por envolvimento de diferentes moléculas, tanto relacionadas ao parasita quanto ao hospedeiro. Assim, o entendimento dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia desta doença é imprescindível para busca de alvos terapêuticos.

Ciclo de vida de parasitos do gênero Plasmodium

A infecção do humano, hospedeiro intermediário, ocorre pela inoculação de esporozoítos na corrente circulatória através da picada da fêmea de *Anopheles* spp. durante o repasto sanguíneo (Figura 3). Os esporozoítos ganham a corrente circulatória e linfática chegando brevemente ao fígado onde invadem os hepatócitos e se transformam em esquizontes, maiores e multinucleados. Estes dividem por reprodução assexuada gerando milhares de merozoítos, uma fase que no *P. falciparum* dura seis dias, caracterizando a fase de desenvolvimento pré-eritrocítica. Com o rompimento dos hepatócitos infectados se tem a liberação de merozoítos na circulação. Estes por sua vez, invadem os eritrócitos e replicam até que estas células sejam lizadas, e os mesmos ganhem a circulação novamente para invadirem mais eritrócitos (KUHN et al., 2006; ENOMOTO et al., 2012).

Uma fração dos merozoítos formam os gametas (macrogametas e microgametas) que durante o repasto sanguíneo são aspirados pela fêmea de *Anopheles* spp. No estomago do inseto o microgameta sofre exflagelação e funde-se com o macrogameta, gerando o zigoto, que se diferencia em oocineto (forma móvel) que atravessa a parede do estomago do mosquito

e aloja-se na membrana basal diferenciando em oocisto e se desenvolvendo em esporozoítos. Ao lizarem a oocisto, os esporozoítos migram para a glândula salivar do inseto de onde invadem um novo hospedeiro intermediário (KUHN et al., 2006; DELVES et al., 2012).

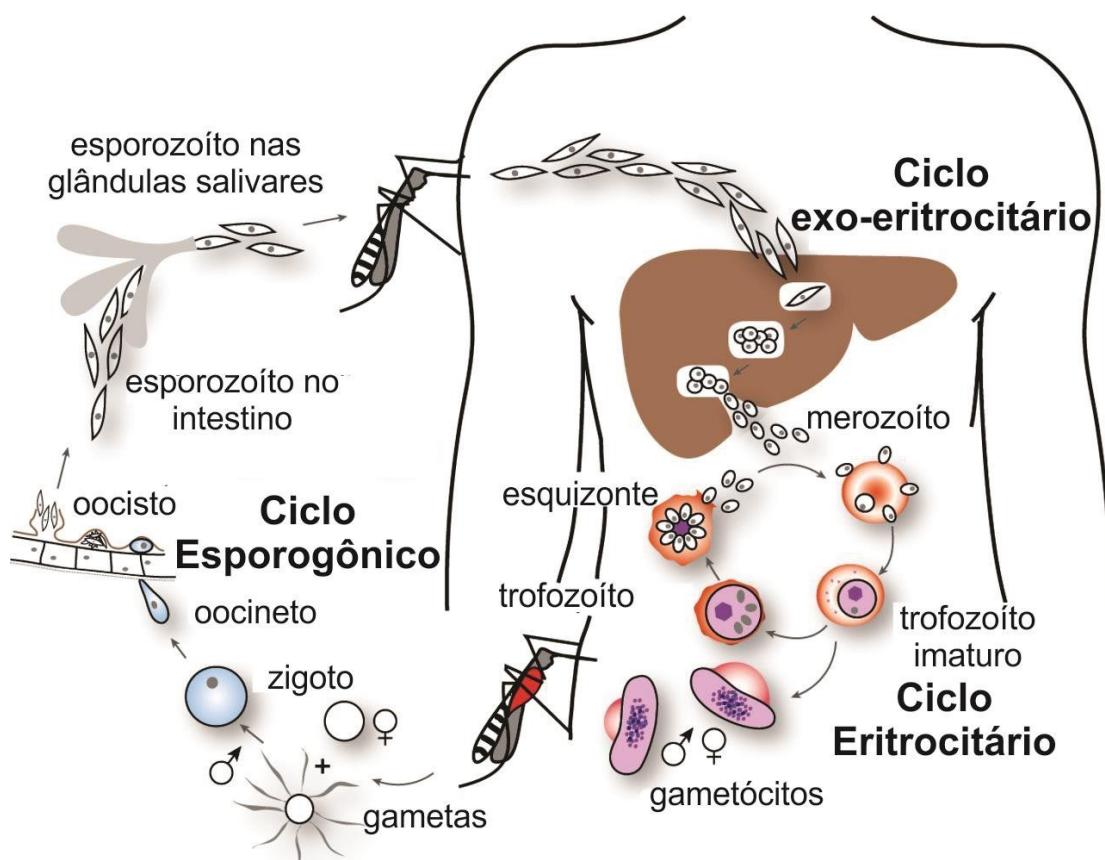


Figura 2: Ciclo biológico de *Plasmodium* sp. (Adaptado de COWMAN; BERRY; BAUM, 2012).

Vetor da malária

A transmissão da malária se dá através do repasto sanguíneo de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*. Dentre as diversas espécies deste vetor, o *Anopheles darlingi* é um dos mais importantes vetores da malária nas Américas. Assim, o conhecimento da ecologia e comportamento desta espécie é um importante passo para o desenvolvimento de medidas de controle da doença (HIWAT et al., 2011).

O vetor *A. darlingi* foi descrito em 1926 por Root e posteriormente nomeado por Dr. Samuel Taylor Darling (1872-1925), um grande conhecedor de doenças tropicais do inicio

do século XX. Esta espécie de mosquito tem ampla distribuição na América do Sul. Desde o sul do México ao norte da Argentina, do leste dos Andes até a costa do Atlântico (FORATTINI et al., 1987; DEANE et al., 1948; RACHOU et al., 1958; KOMP et al., 1958; HIWAT et al., 2011).

Existem poucos estudos sobre a biologia e comportamento deste mosquito, especialmente aqueles que buscam uma relação entre a espécie estudada e o papel desta na transmissão da malária em áreas endêmicas e epidêmicas (FORATTINI et al., 1987; DEANE et al., 1948; RACHOU et al., 1958; FORATTINI et al., 1962; ARAMBURÚ et al., 1999; FLORES-MENDONZA et al., 2004; MORENO et al.,

2007). Contudo, alguns estudos apresentam elementos importantes como a influência de padrões sazonais do *A. darlingi* com ciclos anuais de chuvas, bem como sua capacidade de transmissão. Esta espécie é considerada um bom vetor porque apesar de suas taxas de infecção possuir a tendência em ser baixas, mesmo em áreas de alto risco de malária, o mesmo apresenta ampla capacidade de manutenção da infecção como observado no ressurgimento da malária no Peru que foi atribuída a uma propagação do *A. darlingi* em novas áreas, mesmo os exemplares analisados apresentarem menos que 1% de infecção (FLORES-MENDONZA et al., 2004; SCHOELER et al., 2003).

Imunidade contra Plasmodium

Indivíduos que vivem em áreas endêmicas para malária, após várias infecções por *Plasmodium* podem desenvolver imunidade natural adquirida que pode ser observada pelos altos níveis de anticorpos merozoíticos específicos circulantes (MILLER et al., 2013; SCHOFIELD et al., 2005; RIELEY et al., 2013). Esta imunidade adquirida gera proteção, fazendo com que estes indivíduos apresentem uma baixa parasitemia e a doença pode ocorrer de forma assintomática. Tais anticorpos geram proteção através da neutralização de merozoítos, impedindo a infecção de eritrócitos, atuação no processo de opsonização de glóbulos vermelhos infectados e consequentemente eliminação destes eritrócitos por células do sistema monocítico fagocitário (RILEY et al., 2013; STEVENSON et al., 2004). Adicionalmente, estudos recentes têm mostrado que a neutralização de esporozoítos por anticorpos específicos, bem como células TCD8+ apresentam papel importante na resistência de humanos e camundongos durante a fase hepática da infecção por *Plasmodium* (RILEY et al., 2013; STEVENSON et al., 2004). Entretanto, não se sabe se esta imunidade contra esporozoítos também é importante em processos naturais de infecção ou se apenas em

protocolos vacinais (RILEY et al., 2013).

De qualquer forma, independente do estagio de vida do parasito, o mesmo apresenta antígenos que são capazes de induzir resposta pelo hospedeiro. Estudos tem descrito que esporozoítos apresentam capacidade de estimularem a expressão de genes de Interferons do tipo I em hepatócitos durante a replicação dentro dos vacúolos parasitóforos (LIEHL et al., 2014; MILLER et al., 2014). Estas moléculas possuem a capacidade de recrutarem células *Natural killer* (NK) e NKT, que são grandes produtoras de IFN γ , que por sua vez induz a expressão de proteínas importantes no controle da replicação do parasito. São exemplos destas moléculas, óxido nítrico (NO) e outros componentes tóxicos que interferem na esquizogonia do parasito no fígado (LIEHL et al., 2014; MILLER et al., 2014). Contudo, estes mecanismos de controle da replicação do *Plasmodium* nos hepatócitos acabam por não ser totalmente eficientes, e assim um esporozoíto dará origem a vários merozoítos que infectaram os eritrócitos dando origem à fase eritrocítica de replicação do *Plasmodium*, importante por causar os picos febris recorrentes, também chamado de paludismo (LIEHL et al., 2014; MILLER et al., 2014).

Durante a esta fase de replicação sanguínea do parasito, tanto em humanos quanto em camundongos, citocinas pró-inflamatórias induzidas por receptores do tipo Toll via NF κ B, bem como genes indutores de IFNs são regulados para maior expressão (FRANKLIN et al., 2009; SHARMA et al., 2011; SEXTON et al., 2004; OCKENHOUSE et al., 2006). Esta maior expressão de genes indutores de IFN γ é extremamente importante para uma resposta efetora contra protozoários, que se baseia em um padrão Th1. Maiores concentrações de IFN γ favorecem o controle da replicação do parasito por primar as células do sistema imune inato e promover uma resposta pró-inflamatória, ativando os mecanismos efetores de macrófagos (BASTOS et al., 2002; ARTAVANIS-TSAKONAS et al., 2002; WALTER et al., 2006; SPONAAS et al., 2009; ANTONELLI et al., 2014). Outro fator que reforça a importância deste padrão de resposta Th1 para controle da replicação parasitária foi mostrado através do tratamento de camundongos com a citocina IL-12 durante as fases hepáticas e sanguíneas da malária. Observou-se que os animais tratados foram protegidos de maneira dependente de IFN γ , TNF e óxido nítrico (SEDEGAH et al., 1994; STEVENSON et al., 1995). Em conjunto, os dados apresentados por diversos grupos de pesquisa convergem para o fato que não apenas a imunidade mediada por anticorpos específicos, mas também a imunidade dependente de células T é importante para o controle da carga parasitária e da malária.

Uma vez apresentado alguns mecanismos da imunidade inata contra infecção por *Plasmodium*, é importante ressaltar que um dos mais importantes papéis desta imunidade é a

ativação posterior de uma resposta adaptativa efetiva. Assim, as células dendríticas são importantes pilares nesta ponte de ligação (WYKES et al., 2008). Exemplo disto é a capacidade de moléculas de DNA em ativar células dendríticas via TL9 e outros sensores intracitoplasmáticos, induzindo a produção de citocinas que medeiam à resistência do hospedeiro frente à infecção (FRANKLIN et al., 2007; PICHYANGKUL et al., 2004; WU et al., 2014; ING et al., 2006; TORGLER et al., 2008; GOWDA et al., 2012; WYKES et al., 2007). Outro papel importante das células dendríticas é produção da citocina IL-12 que, por conseguinte induz a produção de IFN γ por células NK de forma dependente de MyD88 (Fator de Diferenciação Mielóide 88) (ING et al., 2006; TORGLER et al., 2008; GOWDA et al., 2012; WYKES et al., 2007). Processo este que resulta na polarização de uma resposta Th1 pelas células TCD4+, com produção de IFN γ , ativação de mecanismos efetores da imunidade inata, e principalmente manutenção do pool de células T de memória contra a infecção por *Plasmodium* (da SILVA et al., 2013). Linfócitos Th1 estão diretamente ligados ao *switch* de classe para secreção de IgG2a, que são anticorpos descritos previamente como protetores quanto a infecção por merozoítos de *Plasmodium* (SU; STEVENSON, 2002). Contudo, a falta de MyD88 ou mesmo de IL-12 afeta parcialmente o desenvolvimento de Th1, mas não elimina totalmente esta polarização. Assim fica claro que existem outros mecanismos dependentes de outros PRRs e moléculas adaptadoras que induzem a polarização de Th1 durante a infecção por *Plasmodium* (CRAMER et al., 2008).

As células dendríticas são também fontes de IFNs do tipo I. Entretanto o papel destas citocinas na resistência do hospedeiro contra *Plasmodium* ainda é pouco entendida. Por um lado, dados apresentam que IFN α medeia à resistência contra *Plasmodium chabaudi* em camundongos (GUERMONPREZ et al., 2013). Por outro, IFNs do tipo I modulam a função de células dendríticas impedindo o desenvolvimento de linfócitos em modelo de malária murina (HAQUE et al., 2011; HAQUE et al., 2014). Estes dados contraditórios, podem se explicar devido à capacidade de algumas cepas de *Plasmodium* subverterem a função das células dendríticas em camundongos, e desta forma reduzir a produção de IL-12 e o consequente desenvolvimento de uma imunidade dependente de células T (WYKES et al., 2007; PERRY et al., 2005).

De forma consistente com estes dados, a função de células dendríticas humanas é reduzida quando cultivadas com eritrócitos infectados ou hemozoína (pigmento malárico, um subproduto do metabolismo do *Plasmodium*) (URBAN et al., 1998). Adicionalmente, foi apresentado que pacientes humanos com malária sintomática por *P. falciparum* ou *P. vivax* possuem níveis reduzidos de células dendríticas circulantes, demonstrando que a modulação

de células dendríticas é um importante mecanismo de escape do sistema imune desenvolvido pelo parasito (GAZZINELLI et al., 2014).

Tratamento Malária

O tratamento da malária visa atingir o parasito em pontos chave de seu ciclo biológico: (1) Interrupção da esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestação clínica da doença; (2) destruição do parasito pelo uso de drogas que impedem o desenvolvimento de formas sexuadas do parasito das espécies *P. vivax* e *ovale*, evitando assim as recaídas tardias; (3) Interrupção da transmissão do parasito pelo uso de drogas que impedem o desenvolvimento de formas sexuadas do mesmo (BRASIL, 2010).

Nos diferentes países da América Latina diferenças em relação às drogas, doses e associações utilizadas, são observadas. Contudo, a premissa geral baseia-se nos seguintes protocolos. A cloroquina (CQ), droga largamente utilizada para o tratamento de estágios assexuais do parasito (esquizontes sanguíneos), sendo utilizada uma dose de 10 mg/kg no primeiro dia, seguido de 7,5 mg/kg nos dias dois e três de tratamento, totalizando uma dose de 25 mg/kg (BRASIL, 2010). A Primaquina (PQ), na dosagem de 3,5 mg/kg durante 7 a 14 dias, também tem sido utilizada em protocolos associativos com cloroquina para um tratamento de casos mais radicais da malária (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Além disso, outras associações envolvendo, por exemplo, Artemisinina, Mefloquina, também tem sido utilizadas (RECHT et al., 2017). Importante ressaltar que diversos fatores como: Idade do paciente, peso, estado nutricional, carga e espécie do parasito e gravidez devem ser considerados pelo médico no momento de montar um protocolo terapêutico.

Modelo murino para estudo da malária cerebral

Apesar da existência de diferentes protocolos de tratamento da malária atualmente, uma grande porcentagem dos indivíduos infectados por *P. falciparum* vão a óbito devido ao envolvimento do sistema nervoso central, na malária cerebral (RÉNIA et al., 2006). Tal fenômeno ocorre, porque muito pouco se sabe sobre os mecanismos imunes, bem como parasitários envolvidos na malária cerebral em humanos, por dificuldade de se estudar tais mecanismos neste modelo. Assim modelos animais têm sido cada vez mais empregados para tal finalidade (STELELS et al., 2014).

O modelo murino de malária cerebral (ECM), induzido por *P. berghei*-ANKA apresenta muitas similaridades à malária cerebral humana (CM), os quais incluem sequestro de eritrócitos infectados na barreira hematoencefálica, manguito perivascular, e sintomas neurológicos (RÉNIA et al., 2006; de SOUZA et al., 2010; HUNT et al., 2010). Adicionalmente, este modelo tem permitido o estudo de componentes isolados do sistema imune na infecção por *Plasmodium*. Exemplo disto é a remoção de células imunes como T e NKT, citocinas como IFN γ de camundongos através de diferentes técnicas e se observar que a ausência destes componentes induz proteção contra malária cerebral causada por *P. berghei*-ANKA (FAUCONNIER et al., 2010; AMANI et al., 2000; HERMSEN et al., 1997; BELNOUE et al., 2002; ENGWERDA et al., 2002). Tais estudos que permitem a compreensão dos elementos envolvidos na resposta imune contra *Plasmodium* proporcionam o desenvolvimento de potenciais tratamentos relacionados à regulação da imunidade (MARTINS et al., 2012; PENET et al., 2008; SERGHIDES et al., 2011; MORREL et al., 2011).

Adicionalmente, tais modelos animais nos permitem investigações dificilmente controladas em humanos como coinfecções. Diversos estudos tem apresentado dados interessantes sobre coinfecção de diferentes cepas de *Plasmodium* spp (NIIKURA et al., 2010; VOZA et al., 2005), com helmintos (HOCHMAN et al., 2012; AMANTE et al., 2010; BUCHER et al., 2011; SPECHT et al., 2010), vírus da leucemia murina (LP-BM5, semelhante ao quadro de AIDS) (HOCHMAN et al., 2012; ECKWALANGA et al., 1994), e que muitas vezes apresentam potenciais formas para o controle dos sinais neurológicos da malária.

Sem dúvidas, a infecção de camundongos da linhagem C57BL/6 com *P. berghei*-ANKA é amplamente utilizada como modelo murino para estudo da malária cerebral, uma das mais severas complicações da infecção por *Plasmodium* em humanos. Pois neste modelo de malária cerebral, camundongos exibem sintomas neurológicos como ataxia, convulsões, e/ou paralisia seguido de morte típica entre os dias 6 e 8 de infecção (BACCARELLA et al., 2014; COBAN et al., 2007). Em adição, a infecção desta linhagem de camundongos por *P. berghei* tem sido também utilizado como modelo para estudo de patologias associadas ao fígado, pulmão e baço, também órgãos afetados na malária. (OCA et al., 2013; HUANG et al., 2015).

JUSTIFICATIVA

A malária é um problema urgente de saúde pública. Existe uma estimativa de que no ano de 2016 houve 438.000 mortes por malária no mundo (WHO, 2016). As mortes por malária, em sua grande parte, são causadas pela infecção por *P. falciparum* (CHENETTE, 2017).

Estima-se que desde 2000 a malária custou cerca de U\$ 300 milhões por ano aos países da África subsaariana, gerando um custo de 1,3% do PIB destes países. Nos países de maior incidência, pode ser a responsável pelos gastos de 35% da saúde pública (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). No Brasil, entre os anos de 2008 e 2013 foram relatados 17.028.725 casos em 9 estados, onde Amazonas, Acre e Pará tiveram maior prevalência, enquanto Amapá, Mato Grosso e Tocantins os menos incidentes. A região Norte apresenta o maior número destes casos (PRETTZ et al., 2015).

Visto o grande impacto desta doença, o desenvolvimento de medidas terapêuticas se torna indiscutível. Fato evidenciado desde 1950, quando a Organização Mundial da Saúde lançou o programa de erradicação global da malária, mas que até então não teve seus objetivos atendidos na íntegra (RUSSELL et al., 2013). Mas para que protocolos eficientes de tratamento sejam desenvolvidos, o entendimento de mecanismos ligados ao hospedeiro e também ao parasita é primordial.

Portanto, no primeiro capítulo deste trabalho nós buscamos elucidar o papel do receptor imune inato Dectina-1 durante a infecção por *P. berghei*-ANKA. Uma vez que este receptor já foi descrito como importante no reconhecimento imune frente à infecções causadas por fungos, bactérias (SAIJO et al., 2007; WERNER et al., 2009) e mesmo protozoários como *N. caninum* e *T. gondii* filogeneticamente relacionados ao *Plasmodium* (SILVA et al., 2017).

Adicionalmente, fenômenos relacionados aos parasitos como proteção por mecanismos de reatividade cruzada são frequentemente observados. E tem sido explorados com frequência como o uso de antígenos solúveis de *T. gondii* no tratamento da malária cerebral experimental (SETTLES et al., 2014). Assim, buscamos no segundo capítulo deste trabalho estudar o potencial terapêutico de Antígenos Solúveis de *N. caninum* no tratamento da malária cerebral.

CAPITULO I

**O receptor Dectina-1 como Alvo para o Desenvolvimento de Terapias contra
Malária Cerebral Murina**

INTRODUÇÃO

Receptores do tipo Lectina C

Os receptores lectinicos do tipo C (CLRs) estão associados ao reconhecimento de carboidratos. Tal fenômeno ocorre através da ligação de *motifs* presentes no domínio do tipo lectina C (CTLD), tais como EPN (que confere a ligação de manose, N-acetilglucosamina, L-fucose e glicose) e QPD (que reconhece galactose e N-acetilgalactose) (DRICKAMER et al., 2002; ZELENSKY et al., 2005). Tais receptores apresentam também a capacidade de reconhecer β -glucanos, e muitos outros ligantes como proteínas e lipídeos, através de mecanismos que ainda não foram completamente entendidos (DRICKAMER et al., 2002; ZELENSKY et al., 2005). Os CLRs são expressos primariamente em células de origem mieloide onde desempenham muitos papéis, sendo o reconhecimento de padrões moleculares sua função mais especializada. Após interação destes com padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), danos próprios (DAMPs), ou alterações próprias como tumores (TAMPs) levam à ativação ou modulação de mecanismos imunes.

Didaticamente estes receptores podem ser agrupados em dois grandes grupos: Os CLRs que induzem sinalização intracelular via ativação baseada em *motif* de tirosina (ITAM), como Dectina-1, Clec2, e DNLR-1. Ou via moléculas adaptadoras como FcR γ , no caso Dectina-2, CLECSF8 e Mincl (KERRIGAN et al., 2011; SANCHO et al., 2012).

Dectina-1, também conhecido como CLEC7A (GOODRIDGE et al., 2011) foi o primeiro e melhor estudado receptor de reconhecimento padrão não pertencente à família dos TLRs. Seu estudo tem revolucionado o entendimento da imunidade contra doenças fúngicas. Este receptor reconhece β -glucanos, um carboidrato presente na parede de células de espécies de fungos, sendo importante para imunidade protetora contra espécies patogênicas como *Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis* e *Coccidioides* (HARDISON et al., 2012). A ativação de Dectina-1 requer o *cluster* na sinapse fagocítica (GOODRIDGE et al., 2011), o qual induz a via de sinalização baseada na fosforilação de tirosina ITAM e ITAM-like, subsequente ativação de CARD9-Bcl10-Malt1 (CBM) através de PKC δ (DRUMMOND et al., 2013). A estimulação desta via de sinalização por Dectina-1 via independente de SyK, como a mediada por Raf-1, resulta na ativação de vários fatores de transcrição como NFAT, IRF1, IRF5, bem como NF κ B de forma canônica e não (p65, RelB, c-Rel, p50, p52 (PLATO et al., 2013; GOODRIDGE et al., 2009; STRASSER et al., 2009; WEVERS BRIGITE et al., 2014).

A sinalização por Dectina-1 regula numerosas respostas celulares, incluindo fagocitose, autofagia, *burst* respiratório, produção de lipídeos inflamatórios e numerosas

citocinas e quimiocinas, incluindo a polarização para Th17 com citocinas IL-23, IL-6, IL-1 β (HARDISON et al., 2012; MA et al., 2014). Dectina-1 também está relacionada à notável produção de IL-1 β , envolvido na ativação de inflamossoma, NLRP3/caspase-1 e não canônico inflamossomas ligados à caspase 8 (HARDISON et al., 2012; GOODRIDGE et al., 2009; GRINGHUIS et al., 2012; HISE et al., 2009). Adicionalmente, foi apresentado que Dectina-1 pode também estar relacionada com a indução da produção de interferons do tipo I na resposta a infecções por fungos como *Candida albicans*, através de IRF5, sendo crítico para uma resposta imune protetora em camundongos (DEL FRESNO et al., 2013). Outro grupo, entretanto, encontrou que esta citocina está relacionada à maior susceptibilidade a infecção por *C. glabrata* (BOURGEOIS et al., 2012). Outro fator importante é a capacidade de Dectina-1, sinalizando via Raf-1, induzir memória inata por reprogramação epigenética em monócitos, um significante avanço para futuros protocolos vacinais (QUINTIN et al., 2012; SAEED et al., 2014).

Estrutura do Receptor Dectina-1

Análises estruturais de Dectina-1 o classificam como uma proteína transmembrana do tipo II composta por um domínio lectina tipo-C (C-terminal) na superfície externa da membrana plasmática, uma região “stalk”, um único domínio transmembrana, e uma cauda intracitoplasmática de 40 aminoácidos (ARIIZUMI et al., 2000) (Figura 3). Esse receptor é expresso principalmente por células de origem mielóide, incluindo macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. Dectina-1 também foi identificado em linfócitos B e T, contudo este receptor em células da imunidade adaptativa é aparentemente não funcional (WILLMENT et al., 2005).

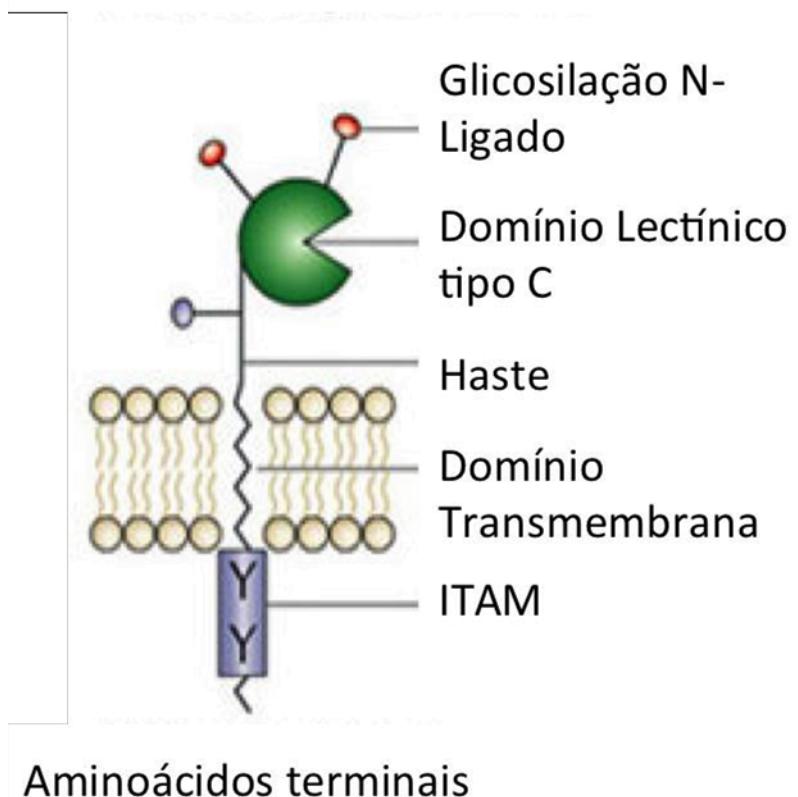


Figura 3: Representação Esquemática do Receptor Dectina-1.

Adaptado

de:

BROWN (2006).

A ativação da sinalização intracelular por este receptor assemelha-se a sinalização induzida por receptores de células T (TCRs), células B (BCRs) e receptores de Fc (FcR), que induzem a ativação de proteínas baseada em resíduos de tirosina (ITAMs). Entretanto Dectina-1, diferentemente dos demais receptores baseados em tirosina, apresenta apenas uma única sequência YXXL denominada de “hem-ITAM”, o que faz com este receptor necessite da formação de dímeros para induzir a ativação da cascata intracelular. A formação destes dímeros de receptor é facilitada pela flexibilidade dos constituintes da membrana plasmática. Após interação receptor-ligante (β -glucanos), se tem a formação de um dímero de Dectina-1 que fornece duas regiões com tirosina capaz de ativar a proteína Src (que apresenta dois sítios de ligação com tirosina) e consequentemente ativa Syk, dando sequencia a cascata de sinalização via Dectina-1 (Figura 4).

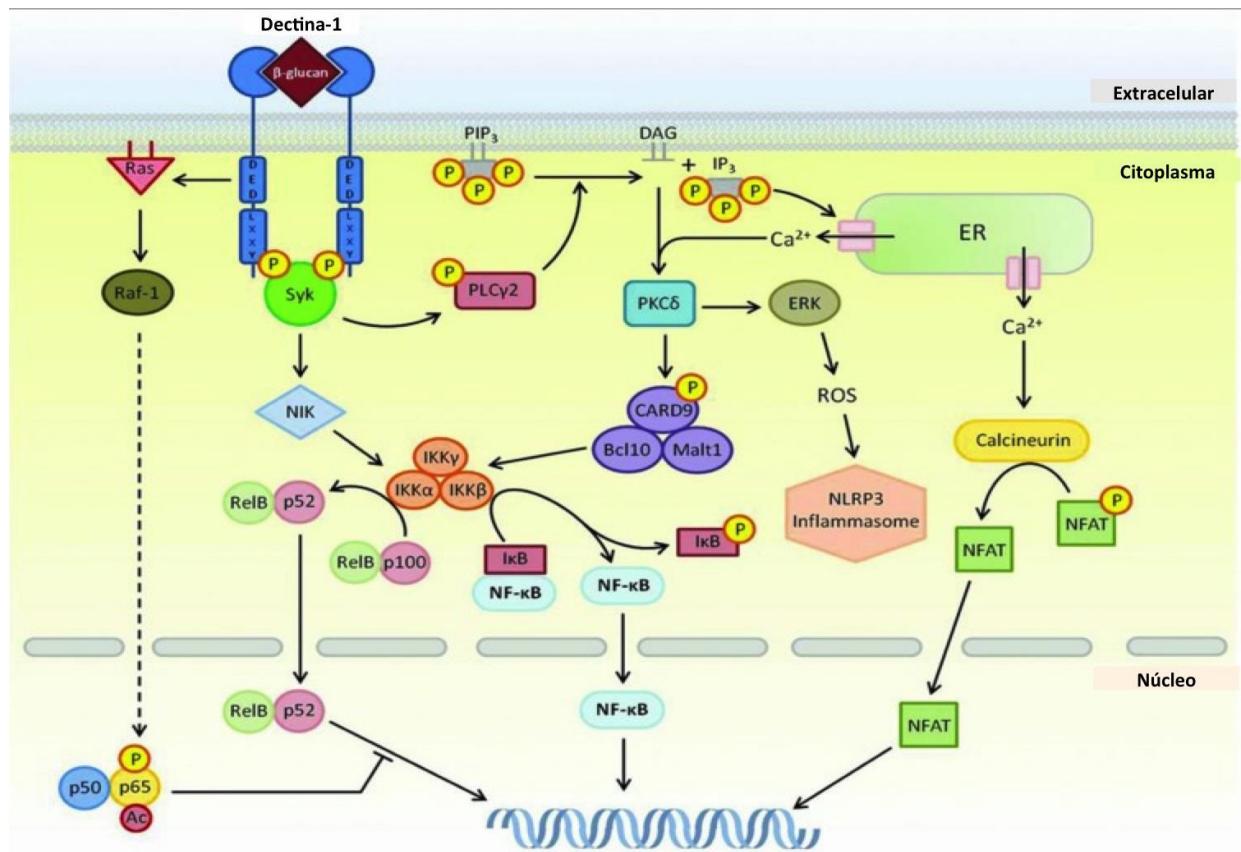


Figura 4: Network de sinalização do receptor Dectina-1. Após interação Receptor/Padrão Molecular várias vias de sinalização podem ser ativadas, culminando na ativação final dos fatores de transcrição NFAT e NF κ B para indução da expressão de genes relacionados à citocinas e quimiocinas. Adaptado de PLATO; WILLMENT; BROWN (2013).

Dectina-1 nas diferentes infecções

Uma vez caracterizado o papel de Dectina-1 na resposta imune contra infecções fúngicas, microrganismos os quais este receptor foi inicialmente estudado. Uma breve revisão de trabalhos que objetivaram avaliar o papel de Dectina-1 em diferentes protocolos infecciosos foi realizada. Curiosamente, a maioria dos trabalhos científicos demonstram a grande importância de Dectina-1 na indução de resposta contra fungos, até mesmo pelas características estruturais dos mesmos, possuindo ampla glicosilação (GEIJTENBEEK et al., 2016). Dectina-1 está relacionado ao reconhecimento de 1,3 β -glucano presente na estrutura de fungos que acometem humanos: *Aspergillus fumigatus* (CHAMILOS et al., 2010), *C. albicans* (GRINGHUIS et al., 2009; GRINGHUIS et al., 2010; WEVERS et al., 2014; GRINGHUIS et al., 2011; TOTH et al., 2013), *Candida lusitaniae*, *Candida nivariensis* (GRINGHUIS et al., 2012; GRINGHUIS et al., 2011), *Candida parapsilosis* (TOTH et al., 2013), *Fonsecaea monophora* (WEVERS et al., 2014), *Histoplasma capsulatum* (CHAMILOS et al., 2010), e camundongos: *A. fumigatus* (GESSNER et al., 2012), *C. albicans* (LEIBUNDGUT-LANDMANN et al., 2007), *Coccidioides immitis* (VIRIYAKOSOL et al., 2013), *Coccidioides posadasii*, *H. capsulatum* (WANG et al., 2014), *Paracoccidioides brasiliensis* (LOURES et al., 2015), *Trichosporon asahii* (HIGASHINO-KAMEDA et al., 2015).

É evidente a importância de Dectina-1 nas infecções fúngicas. Entretanto, o padrão molecular reconhecido pela região CTLD deste receptor são β -glucanos, mais especificamente, 1,3 e 1,6 β -glucanos. Molécula altamente frequente na natureza, sendo expressa nas mais diferentes espécies como bactérias (MCINTOSH et al., 2005; VAN DEN BERG et al., 2012), fungos (HAN et al., 2008), e leveduras (MURAMATSU et al., 2017). Visto a grande diversidade de espécies que apresenta em sua constituição molecular este composto glicídico, muitos grupos de pesquisa tem se dedicado ao estudo do papel deste receptor nos diferentes processos infecciosos.

Alguns estudos apresentam que Dectina-1 possui também papel importante nas infecções causadas por *Mycobacterium tuberculosis*, estando relacionada com a polarização de linfócitos para um perfil Th17, importante no controle da infecção (BALBOA et al., 2016).

Sua participação na resposta imune contra protozoários também tem sido objetivo de estudo de alguns grupos. Recentemente, foi observado que este receptor, via ativação de Src e SyK tem papel importante na indução de espécies reativas de oxigênio (ROS) durante a infecção experimental por *Leishmania amazonenses*, culminando na ativação

de inflamossoma, molécula envolvida com a restrição da replicação deste protozoário. Tal fenômeno foi evidenciado em experimentos utilizando camundongos nocauteados para o gene *Clec7a*, gene que codifica a expressão de Dectina-1. Demonstraram o crítico papel deste receptor na indução da ativação de inflamossoma e consequente restrição da replicação do parasito em macrófagos *in vitro*, bem como maior resistência de camundongos Dectina-1^{-/-} frente à infecção por *L. amazonenses* (LIMA-JUNIOR et al., 2017).

Ainda em relação à participação de Dectina-1 na indução de resposta imune efetora contra protozoários, nosso grupo demonstrou recentemente que este receptor está envolvido na modulação da resposta imune frente à infecção por *Neospora caninum*, uma vez que camundongos Dectina-1^{-/-} são mais resistentes a infecção (SILVA et al., 2017). Não obstante, durante a infecção por *Toxoplasma gondii*, outro protozoário estreitamente relacionado com *N. caninum* e *Plasmodium spp.*, nenhuma importância em relação à susceptibilidade, carga parasitária, produção de citocinas foi observado nos experimentos com diferentes cepas e vias de infecção em camundongos selvagens e Dectina-1^{-/-} (SILVA et al., 2017).

OBJETIVOS

O objetivo deste capítulo foi avaliar o papel do receptor Dectina-1 durante a infecção *in vivo* por *Plasmodium berghei* – ANKA em modelo de malária cerebral murina;

Especificamente:

- Monitorar diariamente os sinais clínicos de malária cerebral, peso corporal e sobrevida de camundongos WT e Dectina-1^{-/-} frente à infecção por *P. berghei* – ANKA;
- Avaliar possíveis alterações cerebrais, macroscópicas e microscópicas, decorrentes do modelo de malária cerebral murina em camundongos WT e Dectina-1^{-/-} desafiados com *P. berghei* – ANKA;
- Determinar a expressão e níveis séricos das citocinas: IFN α , IFN β , IFN γ e IL-10 durante a infecção por *P. berghei* – ANKA;
- Avaliar a carga parasitária hepática e níveis séricos dos marcadores de lesão tecidual hepática, AST e ALT durante a infecção por *P. berghei* – ANKA;
- Monitorar periodicamente a parasitemia em camundongos WT e Dectina-1^{-/-} infectados com *P. berghei* – ANKA;
- Avaliar o perfil hematológico de camundongos WT e Dectina-1^{-/-} desafiados com *P. berghei* – ANKA;

METODOLOGIA

Declaração ética

Todos os estudos que envolveram camundongos foram previamente aprovados pela Comissão de ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU), sob protocolo de número 153/16 (ANEXO I). Todo o manejo e cuidados com bem estar animal foram realizados em concordância com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de experimentação Animal (CONCEA) através das resoluções normativas publicadas em seu eBook (http://www.mct.gov.br/upd_blob/0238/238271.pdf). Os animais foram mantidos no

Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da UFU (CBEA-UFU) que possui inscrição no CONCEA (CIAEP: 01.0105.2014) e na Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio (CQB: 163/02).

Animais

Para desenvolvimento de experimentos deste capítulo, nós utilizamos camundongos da linhagem C57BL/6 do tipo selvagem (WT) e geneticamente deficientes em no receptor Dectina-1 – alteração genética no gene CLEC7A – (Dectina-1^{-/-}), com idade entre 6-8 semanas. Todos os camundongos foram nascidos e mantidos durante todo o período experimental no CBEA/UFU, em grupos de no máximo cinco animais por micro-isolador, ciclo claro e escuro de 12 horas, ração e água *ad libitum*.

Manutenção do Parasito

Para manutenção da cepa *P. berghei* – ANKA - GFP+ (SANCHEZ, B. A. M et al 2007) foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c. A cada sete dias, coletou-se uma amostra de sangue do animal infectado e inoculou-se em outro animal durante o período em que se necessitou de parasitos para realização de experimentos. Para infecção experimental, uma amostra de aproximadamente 200 µL foi coletada do plexo retro-orbital de camundongos infectados com *P. berghei* – ANKA (parasitemia entre 8 e 12%). Posteriormente se realizou a determinação da porcentagem de hemárias parasitadas através de citometria de fluxo e a quantidade 1×10^6 hemárias parasitadas foram inoculadas em animais a serem desafiados.

Parâmetros Bioquímicos

As análises bioquímicas foram realizadas com kits comerciais (Labteste®, Lagoa Santa, Brasil) utilizando amostras de soro de camundongos WT e Dectina-1^{-/-} infectados ou não com *P. berghei* – ANKA no sexto dia de infecção. A função hepática foi determinada através da quantificação das enzimas marcadoras de lesão hepática: Alanina transaminase (ALT) e Aspartato transaminase (AST). Para avaliação clínica laboratorial da função renal foram determinadas as concentrações séricas de Ureia. O índice glicêmico foi determinado através da glicemia.

Quantificação de Citocinas

A determinação de todas as citocinas foi realizada o sexto dia de infecção. IFN γ solúvel foi quantificado em amostras de soro de camundongos WT e Dectina-1^{-/-} infectados ou não com *P. berghei*-ANKA. Para isso, amostras de sangue foram coletadas através de punção do plexo retro-orbital, centrifugados à 2000 x g, temperatura ambiente, e o soro estocado a -70C até a data do ensaio de ELISA, que foi realizado de acordo com instruções do fabricante (Opteia set, BD Biosciences). A expressão de IFN α e IFN β foi determinada por RT-PCR em amostras de fígado.

Extração de RNA para ensaios de expressão gênica

A extração do RNA total de tecidos foi realizada utilizando-se amostras de 100 mg de tecido coletadas e armazenadas em 500 μ l de reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA). Em seguida, foram adicionados 150 μ l de clorofórmio, os tubos foram agitados por inversão, incubados por 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugados a 13.000 rpm por 15 minutos. Foi coletado o sobrenadante para adição de 600 μ l de isopropanol gelado e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 1 ml de etanol 75%. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado para posterior secagem e diluição do pellet em água livre de DNase e RNase. A leitura foi feita a 260nm em espectrofotômetro.

As amostras foram ajustadas para 3 μ g em 50 μ l e foi adicionado 5 μ l de MgCl₂ e

1 µl de DNase para remoção do DNA contaminante. Em seguida, foram incubadas a 37°C por 15 minutos e após este período foi acrescentado 25 µl de Trizol e 25 µl de clorofórmio, com posterior centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos. Foi coletado o sobrenadante e adicionado ao mesmo 20 µl de Acetato de Sódio (3M, pH 5,2), 1 µl de glicogênio para precipitação do RNA e 150 µl de etanol. As amostras foram centrifugadas novamente por 13.000 rpm por 15 minutos e descartou-se o sobrenadante para secagem e diluição do pellet em água livre de nuclease. Por fim, realizou-se uma nova leitura em espectrofotômetro na razão 260/280 nm.

Síntese do cDNA por transcrição reversa

A síntese do cDNA a partir do RNA foi realizada por meio do kit comercial *GoScript™ Reverse Transcription System* (Promega, Madison, EUA). 1µg de RNA tratado com DNase foi diluído em 4 µl de água livre de DNase e RNase e foi adicionado 1 µl de primer Oligo (dT) para incubação a 70°C por 5 minutos. Após a incubação, as amostras foram colocadas imediatamente em banho de gelo por 10 minutos e procedeu-se o preparo do mix, constituído por 4 µl do Tampão de Reação (5x) da transcriptase reversa, 3,5 µl de MgCl₂, 1 µl de mix de dNTPs, 0,5 µl de inibidor de ribonuclease, 1 µl de transcriptase reversa e 5 µl de água livre de nucleases. O mix foi adicionado ao RNA para realização dos ciclos da reação de RT- PCR (25°C por 5 minutos, 42°C por 1 hora e 70°C por 15 minutos) e posterior obtenção do cDNA.

O experimento de expressão gênica foi realizado através do sistema de detecção SYBR green (Promega, Madison, EUA) utilizando como controle endógeno a quantificação do transcrito do gene gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (GAPDH) como previamente descrito (COLLANTES-FERNANDEZ et al., 2002) no equipamento *7500 Real time PCR System* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, EUA). Após obtenção do cDNA por transcrição reversa, foi adicionado ao mesmo o master mix do kit bem como os primers específicos para IFN-α , IFN-β e GAPDH. **IFN-α:** Forward: 5'- TGT CTG ATG CAG CAG GTGG - 3'; Reverse: 5'- AAG ACA GGG CTC TCC AGAC -3'. **IFN-β:** Forward: 5'-AAG AGT TAC ACT GCC TTT GCC ATC - 3'; Reverse: 5'- CAC TGT CTG CTG GTG GAG TTC ATC -3'. **GAPDH:** Forward: 5'- CTC GTC CCG TAG ACA AAA TGG-3'; Reverse: 5'-AAT CTC CAC TTT GCC ACT GCA (BRONEVETSKY et al., 2013).

Com a adição do mix e dos primers, as amostras foram submetidas às condições de ciclagem, sendo o primeiro para ativação da DNA polimerase (10 minutos a 95°C), o segundo 40 ciclos de desnaturação (95°C por 15 segundos), o terceiro para anelamento dos primers e extensão (62°C por 1 minuto) e o quarto para verificar a especificidade da reação para um único “amplicon” (95°C por 15 segundos; 60°C por 20 segundos e 95°C por 15 segundos).

Após o fim da reação, os dados obtidos foram analisados pelos valores do *Cycle Threshold (Ct)*, pelo método de expressão relativa já descrito (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), normalizado com GADPDH e tendo como parâmetro de comparação os valores de expressão gênica de camundongos WT e Dectina-1^{-/-} não infectados.

Determinação da Parasitemia

Uma gota de sangue (aproximadamente 3 µL) obtida através de punção da cauda de camundongos WT e Dectina-1^{-/-} infectados ou não com *P. berghei*-ANKA- GFP+ foi diluída em 300 µL de solução salina (PBS) para análises de citometria de fluxo. Todas as amostras foram lidas em aparelho FACs Canto II (Becton Dickinson, São José, California) com excitação pelo laser de 488nm. Eritrócitos foram primeiramente identificados por suas especificidades de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) e um total de 50.000 eventos foram adquiridos de cada amostra. Para discriminação dos eritrócitos infectados, a porcentagem de células GFP+ dentro da *gate* de eritrócitos foi determinada.

Determinação do Parasitismo Tecidual

O Parasitismo tecidual foi determinado em amostras de fígado de camundongos WT e Dectina-1^{-/-} no sexto dia de infecção com *P. berghei*-ANKA por real time PCR quantitativo (qPCR) conforme descrito anteriormente, com modificações (RIBEIRO et al., 2009). Pares de Primer foram desenhados para a região 18S de *P. berghei* (sense: 3-AAGCATTAAATAAAGCGAATACATCCTTAC-5; anti-sense: 3-GGAGATTGGTTTGACGTTATGTG-5) e utilizados nos ensaios de detecção pelo sistema *SYBR green* (PromegaCo., Madison, WI, USA). A extração de DNA foi realizada através de Kit comercial (Wizard SV Genomic DNA Kit, Promega) em amostras de 50 mg de tecido

hepático murino, de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de DNA foram determinadas em 260 nm (Nanodrop Lite, Thermo Scientific) e ajustado para 200 ng/uL em água livre de DNase. Os ensaios para determinar a carga parasitária no fígado foram realizados através em termociclador com leitura em tempo real (StepOnePlus, Thermo Scientific).

Sobrevivência e Morbidade

Camundongos WT e Dectina-1^{-/-} infectados ou não com *P. berghei*-ANKA foram acompanhados diariamente por vinte dias. Para análise de morbidade foram realizadas pesagens dos animais nos dias 0, 3, 6, 7 pós-infecção. Para verificação dos sinais clínicos relacionados à malária cerebral, os animais foram observados do dia zero ao vigésimo quanto à manifestação de ataxia, paralisia, desvio de cabeça, convulsões. Quando determinado grau de sofrimento (sinais de dor, inanição, perda de mais de 20% do peso corporal), os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical como método *end point*, seguido recomendações internacionais de experimentação animal.

Histopatologia e Integridade da Barreira Hematoencefálica

A caracterização histopatológica dos eventos associados à malária cerebral foi ilustrada através da presença ou não de manguito perivascular, obstrução de vasos e áreas de necrose. Para isto, os cérebros de camundongos WT e Dectina-1^{-/-} infectados ou não com *P. berghei*-ANKA foram coletados no sexto dia de infecção e fixados em solução salina contendo 10% de paraformaldeído (pH 7.4), posteriormente incluídos em parafina e realizados cortes de 5 µm para coloração por Hematoxilina e Eosina. As láminas foram então avaliadas através de microscopia de luz (SILVA et al., 2017). A integridade da barreira hematoencefálica foi determinada pelo método de Azul de Evans conforme descrito previamente (HED et al., 1983).

Testes Hematológicos

As análises hematológicas para determinação de leucócitos totais, eritrócitos, hemoglobina, linfócitos totais e hematócrito, foram realizadas em amostras de 200 µL de

sangue coletadas do plexo retro-orbital de camundongos WT e Dectina-1^{-/-} no sexto dia de infecção por *P. berghei*-ANKA. As análises foram realizadas de forma automatizada (ABX Micros hematology analyzer – Automated abc Vet Analyzer).

Análises Estatísticas

Para todos os cálculos estatísticos e confecção dos gráficos foi utilizado o software *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Os testes de Long-rank (Mantel-Cox) seguido de Gehan-Breslow-Wilcoxon foram utilizados para estimar a porcentagem de camundongos sobreviventes em cada ponto após o desafio. Diferenças entre os grupos na análise de dosagem de citocinas, alterações de peso corporal e carga parasitária foram analisadas pelo teste paramétrico ANOVA ou teste *t* de student ou teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, quando apropriado, utilizando o teste de comparação múltipla de Bonferroni ou Dunn, respectivamente, para examinar comparações entre pares de grupos selecionados. Todos os resultados foram expressos em média e desvio padrão (SD) ou erro padrão da média (SEM), e considerados significativos para um nível de $p < 0,05$.

RESULTADOS

A ausência de Dectina-1 induz aumento na resistência contra a infecção por *P. berghei* – ANKA

Dectina-1 é um receptor inato associado ao reconhecimento de β -glucanos. Seu papel é bastante conhecido em infecções por fungos, bactérias e alguns protozoários. Em estudos prévios desenvolvidos por nosso grupo apresentamos que Dectina-1 está diretamente associada à resistência durante a infecção pelo protozoário, também Apicomplexa, *N. caninum*, mas é dispensável durante a infecção por *T. gondii* (SILVA et al., 2017). Visto isso, avaliamos se Dectina-1 seria requerido durante a infecção por *P. berghei*–ANKA. Para tal, camundongos WT e Dectina-1^{-/-} foram infectados com dose letal de *P. berghei*–ANKA e acompanhados durante 20 dias. Nós encontramos que camundongos Dectina-1^{-/-} são mais resistentes à infecção (Figura 5A), uma vez que camundongos WT sucumbem à infecção previamente aos Dectina-1^{-/-}. Juntamente com as análises de sobrevida, a morbidade também foi avaliada através de monitoramento do peso corporal e sinais clínicos de malária cerebral. Nossos resultados apresentaram que a ausência de Dectina-1 reduz os sinais clínicos da malária cerebral como paralisia, lateralização de cabeça e convulsões (Figura 5C), contudo não interfere no peso corporal (Figura 5B).

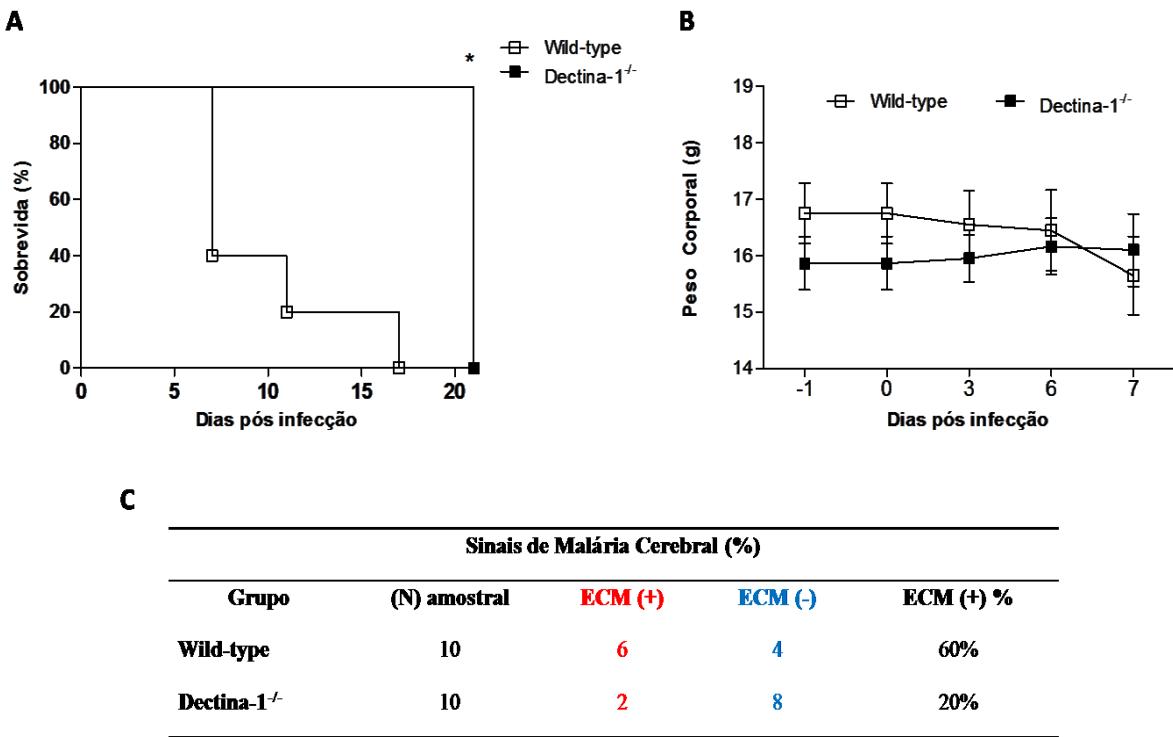


Figura 5: A ausência de Dectina-1 protege camundongos contra infecção por *P. berghei*-ANKA. Camundongos selvagens e Dectina-1^{-/-} foram infectados com 1×10^6 (intraperitoneal) hemácia parasitadas de *P. berghei*-ANKA para análises de sobrevida, peso corporal e sinais de malária cerebral experimental (ECM). (A) curva de sobrevida (10 animais/grupo). As diferenças em relação aos grupos foram compradas utilizando os testes de Kaplan-Mieir, seguido de Mantel-Cox. (B) Monitoramento do peso corporal (10 animais/grupo). (C) Avaliação de sinais clínicos da ECM em porcentagem. Os resultados são representativos de três experimentos independentes e expressos como média \pm SD. * Indica diferenças estatisticamente significantes, em que $p < 0.05$.

Dectina-1 participa da patogênese da malária cerebral

Uma vez observado que camundongos Dectina-1^{-/-} apresentam maior taxa de sobrevida associada com redução dos sintomas da malária cerebral, nosso próximo passo foi avaliar possíveis alterações de permeabilidade de barreira hematoencefálica, pelo teste de azul de Evans, bem como alterações microscópicas pela coloração por Hematoxilina e Eosina em camundongos WT e Dectina-1^{-/-} infectados ou não com *P. berghei*-ANKA. Nossos resultados demonstraram que camundongos Dectina-1^{-/-} apresentam maior integridade da barreira hematoencefálica quando infectados, tal fenômeno ficou evidenciado pelo menor extravasamento de Azul de Evans para o parênquima cerebral, diferentemente do observado em camundongos WT, (Figura 6). Adicionalmente, camundongos WT apresentam maior obstrução de vasos, manguitos perivasculares evidentes e áreas de necrose ao exame microscópio do cérebro (Figura 7). Estes resultados em conjunto sugerem que o receptor Dectina-1 está associado a alterações na barreira hematoencefálica e consequentemente desenvolvimento da patologia da malária cerebral.

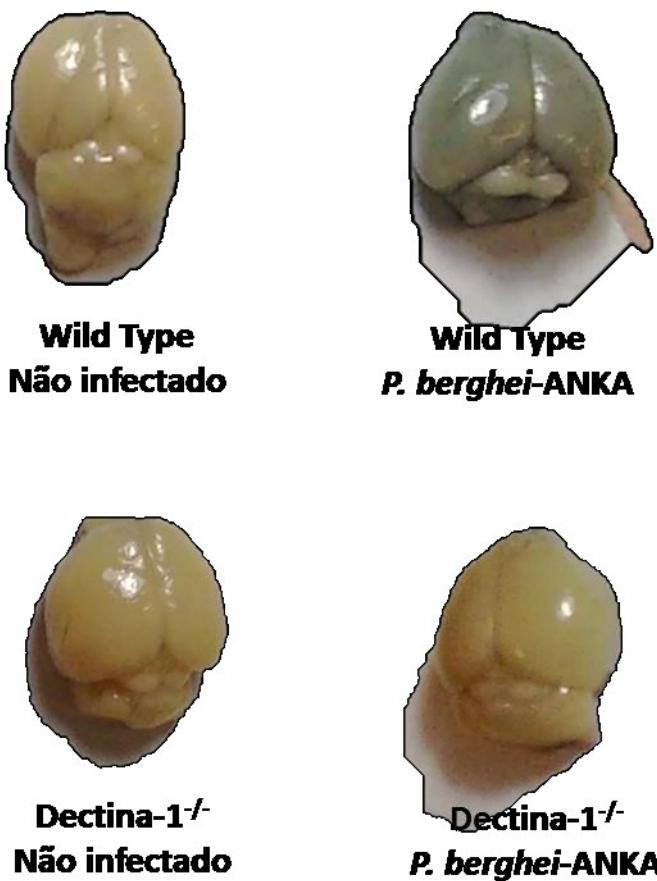


Figura 6: A permeabilidade da barreira hematoencefálica em camundongos Dectina-1^{-/-} infectados com *P. berghei*-ANKA é menos afetada que em camundongos C57BL/6 selvagens. Camundongos C57BL/6 selvagens e Dectina-1^{-/-} foram infectados via intraperitoneal com 1×10^6 hemácias parasitadas de *P. berghei*- ANKA para análises da integridade da barreira hematoencefálica. Imagem ilustrativa apresentando maior extravasamento de Azul de Evans em animais selvagens, característico de alterações na integridade da barreira hematoencefálica.

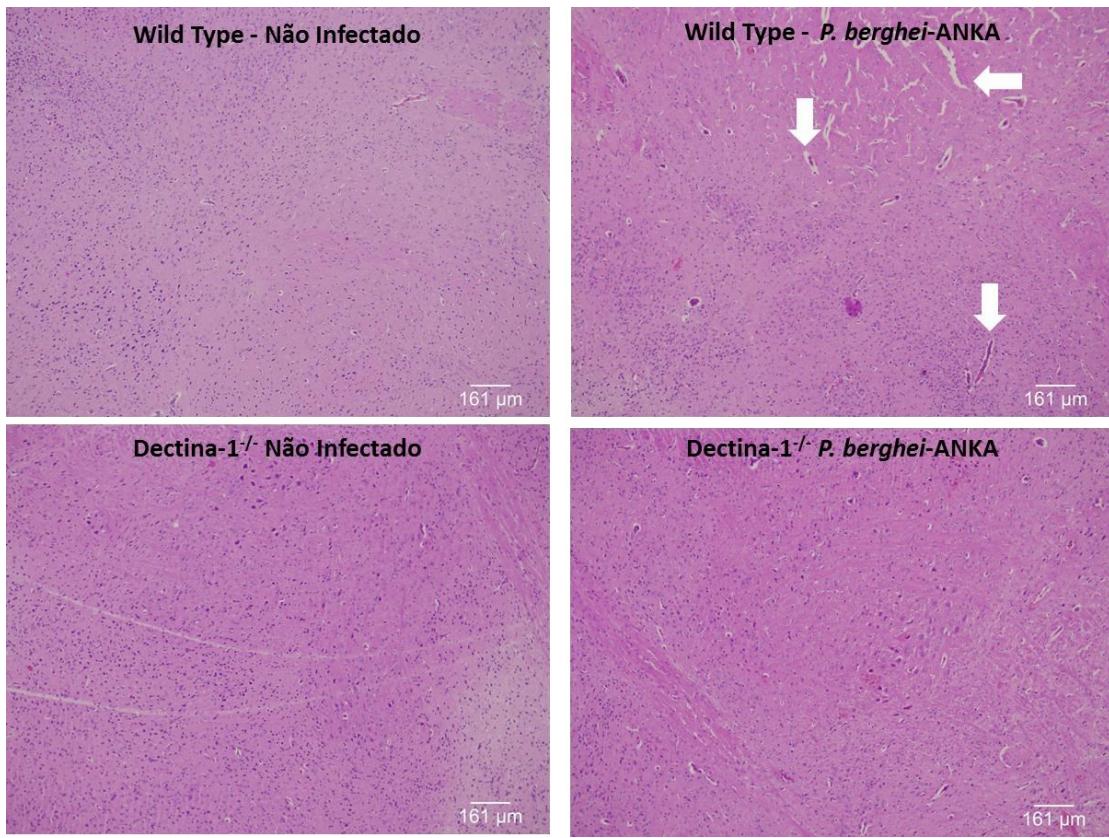


Figura 7: Camundongos Dectina-1^{-/-} possuem menor comprometimento do sistema nervoso central. Camundongos C57BL/6 selvagens e Dectina-1^{-/-} foram infectados por via intraperitoneal com 1×10^6 hemácia parasitadas de *P. berghei*-ANKA para análises histológicas do sistema nervoso central por H&E no sexto dia de infecção. Fotomicrografia ilustrativa apresentando áreas de necrose, manguito perivascular e obstrução de vasos mais evidente em camundongos WT infectados com *P. berghei*-ANKA.

Camundongos deficientes em Dectina-1 apresentam menor dano hepático quando infectados com *P. berghei*-ANKA

O parasito *P. berghei*-ANKA em seu ciclo de replicação infecta células hepáticas podendo causar danos ao órgão antes mesmo da manifestação dos sinais neurológicos da ECM (HAQUE et al., 2011; OCA et al., 2013). Portanto, nós avaliamos a carga parasitária (retenção de parasitos) neste órgão no sexto dia de infecção e verificamos que camundongos Dectina-1^{-/-} apresentam menor carga parasitária neste órgão (Figura 8A). Muitas moléculas imunes relacionadas ao controle da infecção por protozoários são conhecidas, dentre elas as citocinas são amplamente estudadas. O papel dos interferons do tipo I (IFN α e IFN β) e do tipo II (IFN γ) tem sido alvo de muitos estudos sobre malária (YU et al., 2016). Assim, nosso próximo passo foi buscar entender se o receptor Dectina-1 possui alguma relação com a indução da expressão destas moléculas durante a infecção por *P. berghei*-ANKA. Para isto, a expressão de mRNA de IFN α e IFN β no fígado, bem como os níveis séricos de IFN γ em camundongos WT e Dectina-1^{-/-}, infectados ou não com *P. berghei*-ANKA, foram quantificados. Nossos resultados mostraram que camundongos Dectina-1^{-/-} apresentam maior expressão de IFN β (Figura 8B), mas não apresentam diferenças em relação à expressão de IFN α (Figura 8C). Enquanto que camundongos deficientes em Dectina-1^{-/-} apresentam níveis reduzidos de IFN γ no soro (Figura 8D), uma importante citocina na patogênese da malária cerebral (AMANI et al., 2000).

A análise dos parâmetros bioquímicos do soro é um importante método de triagem para o diagnóstico clínico inicial das patologias infeciosas. Com intuito de se avaliar possíveis danos hepáticos, renal e metabólico dos camundongos WT e Dectina-1^{-/-} durante a infecção por *P. berghei*-ANKA, nós avaliamos os níveis séricos das enzimas ALT, AST, de Ureia e de glicose no sexto dia de infecção. Verificamos que associado com a reduzida carga parasitária no fígado (quantidade de parasitos retidos no órgão), foi detectado menores níveis das enzimas marcadoras de lesão hepática, ALT (Figura 9A) e AST (Figura 9B) no soro. Nenhuma diferença foi observada em relação à Ureia (Figura 9C), e uma hipoglicemia menos crítica foi observada em camundongos Dectina-1^{-/-} (Figura 9D). Em conjunto, estes dados sugerem que a diferença na modulação imunológica observada em camundongos deficientes de Dectina-1 leva a um conjunto menor de lesões, tornando-os mais resistentes à infecção.

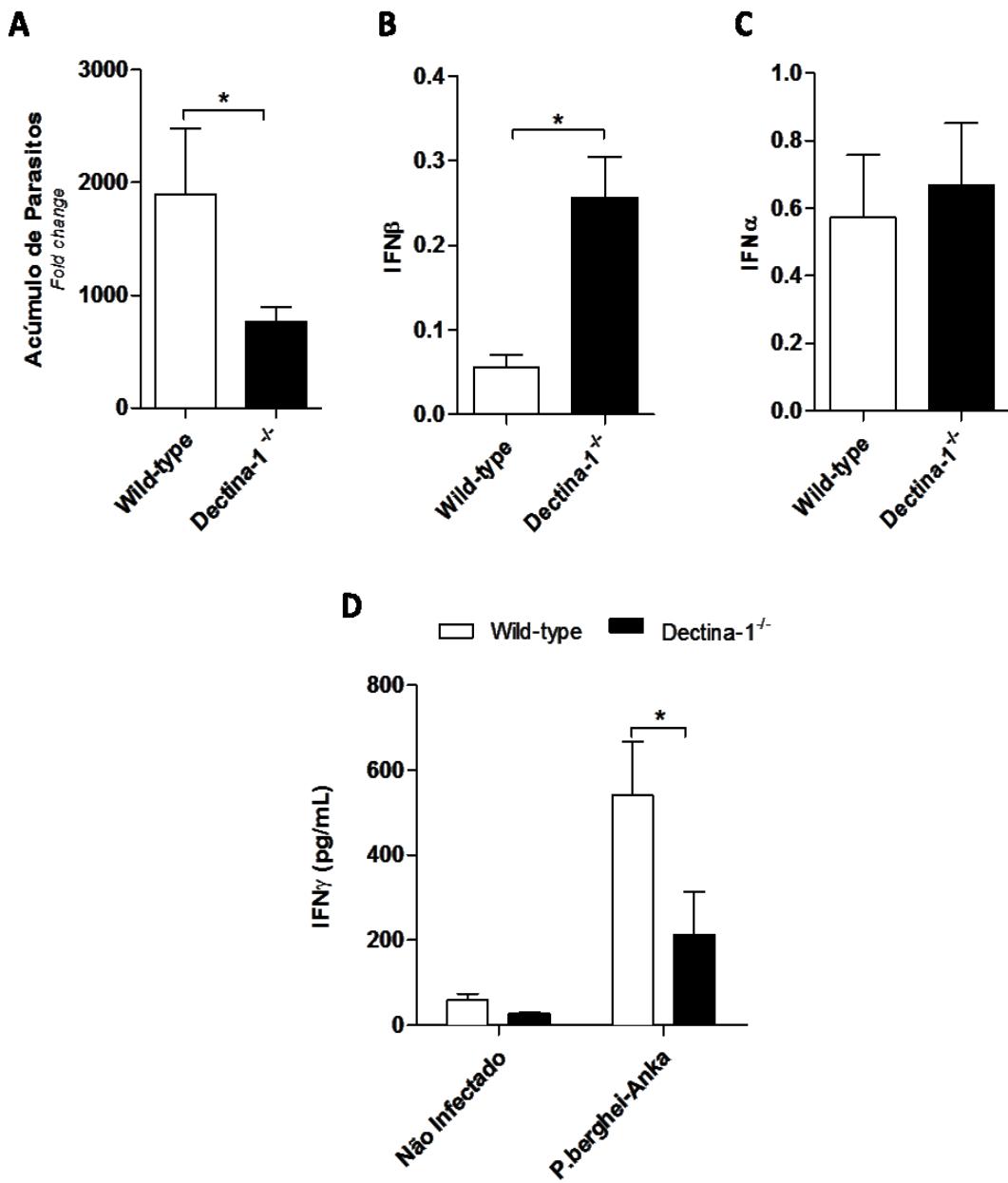


Figura 8: Camundongos Dectina-1^{-/-} controlam de forma mais eficiente a replicação de *P. berghei*-ANKA associado a maior produção de IFNβ. Camundongos C57BL/6 selvagens e Dectina-1^{-/-} foram infectados com *P. berghei*- ANKA (1×10^6 eritrócitos infectados/animal/ip), no sexto dia de infecção a carga parasitária e a expressão de Interferons do tipo I (IFNβ e IFNα) foram quantificadas por RT-qPCR em amostras de fígado. A determinação dos níveis de IFNγ foi determinada em amostras de soro. (A) Carga parasitária hepática, (B) Expressão de IFNβ, (C) Expressão de IFNα, e (D) Níveis séricos de IFNγ. Os resultados são representativos de três experimentos independentes e expressos em média ±SEM.*Indica diferenças estatisticamente significantes em que $p < 0.05$.

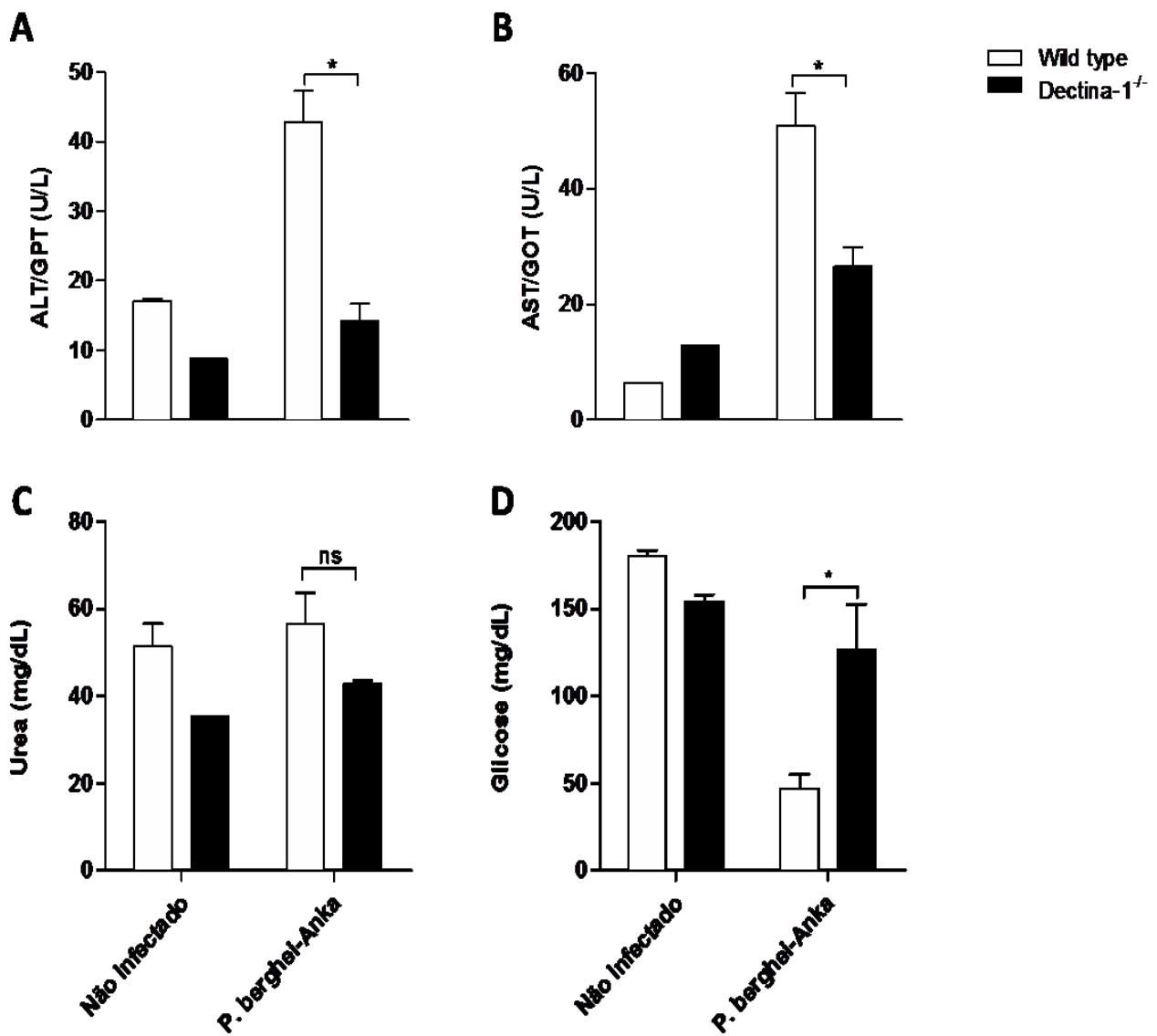


Figura 9: Camundongos Dectina-1^{-/-} apresentam baixos níveis séricos de enzimas marcadoras de lesão hepática quando infectados com *P. berghei*-ANKA. Camundongos C57BL/6 selvagens e Dectina-1^{-/-} foram infectados com *P. berghei*- ANKA (1×10^6 eritrócitos infectados/animal/ip), no sexto dia de infecção foram quantificadas em amostras de soro as enzimas (A) ALT, (B) AST, (C) Ureia, e (D) Glicose. Os resultados são representativos de três experimentos independentes e expressos em média \pm SEM. *Indica diferenças estatisticamente significantes em que $p < 0.05$.

Camundongos Dectina-1^{-/-} controlam melhor a replicação do parasite *P. berghei*- ANKA durante a fase sanguínea de replicação

O estágio intraeritrocítico se inicia com o rompimento dos hepatócitos infectados e liberação dos merozoítos na corrente sanguínea. Cada merozoíto, através de ligantes, interage com receptores expressos na superfície das células vermelhas e subsequentemente infectam estas células por mecanismos de invaginação da membrana plasmática celular (COWMAN et al., 2017; WISPA et al., 2002). Dada as diferenças observadas entre camundongos WT e Dectina-1^{-/-}, nosso próximo passo foi buscar entender se a maior resistência observada nos animais deficientes em Dectina-1 também ocorre durante a fase sanguínea de replicação do parasito. Para tal, a parasitemia destes animais foi monitorada por citometria de fluxo e esfregaço sanguíneo nos dias 0, 4, 5 e 18 de infecção. Observamos que camundongos Dectina-1^{-/-} apresentam menor parasitemia desde o dia 4 e 5 de infecção. Esta menor parasitemia em relação aos camundongos WT é discreta, mas notória (Figura 10). Entretanto, nenhuma diferença nos parâmetros hematológicos foi observada entre camundongos WT e Dectina-1^{-/-} infectados com *P. berghei*-ANKA no sexto dia de infecção, momento em que os animais WT começam a sucumbir à infecção (Figura 11), sugerindo que nesta fase da infecção, por mais que os animais WT apresentam maior parasitemia, a mesma não é suficiente para induzir mudanças hematológicas como anemia. Fato demonstrado pelo hematócrito dentro da normalidade.

Como apresentado previamente, camundongos Dectina-1^{-/-} apresentam maior sobrevida associada a menor incidência de animais que desenvolvem sintomas clínicos de malária cerebral quando desafiados com *P. berghei*-ANKA. Estes animais sucumbem à infecção posteriormente, por volta do vigésimo dia de infecção. Curiosamente, a partir do décimo oitavo dia de infecção os animais deficientes em Dectina-1 apresentam uma parasitemia muito elevada, a qual supomos estar associada à morte dos mesmos no vigésimo dia de infecção. Pois a elevada parasitemia reduz drasticamente o número de eritrócitos viáveis, quadro característico de anemia severa (Figura 10).

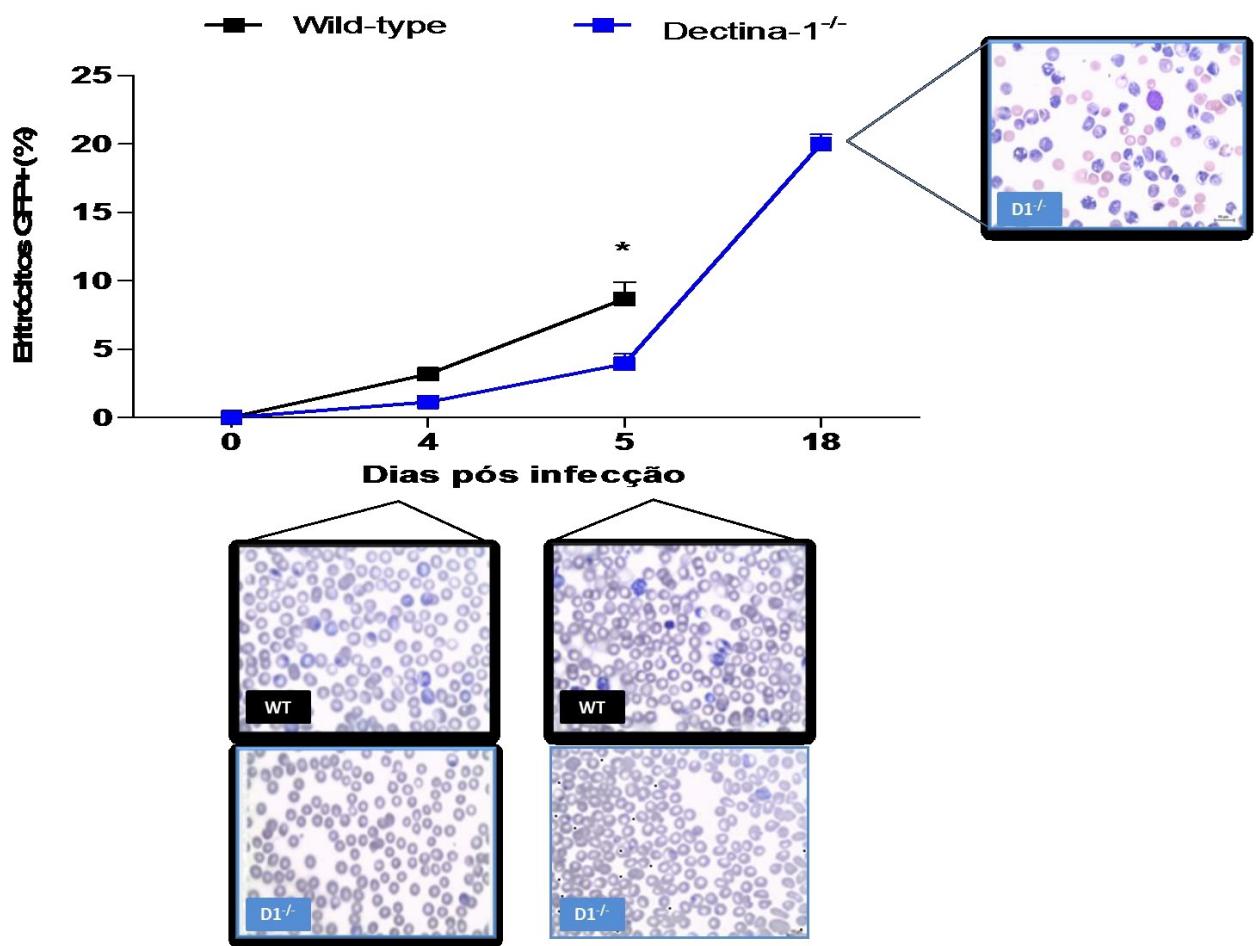


Figura 10: Camundongos da linhagem C57BL/6, modelo para estudo de malária cerebral, morrem de anemia quando nocautes para Dectina-1. Camundongos C57BL/6 selvagens e Dectina-1^{-/-} foram infectados com *P. berghei*-ANKA (1×10^6 eritrócitos infectados/animal/ip) e acompanhados nos dias 0, 4, 5 e 18 de infecção quanto à parasitemia por citometria de fluxo e esfregaço sanguíneo. A porcentagem de células eritrócitos infectados foi quantificado através da detecção de células GFP+ dentro da gate de eritrócitos. Esfregaços sanguíneos corados com Panótico Rápido ilustram cada data analisada por citometria de fluxo. Os resultados são representativos de três experimentos independentes e expressos em média \pm SEM. *Indica diferenças estatisticamente significativas, onde P<0.05.

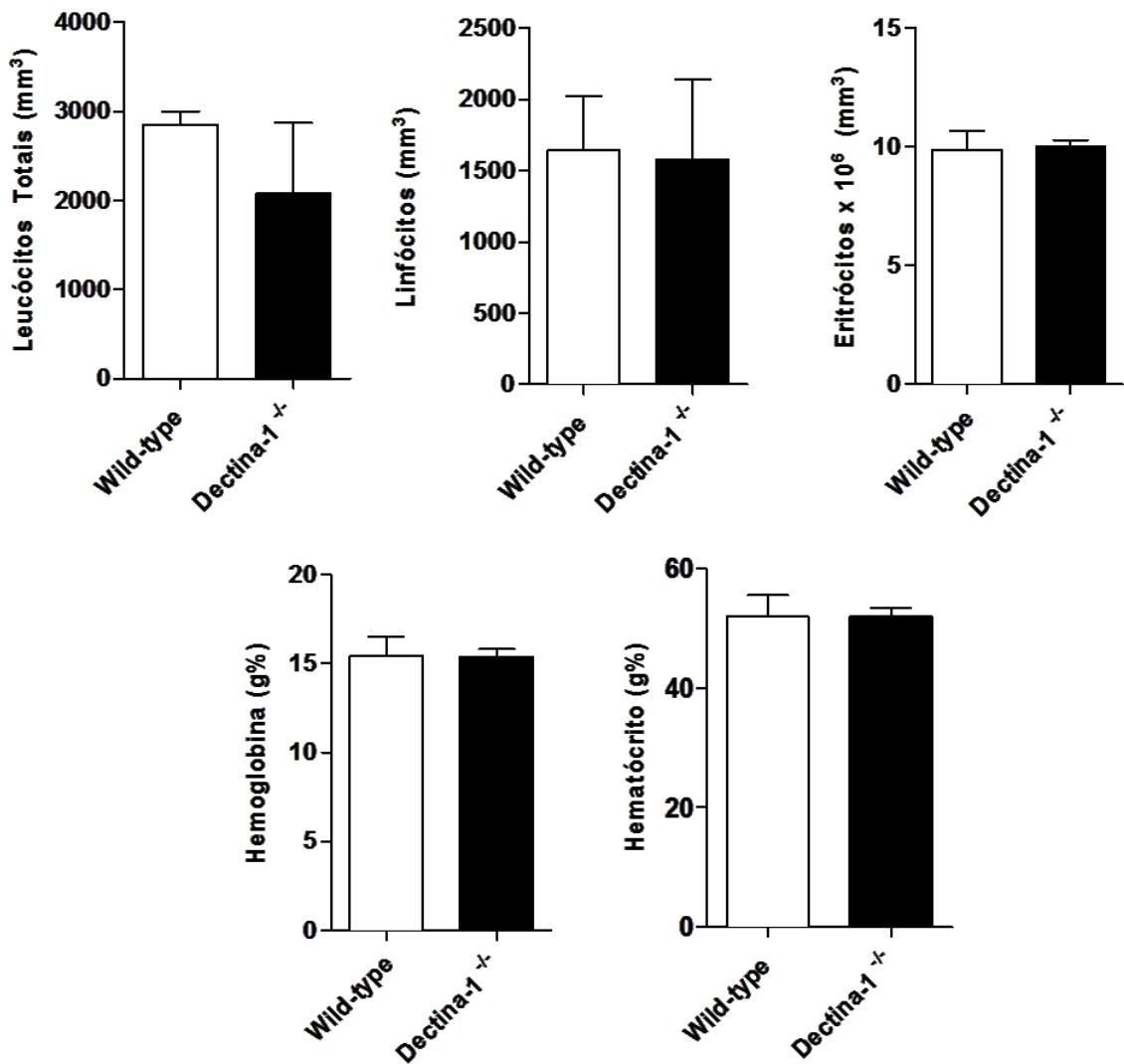


Figura 11: Camundongos C57BL/6 WT e Dectina-1^{-/-} apresentam mesmos parâmetros hematológicos no sexto dia de infecção. Camundongos C57BL/6 selvagens e Dectina-1^{-/-} foram infectados com *P. berghei*-ANKA (1×10^6 eritrócitos infectados/animal/ip), e no sexto dia de infecção foi coletada uma amostra de sangue para realização de hemograma. Nenhuma alteração significante foi observada entre animais deficientes ou não para Dectina-1 nesta fase da infecção.

DISCUSSÃO

A ativação do compartimento inato do sistema imune é crítica para o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva durante a infecção por protozoários, a qual culmina na restrição da multiplicação microbiana e restabelecimento da homeostase (BEITING et al., 2002). A malária causa milhares de mortes por ano, sendo a maioria delas devido ao comprometimento do sistema nervoso central, malária cerebral (CM) induzida pela infecção pelo *Plasmodium falciparum*. Apesar de sua importância e do grande número de grupos de pesquisa dedicados ao estudo desta doença, os mecanismos responsáveis pela neuropatologia ainda não foram totalmente elucidados.

Camundongos da linhagem C57BL/6, susceptíveis ao desenvolvimento de malária cerebral quando infectados com *P. berghei*-ANKA, tem sido um modelo experimental amplamente utilizado para o estudo da malária cerebral por estes animais infectados apresentarem algumas características semelhantes às observadas em humanos com CM (SCHOFIELD et al., 2005). Dado a importância desta doença, o objetivo deste estudo foi entender possíveis mecanismos envolvidos com a maior resistência de camundongos Dectina-1^{-/-} infectados com *P. berghei*-ANKA utilizando o modelo acima apresentado.

Dectina-1 é um bem caracterizado receptor de β-glucanos, especialmente aqueles encontrados em fungos. Não obstante, muitos estudos recentes tem sugerido que este receptor também apresenta funções relevantes durante infecções por outros agentes patogênicos como bactérias e protozoários. Os resultados presentes neste estudo apresentam que Dectina-1 desempenha papel importante na modulação da resposta imune contra *P. berghei*-ANKA, uma vez que a ausência deste receptor retarda consideravelmente a morte camundongos desafiados com dose letal deste protozoário, bem como reduz o número de animais que apresentam sintomas de CM.

Fenômeno semelhante de proteção na ausência de Dectina-1 foi observado em estudo prévio publicado por nosso grupo, onde demonstramos que camundongos Dectina-1^{-/-} são mais resistentes à infecção por *Neospora caninum*, um protozoário Apicomplexa, assim como *P. berghei*. Entretanto, neste mesmo estudo foi apresentado que durante a infecção por *Toxoplasma gondii*, nenhuma diferença em relação à resistência foi observada entre camundongos WT e Dectina-1^{-/-} (SILVA, et al., 2017).

De fato, o papel de cada receptor de reconhecimento padrão (PRR) está estreitamente relacionado ao patógeno ao qual o mesmo apresenta interação. Este fenômeno tem sido evidenciado em estudos com fungo, onde uma simples modificação no complexo

antigênico entre diferentes cepas de *Candida albicans* induz significantes mudanças na taxa de sobrevivência em camundongos Dectina-1^{-/-} (MARA KALALA et al., 2011). Sabe-se que parasitos do gênero *Plasmodium* apresentam proteínas amplamente glicosiladas (ITZSTEIN et al., 2008). Contudo, até então, não existe descrito nenhum agonista de Dectina-1 presente na estrutura de *P. berghei*-ANKA. Entretanto, as diferenças na sobrevida e carga parasitária observadas em nossos estudos com camundongos Dectina-1^{-/-} sugerem que alguma interação entre este PRR e *P. berghei*-ANKA pode ser possível.

O modelo de malária cerebral murina (ECM) em camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei*-ANKA é amplamente utilizado no estudo da malária cerebral por apresentar certa similaridade à malária humana. Sabe-se que na malária humana existe significativa citoaderência de células infectadas na parede vascular do cérebro, sendo este um dos principais gatilhos de desencadeamento dos sinais neurológicos. Apesar dos sintomas em modelo murino serem semelhantes, o gatilho para os sintomas tem sido associado não a citoaderência de células infectadas no endotélio vascular, mas sim pelo recrutamento de leucócitos, produção de citocinas como IFN γ culminando em relativo sequestro de eritrócitos infectados, alterações na barreira hematoencefálica, obstrução de vasos e consequentemente o desenvolvimento de sinais neurológicos (RÉNIA et al., 2006; de SOUZA et al., 2010; HUNT et al., 2010). Nós verificamos que além de animais Dectina-1 apresentarem menor incidência de sinais neurológicos da ECM, os mesmos praticamente não apresentam alterações de permeabilidade da barreira hematoencefálica. Adicionalmente, a ausência de Dectina-1 se correlaciona com menos áreas de necrose, manguito perivascular, e obstrução de vasos no sistema nervoso central.

Dectina-1 é expresso na superfície de células endoteliais em estado quiescente, assim como os receptores do tipo Toll (ZHANG et al., 2011), desta forma nós sugerimos que existe uma possível interação entre este receptor e proteínas presentes na superfície de eritrócitos infectados, podendo favorecer a obstrução de vasos no sistema nervoso central de animais WT, o que é bastante reduzido em animais Dectina-1^{-/-}. Em adição, o modelo de ECM tem sido utilizado no estudo de resposta imune cerebral em processos maláricos. A remoção de células imunes como linfócitos T e células *Natural Killer*, ou citocinas e linfotoxinas como IFN γ e LT α previne a ECM induzida por *P. berghei*-ANKA (AMANI et al., 2000; FAUCONIER et al., 2012; HERMSEN et al., 1997; GRAU et al., 1989; ENGWERDA et al., 2002).

Interessantemente, camundongos Dectina-1^{-/-} também apresentam menores níveis de IFN γ no sexto dia de infecção, o qual contribui para a redução dos sinais clínicos da ECM.

Entretanto, outras citocinas como interferons do tipo I e III desempenham papel chave no controle de diferentes doenças infecciosas (GOUBAU et al., 2013; PALUDAN et al., 2013). Nossos resultados apresentaram que Dectina-1 regula para maior produção de IFN γ e para menor expressão de IFN β . Assim sendo, camundongos Dectina-1 $^{-/-}$ possuem menores níveis de IFN γ no soro, citocina que produzida em excesso possui papel patológico para o hospedeiro, e maior expressão de IFN β , uma importante molécula para o controle da replicação de *Plasmodium* sp. no fígado (XIAO et al., 2016).

Parasitos do gênero *Plasmodium* sp. são transmitidos durante o repasto sanguíneo de fêmeas de mosquitos *Anopheles*. Previamente à sucção do sangue, os esporozoítos são injetados no hospedeiro intermediário que rapidamente ganham a circulação sistêmica ou linfática e chegam ao fígado, invadem os hepatócitos e começam a proliferação. Este processo de invasão dos hepatócitos é um processo complexo e amplamente explorado em estudos sobre malária (MOTA et al., 2001; MOTA et al., 2002; MATUSCHEWSKI et al., 2002; BALDACCI et al., 2004), mas

pouco se conhece sobre o processo de desenvolvimento e liberação destes parasitos na corrente circulatória. Aqui nós apresentamos que camundongos Dectina-1 $^{-/-}$ controlam mais eficientemente este processo de replicação do parasito nos estágios iniciais de infecção, uma vez que eles apresentam menor parasitismo associado à um aumento na expressão de IFN β no fígado. Tais resultados vão de acordo com estudos recentes que apresentam a importância da indução de IFNs do tipo I nos estágios iniciais da infecção por *Plasmodium* sp. (LIEHL et al., 2014). Este fenômeno ficou evidente quando se determinou que animais deficientes em Dectina-1 também apresentam menores níveis de AST e ALT no soro no sexto dia de infecção, demonstrando menor dano hepático nestes animais. Após o estágio hepático de infecção, os merozoítos são liberados na corrente sanguínea e infectam as células vermelhas do sangue, os quais ativam várias vias de sinalização (RILEY et al., 2013; GAZZINELLI et al., 2014; MILLER et al., 2014; WU et al., 2014). Nossos resultados apresentaram que na ausência de Dectina-1, camundongos podem controlar melhor a replicação parasitária. Assim, a menor carga parasitária liberada na corrente sanguínea pode explicar a reduzida parasitemia neste grupo de animais. Em relação aos parâmetros hematológicos, nenhuma diferença significativa foi observada entre camundongos WT e Dectina-1 $^{-/-}$ no sexto dia de infecção. Entretanto, camundongos WT sucumbem à infecção até o sétimo dia de infecção por ECM e camundongos Dectina-1 $^{-/-}$ sobrevivem até por volta de vinte dias de infecção, morrendo sem o desenvolvimento de malária cerebral, mas com uma parasitemia muito elevada. Portanto, nós sugerimos que camundongos Dectina-1 $^{-/-}$ morrem

por anemia severa e não ECM, semelhante ao que ocorre em camundongos não susceptíveis à malária cerebral como BALB/c (TANIGUCHI et al., 2015).

CAPITULO II

Potencial Terapêutico de Antígenos Solúveis de *Neospora caninum* na infecção por *Plasmodium berghei* – ANKA

INTRODUÇÃO

A malária cerebral é uma complicaçāo neurológica fatal que pode ocorrer durante a infecção por *P. falciparum*. Este processo ocorre no sistema nervoso central pelo sequestro de eritrócitos infectados, leucócitos e plaquetas na barreira hematoencefálica (MEDANA et al., 2006; SILAMUT et al., 1999; CLARK et al., 2003; GRAU et al., 2003). Apesar da existência de diversos protocolos para tratamento da malária, atualmente muitos indivíduos ainda continuam indo a óbito por esta doença. Sendo a grande maioria dos casos de óbito relacionado ao envolvimento do sistema nervoso central (MEDANA et al., 2006; SILAMUT et al., 1999; CLARK et al., 2003; GRAU et al., 2003; KRISHMA, 2012; JOHN et al., 2010).

Adicionalmente, é importante ressaltar que muitos dos indivíduos que sobrevivem à malária cerebral, podem apresentar posteriormente complicações neurológicas e necessitarem de tratamento adicional ou mesmo conviverem com sequelas (KIHARA et al., 2006; IDRO et al., 2007). Tais fenômenos estão relacionados ao fato de que pouco se sabe sobre a contribuição do sistema imune e até mesmo da ação parasitária em humanos (RÉNIA et al., 2006).

Assim, para que se busque o entendimento dos processos imunes e parasitológicos relacionados à patologia da malária cerebral, os modelos murinos têm sido amplamente empregados (FAUCONNIER et al., 2012; AMANI et al., 2000; ENGWERDA et al., 2002; PENET et al., 2008; FRANLIN et al., 2011; HOCHMAN

et al., 2012; BUCHER et al., 2011; ECKWALANGA et al., 1994). Neste capítulo, nós utilizamos o modelo de malária cerebral em camundongos da linhagem C57BL/6 para estudo de processos ligados a parasitos, no caso *Neospora caninum*, que possam ser promissores no desenvolvimento de medidas terapêuticas contra malária cerebral, uma vez que diferentes estudos mostram papéis protetores contra malária cerebral observado em protocolos de coinfeção ou mesmo tratamento com antígenos de diferentes parasitos (SETTLES et al., 2014; NIIKURA et al., 2010; VOZA et al., 2005; HOCHMAN et al., 2012; SPECHT et al., 2010).

Neospora caninum

Neospora caninum é um protozoário intracelular obrigatório, pertencente ao Filo Apicomplexa, estreitamente relacionado ao parasito *Toxoplasma gondii* (DUBEY et al., 1988a). Historicamente, este parasito foi descrito pela primeira vez por Bjerkas et al. em 1984, na Noruega, em cães com distúrbios neurológicos, paralisia dos membros posteriores, soronegativos para *T. gondii* e com cistos teciduais detectados no sistema nervoso central morfologicamente distintos dos cistos de *T. gondii* (GOODSWEN et al., 2013). Em 1988, *N. caninum* foi reconhecido como nova espécie e gênero ao se analisar cortes histológicos de cães com doença fatal sugestiva para toxoplasmose. Dubey et al. encontraram características que o diferenciavam do quadro de toxoplasmose, constatando-se que este agente era capaz de provocar em cães um quadro clínico mais grave que o de *T. gondii* e que havia, de fato, diferenças estruturais, histopatológicas e ausência de reatividade para *T. gondii* nos testes sorológicos e imuno-histoquímicas (DUBEY; LINDSAY, 1993). Após a sua descrição, *N. caninum* foi isolado em cultura celular a partir de cistos teciduais de cães com infecção congênita (DUBEY et al., 1988b) e identificado em bovinos como causa de aborto (THILSTED; DUBEY, 1989).

N. caninum é o causador da neosporose e está amplamente distribuído mundialmente, infectando diversas espécies animais, causando doença clínica significativa em bovinos e cães. A infecção natural por *N. caninum* foi demonstrada em diversas espécies de hospedeiros intermediários, incluindo desde animais domésticos a animais silvestres, tais como: gatos, porcos, carneiros, cavalos, bovinos, búfalos, raposas, coiotes, lobos, alpacas, veados, camelos e psitacídeos (DONAHOE et al., 2015).

Ciclo biológico

N. caninum apresenta ciclo biológico heteróxeno, ou seja, o ciclo se desenvolve em hospedeiros distintos, subdivididos em fases sexuada e assexuada. A reprodução sexuada ocorre em canídeos (cão, coiote, dingo australiano, lobo) que são considerados hospedeiros definitivos (MCALLISTER et al., 1999; GONDIM et al., 2004; KING et al., 2010; DUBEY et al., 2011), enquanto que a reprodução assexuada ocorre em vários hospedeiros intermediários, incluindo desde animais domésticos a animais silvestres, tais como: gatos, porcos, galinhas, carneiros, cavalos, bovinos, búfalos, raposas, coiotes, lobos, alpacas, veados, camelos e psitacídeos (MINEO et al., 2011; GOODSWEN, KENNEDY e ELLIS, 2013).

O ciclo de vida envolve três formas infecciosas: taquizoítos (livres ou em grupos), bradizoítos (em cistos teciduais) e esporozoítos (em oocistos) (Figura 12), sendo que todas as formas estão envolvidas na transmissão do parasito (GOODSWEN, KENNEDY e ELLIS, 2013; 2013; DONAHOE et al., 2015).

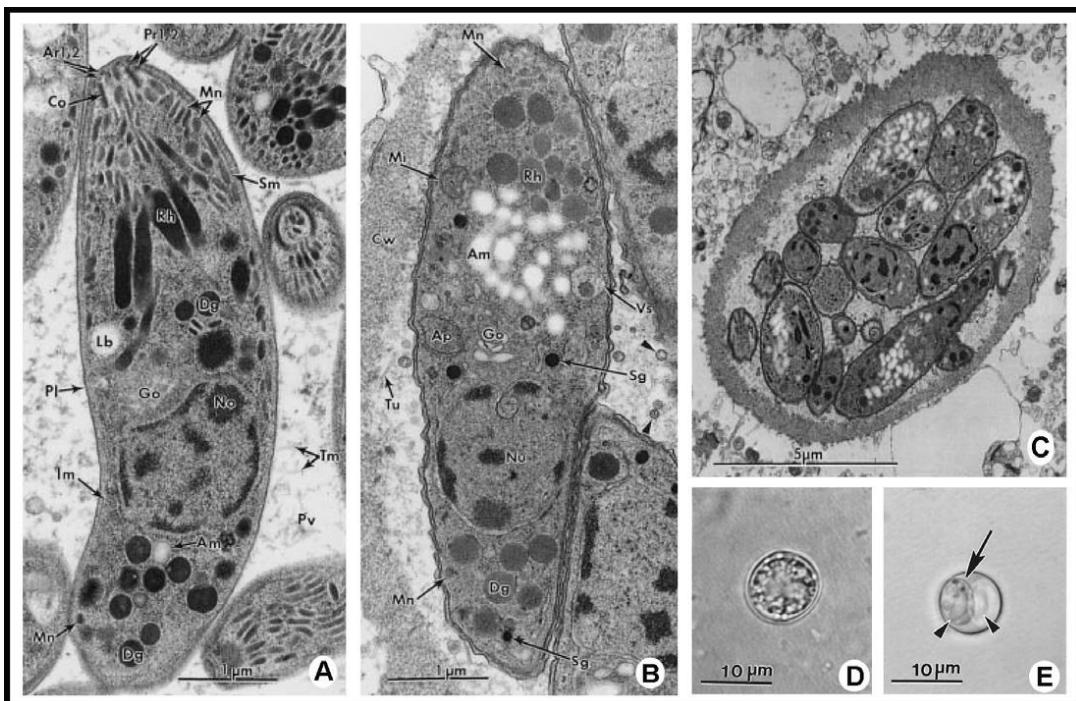


Figura 12: Ultraestrutura de (A) taquizoíto, (B) bradizoíto, (C) cisto, (D) oocisto não esporulado, e (E) oocistos esporulados com dois esporocistos (seta) e dois esporozoítos (cabeça da seta) do parasito *N. caninum*. **Fonte:** Goodswen (2013).

Oocistos não esporulados (imáturos ou não infecciosos) são eliminados nas fezes de canídeos infectados. No ambiente, sob condições ótimas de oxigenação, temperatura e umidade, ocorre a esporogonia, levando ao desenvolvimento de oocistos esporulados, que contêm dois esporocistos dos quais cada um contém quatro esporozoítos (DUBEY, 2003; DUBEY e SCHARES, 2011).

Os hospedeiros intermediários tais como os bovinos, podem ingerir os oocistos esporulados encontrados em alimentos ou água contaminada e tornar-se infectados. Os esporozoítos são liberados no trato digestivo e invadem as células do epitélio intestinal, fibroblastos e leucócitos, multiplicando-se como taquizoítos que disseminam por todo organismo (GOODSWEN, KENNEDY e ELLIS, 2013).

Taquizoítos residem em compartimentos intracelulares chamados vacúolos

parasítóforos (VP), replicam rapidamente por endodiogenia (um processo de desenvolvimento assexuado). Neste estágio o parasito pode invadir e infectar diversos tipos de células do hospedeiro, incluindo células neurais, macrófagos, fibroblastos, endotélio vascular, células musculares e hepatócitos (BARR et al., 1994; DUBEY et al., 2002). Os taquizoítos causam uma forte resposta inflamatória e destruição de tecidos e são responsáveis pelas manifestações clínica da doença (fase aguda). Sob a pressão da resposta imune do hospedeiro, os taquizoítos transformam-se em bradizoítos e forma os cistos que iniciam a segunda fase do desenvolvimento assexuado (ELLIS et al., 2010; GOODSWEN, KENNEDY e ELLIS, 2013; MONNEY e HEMPHILL, 2014).

Quanto aos bradizoítos, estes são formas de latência que se multiplicam lentamente por endodiogenia e vão formar os cistos teciduais, predominantemente em células do sistema nervoso central e músculo esquelético, podendo persistir por toda vida do hospedeiro sem causar manifestações clínicas significativas (fase crônica), embora possa ocorrer uma baixa taxa de reativação espontânea (DUBEY et al., 1992; MONNEY & HEMPHILL, 2014; McALLISTER, 2016).

O ciclo de vida (Figura 12) é completado quando os cistos presentes nos tecidos de presas (por exemplo, em tecidos musculares de animais infectados) são ingeridos por hospedeiros definitivos, e os bradizoítos liberados no intestino delgado que invadem células epiteliais e iniciam a fase sexuada com a formação de esquizontes e liberação de merozoítos. A partir deste momento, há início da gamogonia, com a produção final de oocistos não esporulados eliminados com as fezes, repetindo-se o ciclo novamente (GONDIM et al., 2004; GOODSWEN, KENNEDY e ELLIS, 2013; MONNEY e HEMPHILL, 2014).

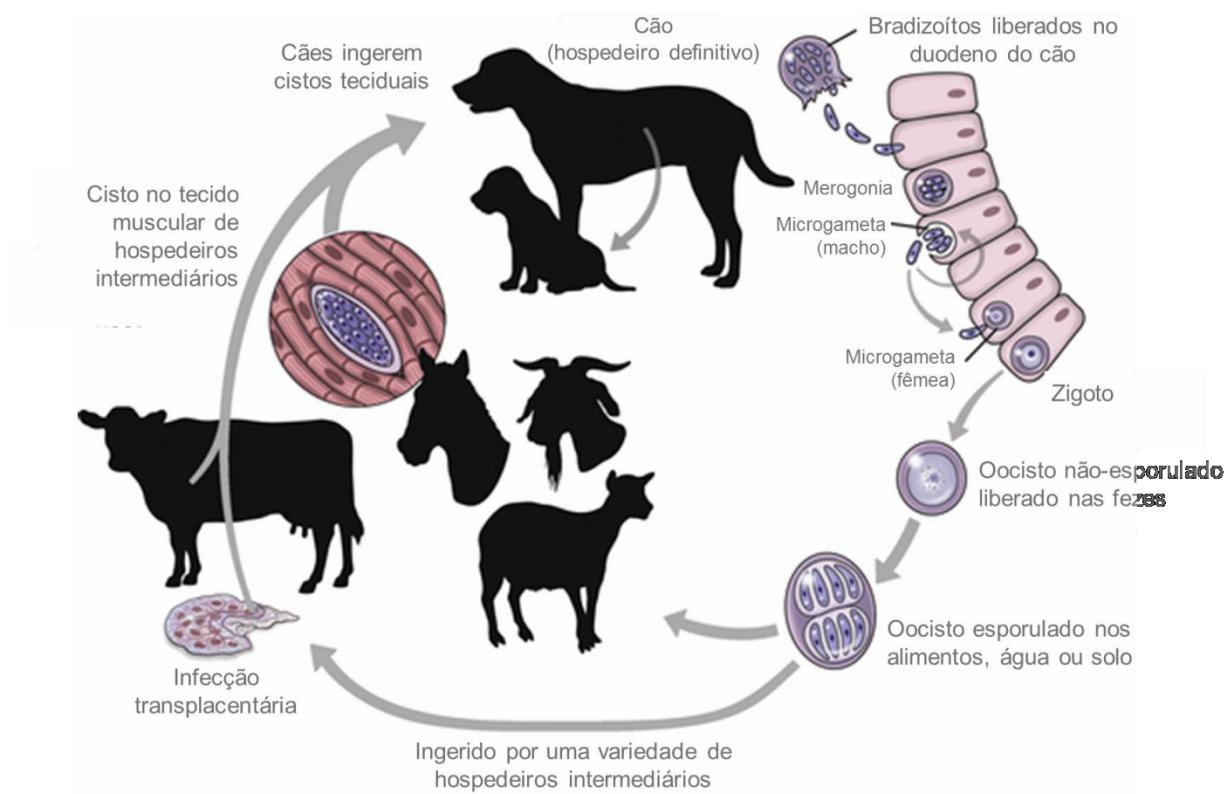


Figura 13: Ciclo de vida do parasito *N. caninum*. Adaptado de SYKES, 2016.

Manifestações clínicas da neosporose

A maioria das infecções por *N. caninum* em bovinos é subclínica, mas o aborto é o principal problema, que geralmente é o único sinal clínico observado, podendo ser esporádico, endêmico ou epidêmico (DUBEY, 2003; DONAHOE et al., 2015; McALLISTER, 2016). O aborto em bovinos pode ocorrer entre o 4º mês de gestação até o final da gestação, sendo mais comum entre o 5º e 7º mês de gestação. O aborto ocorre quando o feto ou a placenta são danificados de modo que já não é viável prosseguir com a gestação, e vários fatores podem interagir para influenciar esses danos (DONAHOE et al., 2015; McALLISTER, 2016). Os danos induzidos na placenta pelo parasito podem pôr em risco a sobrevivência fetal diretamente ou induzir a liberação de prostaglandinas que por sua vez induzem o aborto. As lesões fetais podem ocorrer devido aos danos nos tecidos pela multiplicação do parasito no feto ou devido à insuficiência de oxigênio e nutrição (DUBEY et al., 2002; CANTÓN et al., 2014). Outras manifestações clínicas também

podem ocorrer, como morte, reabsorção, mumificação, natimortos, recém-nascidos com sinais clínicos ou clinicamente normais, mas cronicamente infectados (DUBEY, 2003; DONAHOE et al., 2015).

Os casos mais graves da neosporose canina geralmente evoluem para uma doença neuromuscular em cães jovens, que apresentam um quadro mais comum de paresia inicial de membros posteriores que progride para a paralisia (DONAHOE et al., 2015). Em contraste, a encefalomielite causada pelo protozoário é mais suscetível em cães adultos e é caracterizada por uma variável de sinais neurológicos que são dependentes do local parasitado no Sistema Nervoso Central (SNC) (BUXTON, McALLISTER e DUBEY, 2002; DONAHOE et al., 2015). Embora principalmente reconhecida como uma doença neuromuscular em cães, a neosporose pode induzir outras disfunções menos comuns que incluem dificuldade na deglutição, paralisia da mandíbula, flacidez muscular, atrofia muscular, paralisia de nervos faciais, miocardite, pancreatite, pneumonia e até falência cardíaca dependendo das células parasitadas. Dessa forma, a neosporose canina clínica pode ser localizada ou generalizada, com o envolvimento de todos os órgãos, inclusive da pele causando a neosporose cutânea (PERLÉ et al., 2001; ORDEIX et al., 2002; MANN et al., 2016). Uma característica marcante nestes casos é o intenso parasitismo, com um grande número de taquizoítos nas lesões cutâneas, sugerindo uma falta de controle imune do hospedeiro sobre a multiplicação dos parasitos (DUBEY, 2003).

Neosporose em Humanos

Uma vez caracterizada a infecção por *N. caninum* em animais domésticos, mais especificamente cães e bovinos, os quais representam perdas afetivas e produtivas, respectivamente, quando infectados por este parasito. Um busca em relação à infecção de humanos por *N. caninum* foi realizado. É evidente que por mais próximo filogeneticamente seja *N. caninum* e *T. gondii*, o primeiro não causa danos como *T. gondii* à humanos. Não existem casos reportados da infecção de humanos por

N. caninum (TRANAS et al., 1999). De 1.029 amostras de soro de humanos triadas, 6,7% apresentaram certa positividade para *N. caninum*, mas em títulos pouco significativos (TRANAS et al., 1999). Outro estudo que avaliou amostras de soro de humanos de grupo com alto risco no ano de 1995 e população geral no ano de 2000 na Inglaterra, não encontrou evidências da exposição destes indivíduos à *N. caninum* (McCANN et al., 2008).

São escassos os trabalhos que buscam elucidar a infecção por *N. caninum* em

humanos. Contudo, os até então realizados são concisos em afirmar que caso humanos sejam infectados, aparentemente não é uma espécie de eleição pelo parasito. Ou seja, seria uma infecção ocasional e que até então não se mostrou capaz de induzir qualquer patologia em humanos.

Infecções cruzadas

Diversos estudos têm apresentado fenômenos de proteção contra infecções, principalmente em animais que estão previamente infectados com parasitos filogeneticamente relacionados ou não. Animais infectados de forma crônica por *T. gondii*, por exemplo, sobrevivem a infecção letal por bactérias, protozoários e vírus (O'RIEN et al., 11; RUSTKIN et al., 1968; MAHAMOUD et al., 1976; GENTRY

et al., 1971; REMINGTON et al., 1969). Adicionalmente, a infecção crônica por *T. gondii* reduz a carga parasitária de *Plasmodium yoelii* em estágios sanguíneos (CHAREST et al., 2000) e prolonga a sobrevida de camundongos infectados com *Plasmodium berghei*-ANKA (MENGGS et al., 1982), sugerindo um potencial papel protetor durante malária. Além disso, a imunização com taquizoítos de *T. gondii* inativados por congelamento e descongelamento, ou mesmo lisados induz resposta imune adaptativa protetora contra infecção por *P. berghei*-ANKA (OMATA et al., 1981; SUZUKI et al., 1987).

Outro exemplo de coinfeção com indução de proteção ocorre com a infecção previa por *Trypanosoma cruzi* seguida da infecção por *P. berghei*-ANKA. Foi observado nesse estudo que a infecção previa por *T. cruzi* protege contra a morte rápida por desordens neurológicas e pulmonares características da infecção por *P. berghei*-ANKA (EGIMA et al., 2007).

Não só em modelos murinos, mas também em humanos fica evidente a presença destes mecanismos de proteção entre infecções cruzadas. Em estudo realizado com crianças Senegalenses, onde a coinfeção com o helminto *Schistosoma haematobium* e *Plasmodium falciparum* gera proteção contra malária (LEMAITRE et al., 2014). Estes efeitos protetores podem se dar pela própria reatividade cruzada entre抗ígenos semelhantes dos parasitos, bem como por ação direta de抗ígenos sobre o sistema imune do hospedeiro. A forma como estas moléculas atuam diretamente nos hospedeiros, gerando proteção contra outros patógenos é variada. Em estudo com *T. gondii* e *P. berghei*-ANKA, fica demonstrado que抗ígenos solúveis de *T. gondii* (STAg) atua diretamente na citoaderência de células infectadas na barreira hematoencefálica. Tal fenômeno é dependente da molécula VCAM-1 endotelial que

apresenta sua expressão alterada quando camundongos infectados com *P. berghei*- ANKA são tratados com STAg (KOSSODO et al., 1997).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o papel terapêutico do Antígeno Solúvel de *N. caninum* (NLA) no modelo de malária cerebral murina induzida por *Plasmodium berghei* – ANKA.

Objetivos específicos

- Avaliar a sobrevida de camundongos infectados com *P. berghei* – ANKA e tratados ou não com NLA;
- Quantificar através de ELISA comercial as concentrações das citocinas IFN γ , IL-10 e TNF α na fase aguda da infecção;
- Acompanhar a parasitemia de camundongos tratados ou não com NLA e infectados com *P. berhei* – ANKA;

METODOLOGIA

Animais

Foram utilizadas fêmeas de camundongos da linhagem C57BL/6 com idade entre 6-8 semanas foram obtidos do Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Todos os animais foram mantidos no CBEA em condições padronizadas de criação, sob condições padrões de ambiente com temperatura de 22 ± 2 °C e ciclos de 12 horas de luz/12 escuro, com água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas recomendadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA, 1991). Todos os experimentos com utilização dos animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia sob número: 153/16.

Cultivo de taquizoítos de N. caninum e produção de NLA

Monocamadas de células HeLa foram mantidas em garrafas de 75cm² a 37°C com 5% CO₂ em meio RPMI 1640 com 2mM glutamina (Gibco) contendo 10% de soro fetal bovino (Cutilab), antibiótico/antimicótico (Gibco - penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 mg/ml e anfotericina B 0,25 mg/ml). Os taquizoítos de *N. caninum* foram mantidos em monocamadas de células HeLa a 37°C com 5% CO₂, com meio RPMI 1640, adicionado de glutamina (2mM) e antibiótico/antimicótico. Após lise da monocamada de HeLa, as garrafas foram lavadas e o sobrenadante, contendo taquizoítos de *N. caninum*, transferido para tubo cônico e centrifugado (800 x g, por 10 minutos, 4°C). O pellet, formado por parasitos, foi ressuspensão e congelado à - 20°C. Suspensões parasitárias de *N. caninum* foram então descongeladas e ressuspensas em PBS suplementado com inibidores de proteases (aprotinina 10 µg/mL, leupeptina 50 µg/mL e PMSF (fenil-metilsulfonil fluoreto) 1,6 mM) e submetidas a 6 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C. O material obtido por criólise foi sonicado (6 ciclos de ultra-som a 60 Hz em banho de gelo) e centrifugado a 10.000 x g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e alíquotas foram armazenadas a -70°C, após a determinação da concentração proteica realizada pelo método de Lowry et al. (1951).

Protocolo de tratamento e coleta de amostras

Os animais foram divididos nos seguintes grupos: Não Infectado - (NI); Infectado e não tratado - (PBS); infectado e tratado com NLA (25 µg/animal/dose/IP) – NLA. O grupo tratado recebeu a respectiva dose de NLA no dia 1 e 3 pós-infecção. Para determinação de IFN γ e IL-10 no soro, uma amostra de 100 µL de sangue foi coletada por punção retro orbital nos dias 3 e 7 pós-infecção. Para determinação da produção de IL-1 e TNF α no fígado e pulmão, os respectivos órgãos foram coletados no dia 6 pós-infecção, após eutanásia dos animais sob plano anestésico (Cetamina 100 mg/kg e Xilazina 15 mg/kg) seguido por deslocamento cervical.

Preparo de homogenato de tecidos

Para quantificação de citocinas em órgãos, após a eutanásia do animal foi realizado a exérese do mesmo (Fígado e Pulmão), lavado duas vezes em solução salina (PBS), armazenado a -70C até o devido processamento. Após descongelamento, foram pesados 100 mg de tecido por amostra, e colocado em PBS com coquetel de inibidores de protease (Mini cComplete® - Roche). Homogenizado mecanicamente, em tudo cônico de 1,5 mL imerso em gelo, até a completa homogeneização do tecido. Centrifugado à 10.000 rpm, o sobrenadante coletado e utilizado para determinação de citocinas por ELISA comercial (SIMPSON et al., 2010).

Detecção de Citocinas IL-10, IFN γ , TNF α

As citocinas IL-10 , IFN γ , TNF α foram quantificadas em amostras de soro e homogenato de tecido pela técnica ELISA tipo sandwich, seguindo os protocolos recomendados pelo fabricante (BD Biosciences, San Diego, EUA). Sumariamente, placas de poliestireno de alta afinidade (Corning Incorporated Costar®) foram sensibilizadas com os respectivos anticorpos de captura e incubadas overnight à 4°C. Após lavagem das placas com PBS-Twen e bloqueio com PBS contendo 10% soro fetal bovino, as amostras foram adicionadas. Paralelamente, curvas padrões das respectivas citocinas murinas recombinantes foram realizadas em diluições duplo seriadas. Após incubação por 2 horas à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas e incubadas com os respectivos anticorpos de detecção biotinilados e conjugados com estreptavidina-peroxidase por 1 hora à temperatura ambiente. Seguiu-se com o último ciclo de lavagem, as placas foram reveladas com a adição

do substrato enzimático (H_2O_2 a 0,03% e tetrametilbenzidina [TMB]). A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placas a 450 nm e os valores de DO obtidos foram convertidos em pg/mL de acordo com a curva padrão, utilizando-se o *software* SoftMax Pro (Molecular Devices).

Monitoramento da parasitemia

Após desafio com *P. berghei* – ANKA – GFP+, a parasitemia dos animais tratados ou não com NLA foi avaliada no 6º e 14º dia pós-infecção através da técnica de citometria de fluxo. Para tal, 10µL de sangue coletado da veia da cauda através de punção com agulha foi adicionado em 500 µL de PBS para posterior leitura em aparelho BD FACSCantoII®. A parasitemia foi indiretamente verificada pela porcentagem de eritrócitos GFP+.

Análise de sobrevida

Para análise de sobrevida camundongos C57BL/6 infectados previamente com 1×10^6 hemácia parasitadas por *P. berghei* – ANKA, foram tratados ou não com NLA (25 µg/animal/dose/IP) nos dias 1 e 3 pós-infecção e acompanhados diariamente por 25 dias para análises de sobrevivência.

Análise estatística

A análise estatística e a construção dos gráficos foram realizadas utilizando o *software* Graph Pad Prism versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Dados foram expressos em média e desvio padrão e analisados pelo teste *one-way* ANOVA, conjuntamente com o *post-test* de comparação múltipla de Bonferroni para comparar pares selecionados de grupos. Todos os resultados foram considerados estatisticamente significantes para um nível de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Com o objetivo de se avaliar potencial terapêutico do NLA em modelo de malária cerebral murina, ensaios de sobrevida foram realizados com intuito de se observar a capacidade de resgate de animais desafiados com dose letal de *P. berghei*- ANKA. Para tal, camundongos da linhagem C57BL/6 foram infectados com 1×10^6 hemácia parasitadas por *P. berghei*-ANKA, tratados ou não com NLA (25 μ g/animal/dose) e acompanhados diariamente durante 25 dias. Observou-se que antígenos solúveis de *N. caninum* retardam significativamente a morte induzida por *P. berghei*-ANKA (Figura 14).

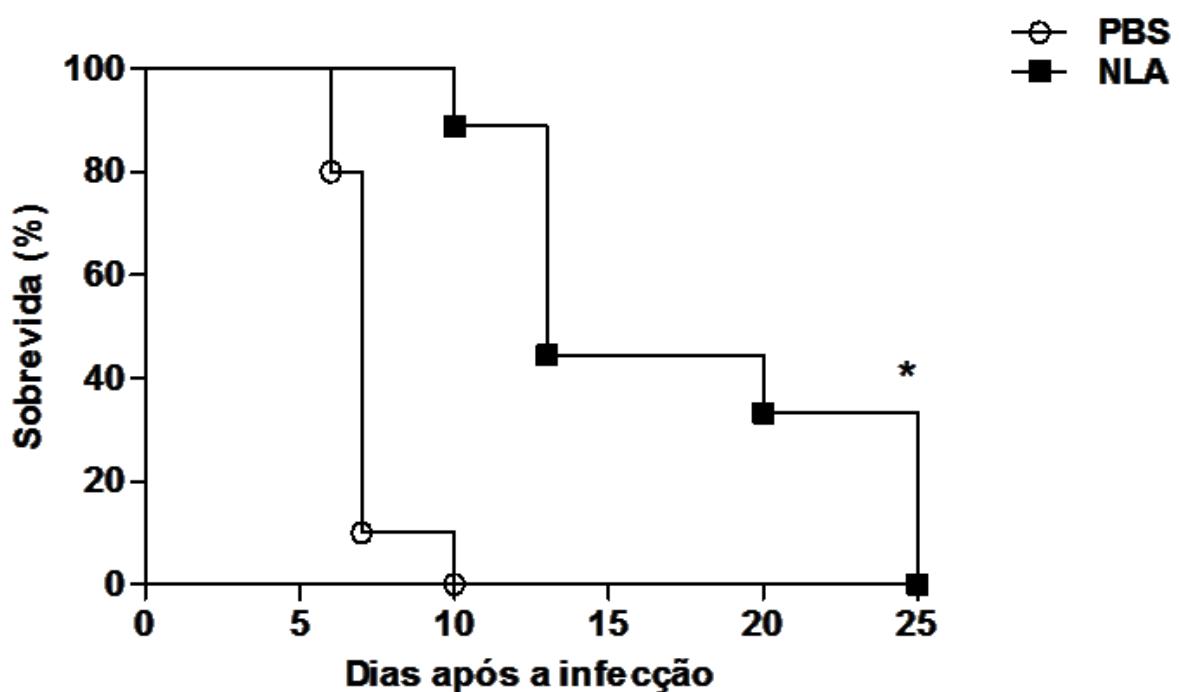


Figura 14: O tratamento com NLA retarda a morte induzida pela infecção por *P. berghei* - ANKA em camundongos C57BL/6. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 1×10^6 hemácia infectadas por *P. berghei*-ANKA, via intraperitoneal, tratados ou não com NLA (25 μ g/animal/dose/IP), e acompanhados diariamente por 25 dias. A curva de sobrevida foi realizada com 10 animais/grupo. As diferenças em relação aos grupos foram compradas utilizando os testes de Kaplan-Mieir, seguido de Mantel-Cox. Os resultados são representativos de três experimentos independentes e expressos como média \pm SD. * Indica diferenças estatisticamente significantes, em que $p < 0.05$.

Uma vez observado que camundongos tratados com NLA apresentam maior sobrevida, nosso próximo passo foi avaliar alguns fatores imunes que poderiam estar relacionados à maior resistência observada. Taís fatores foram as citocinas IFN γ , IL-10 e TNF α que estão relacionadas à patogênese da malária em modelo murino. Inicialmente determinamos as concentrações séricas de IFN γ , citocina chave na indução dos sintomas de malária cerebral murino, nos dias três e sete pós-infecção. Conforme apresentado abaixo (Figura 15A e 15B), foi observado que o tratamento com NLA reduz significativamente os níveis desta citocina nos dias 3 e 7 pós- infecção.

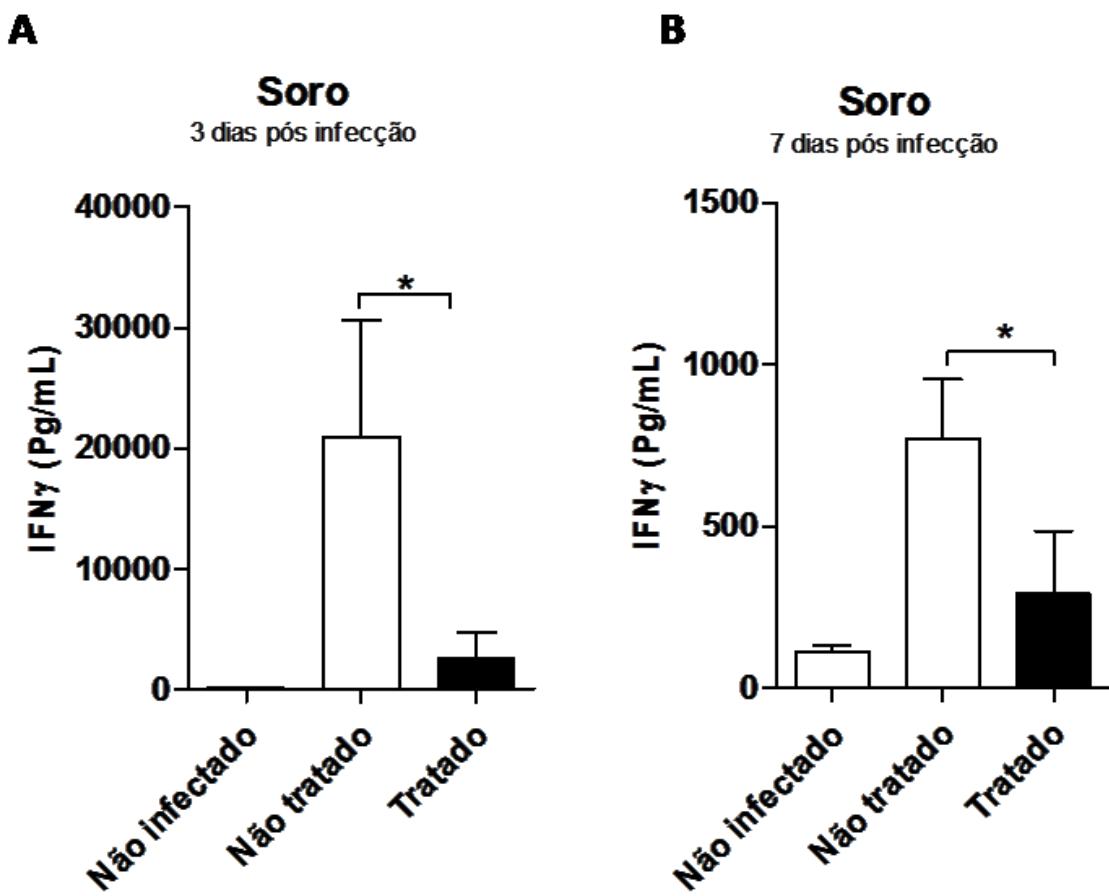


Figura 15: O tratamento com NLA reduz drasticamente a produção da citocina IFN γ .
 Camundongos C57BL/6 foram infectados com 1×10^6 hemárias infectadas por *P. berghei*-ANKA, via intraperitoneal, tratados ou não com NLA (25 μ g/animal/dose/IP). Nos dias 3 e 7 pós-infecção foram coletadas amostras de sangue para determinação dos níveis séricos de IFN γ . Em (A) Níveis séricos de IFN γ no 3º dia pós-infecção, e (B) Níveis séricos de IFN γ no 7º dia pós-infecção. Os resultados são representativos de três experimentos independentes e expressos como média \pm SD. * Indica diferenças estatisticamente significantes, em que $p < 0.05$.

Durante infecções por protozoários, dentre eles os do gênero *Plasmodium*, o balanço entre a produção de IFN γ e IL-10 é critico no controle da inflamação, sendo a IL-10 uma das citocinas mais envolvidas com o controle da produção de IFN γ (GONÇALVES et al., 2014). Assim, uma vez observado a redução na produção de IFN γ após tratamento com NLA, nós quantificamos aos níveis séricos de IL-10 no soro de camundongos infectados com *P. berghei*-ANKA e tratados ou não com NLA. Curiosamente, não verificamos nenhuma alteração nos níveis de IL-10 como havíamos esperado (Figura 16). Portanto, inferimos que a redução dos níveis de IFN γ após tratamento com NLA não está relacionado ao aumento dos níveis de IL-10.

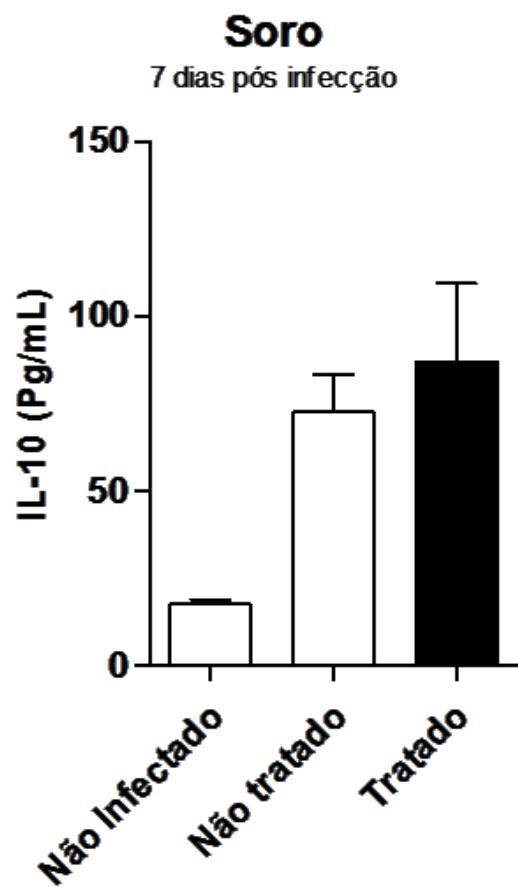


Figura 16: O tratamento com NLA não altera a produção da citocina IL-10. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 1×10^6 hemácia infectadas por *P. berghei*-ANKA, via intraperitoneal, tratados ou não com NLA (25 μ g/animal/dose/IP). No dia 7 pós-infecção foram coletadas amostras de sangue para determinação dos níveis séricos de IL-10. Os resultados são representativos de três experimentos independentes e expressos como média \pm SD.

Em infecções causadas pelos parasitos do gênero *Plasmodium*, diversos órgãos são acometidos (OCA et al., 2013; HUANG et al., 2015). Dentre eles o fígado e pulmão são importantes alvos. Portanto, após avaliar a produção de IFN γ e IL-10 no soro, nós buscamos avaliar diretamente nestes órgãos (homogenato de órgão) a produção das citocinas IL-1 e TNF α . Conforme apresentado abaixo, foi detectado que o tratamento com NLA não altera a produção de IL-10 e TNF α no fígado (Figura 17A e 17B). Contudo, altera de maneira significativa a produção destas citocinas no pulmão, onde se tem uma redução na produção de IL-10 (Figura 17C) e um aumento de TNF α (Figura 17D). Em conjunto, estes resultados indicam que o tratamento com NLA apresenta efeito modulatório na produção de citocinas, sendo este órgão-dependente.

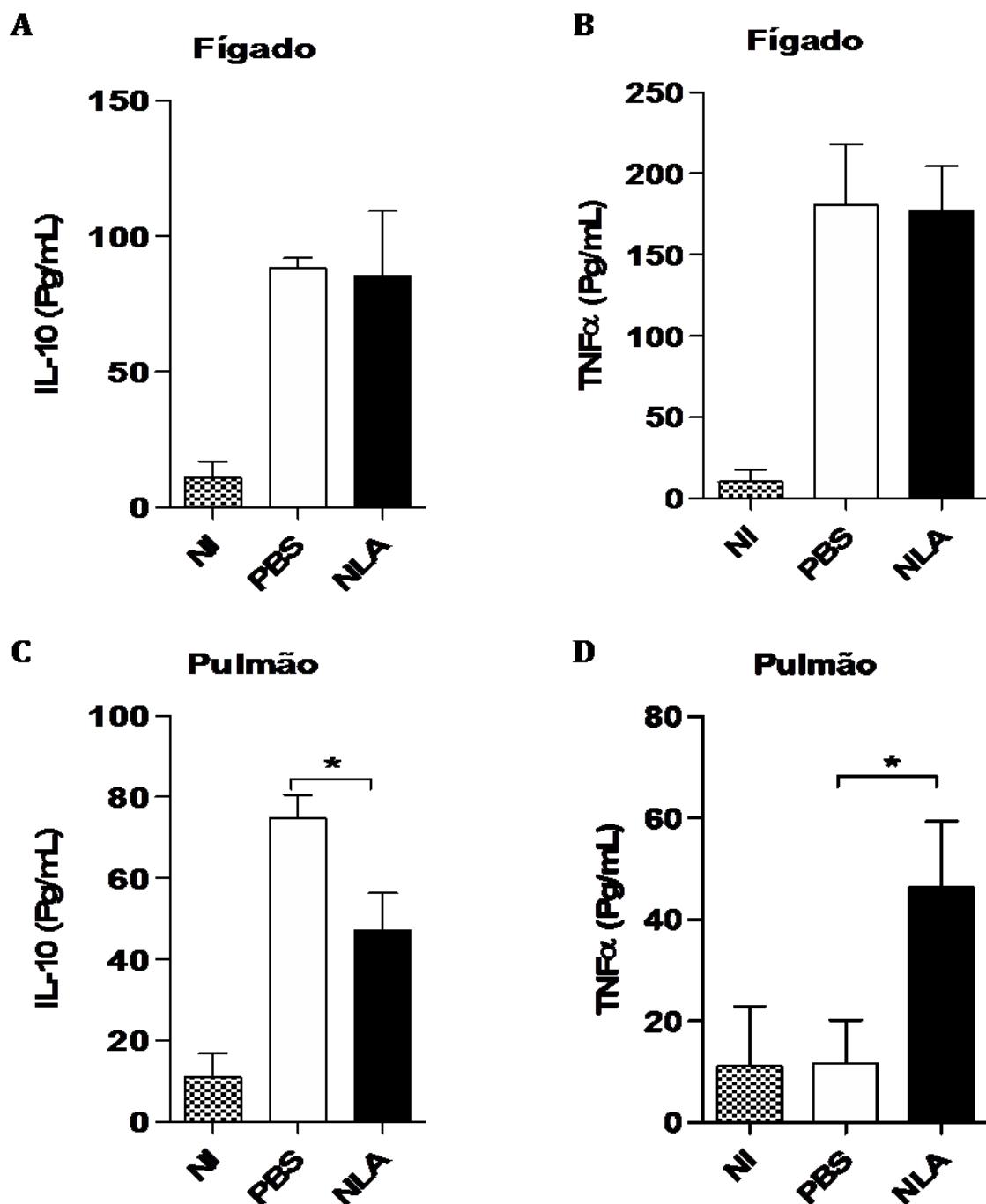


Figura 17: O tratamento com NLA altera a produção das citocinas IL-10 e TNF α de maneira órgão específica. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 1×10^6 hemácia infectadas por *P. berghei*-ANKA, via intraperitoneal, tratados ou não com NLA (25 μ g/animal/dose/IP). No dia 7 pós-infecção eutanasiados e coletado pulmão e fígado para determinação de citocinas. Os resultados são representativos de três experimentos independentes e expressos como média \pm SD. * Indica diferenças estatisticamente significantes, em que $p < 0.05$.

Visto que o tratamento com NLA altera a produção de citocinas e induz maior sobrevida nos animais, a parasitemia também foi avaliada no 6º e 14º dia pós- infecção com intuito de verificar a proliferação do parasito durante a fase sanguínea de seu ciclo de vida. Foi detectado que o tratamento com NLA não altera a parasitemia na fase aguda da infecção (Figura 18), demonstrando que NLA possui potencial modulatório da produção de citocinas, podendo esta ser uma possível via para proteção observada nos animais tratados. Contudo, não apresenta efeito direto no controle da parasitemia.

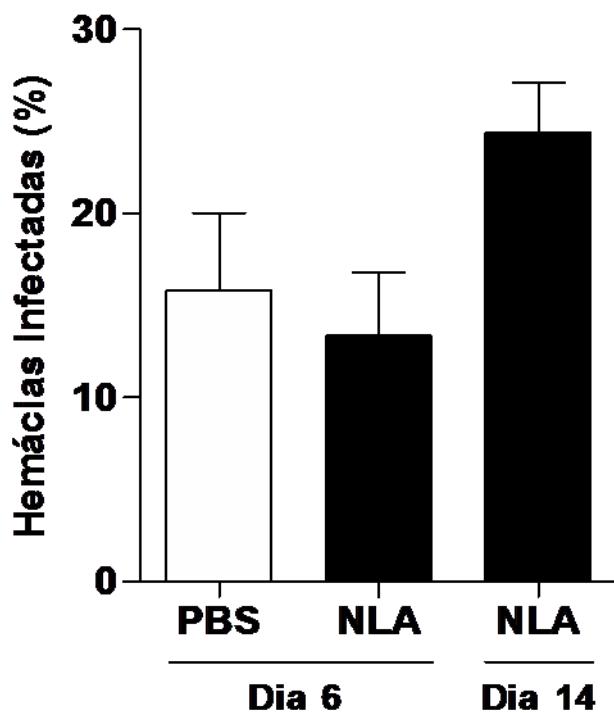


Figura 18: Antígenos Solúveis de *N. caninum* não interfere com a parasitemia por *P. berghei*-ANKA. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 1×10^6 hemárias infectadas por *P. berghei*-ANKA, via intraperitoneal, tratados ou não com NLA (25 μ g/animal/dose/IP). Nos dia 6 e 14 pós-infecção foram coletadas amostras de sangue por punção caudal para analise de parasitemia por citometria de fluxo. Os resultados são representativos de três experimentos independentes e expressos como média \pm SD.

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou a eficácia do NLA como indutor de resposta imunológica frente infecção por *P. berghei*-ANKA em camundongos C57BL/6. Especificamente, duas doses, a primeira no dia 1º e a segunda no 3º dia pós-infecção por *P. berghei*-ANKA, foram suficientes para prolongar o tempo de vida destes animais consideravelmente (Figura 14).

A fim de elucidar os mecanismos pelos quais a resposta imunológica destes animais foi mais eficiente, quantificamos os níveis de IFN γ no soro. Estudos anteriores demonstraram que maiores níveis desta citocina promovem maior expressão de ICAM-1 no endotélio cerebral (BERENDT et al., 1989). O ICAM-1 possui capacidade de interação com PfEMP-1, expresso por eritrócitos infectados por *Plasmodium* (BARUCH et al., 1996). Este pode ser um indicio do acúmulo de eritrócitos no cérebro em casos de malária cerebral e justifica que no presente estudo, a diminuição dos níveis de IFN γ sérico nos primeiros dias de infecção (Figura 15) foi decisiva para o aumento da sobrevida dos camundongos, uma vez que estes não apresentaram quadros de MC e sobreviveram até o 25º dia de infecção, sendo o motivo provável do óbito a alta parasitemia (Figura 18). Em outras infecções por parasitos Apicomplexas, alterações dos níveis de IL-10 sérico estão intimamente ligadas a mudanças nos níveis de IFN γ , como é o caso da infecção por *Leishmania* sp (ANDERSON et al., 2007), embora não tenha sido observado este fenômeno na infecção por *P. berghei*-ANKA no presente estudo (figuras 15 e 16). No trabalho de Jagannathan et al (2014) também não foram observadas alterações correlacionadas entre os níveis de IL-1 e IFN γ em crianças altamente expostas ao *Plasmodium*.

Sendo o fígado um órgão alvo da replicação de parasitos do gênero *Plasmodium*, nós buscamos elucidar a participação de citocinas chaves (IL-10 e TNF α) neste processo no órgão em questão. Verificamos que o tratamento com NLA não induz alterações significativas na produção destas citocinas no órgão. Tal fenômeno pode ter se dado devido à data (7º dia de infecção) em que se avaliou a produção ou mesmo por especificidades da via de inoculação do parasito. Haja visto que o fígado é órgão alvo do parasito durante a infecção natural através do repasse sanguíneo pelo mosquito, diferentemente da inoculação intraperitoneal do modelo experimental.

Para avaliar os efeitos do *P. berghei*-ANKA no pulmão foram analisados os níveis de TNF α e IL-10. O aumento dos níveis TNF α colabora com a permeabilidade dos capilares sanguíneos alveolares, facilitando a entrada de fluido intravascular no mesmo

(MOHAN; SHARMA; BOLLINENI, 2008). Em contrapartida, o IL-10, por possuir efeitos anti-inflamatórios, contribui para a não permeabilidade destes capilares. Este fenômeno é conhecido como Síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e é uma das complicações da malária grave. No atual estudo, foi observado o aumento de TNF α e diminuição da IL-10 no pulmão de animais tratados (Figuras 17C e 17D), sugerindo uma piora no quadro pulmonar destes animais, além de uma ação órgão e citocina dependentes do NLA, já que o fígado não demonstrou alterações (Figuras 17A e 17B). Van Den Steen et. al (2010) utilizaram cepas de *P. berghei* - NK65 para a indução exclusiva de quadros de SDRA e constataram maior sobrevida destes animais se comparados àqueles infectados com *P. berghei*-ANKA e que, por consequente, desenvolveram outros quadros de malária grave. Estes resultados podem confirmar a diferença na taxa de sobrevivência dos animais do atual estudo (Figura 14).

Assim como comprovado por Mercado e Coatney (1951) e atualmente reforçado pelo trabalho de Pereira (2016), os níveis de parasitemia em infecção por *P. berghei*-ANKA tendem a crescer exponencialmente até a morte dos camundongos, que ocorre por volta do 7º dia de infecção. No presente trabalho, estes resultados foram comprovados no grupo não tratado com NLA, enquanto os camundongos tratados, embora apresentassem alta parasitemia, não foram a óbito na data prevista. Tal fato comprova a eficácia do NLA como indutor de resposta imune frente infecção por *P. berghei*-ANKA.

CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados apresentados no primeiro capítulo deste trabalho demonstram que Dectina-1, um receptor de β -glucanos, agrava os sintomas de malária cerebral em modelo murino. Uma vez que se observou em animais Dectina-1^{-/-} maior sobrevida associada à menor incidência de sinais clínicos de malária cerebral, maior integridade da barreira hematoencefálica, menor parasitismo hepático e parasitemia, bem como maior expressão de IFN β por células hepáticas. Tais resultados confirmam nossa hipótese de que este receptor de reconhecimento padrão pode ser visto como um alvo para o desenvolvimento de medidas terapêuticas contra malária cerebral, através do uso de bloqueadores efetivos desta via de sinalização imune inata.

Similarmente, os efeitos protetores contra a infecção causada por *P. berghei*-ANKA foram observados quando utilizamos抗ígenos solúveis de *N. caninum* para o tratamento da malária cerebral experimental murina. Conforme apresentado no segundo capítulo deste trabalho, onde demonstramos que camundongos tratados com NLA apresentam aumento significativo da sobrevida, concomitante com redução de IFN γ no soro e aumento de TNF α nos pulmões. Adicionalmente, inferimos que a maior sobrevida observada no grupo tratado não está diretamente associada ao controle da parasitemia, uma vez que animais tratados não apresentam redução na proliferação do parasito durante a fase sanguínea, mas sim à modulação da resposta imune do hospedeiro, culminando em um curso clínico mais brando da doença. Portanto, assim como possíveis bloqueadores de Dectina-1,抗ígeno solúvel de *N. caninum* apresenta características farmacológicas importantes para o melhor controle da malária cerebral, principalmente sua associação a drogas já existentes que controlam a replicação parasitária como a cloroquina.

REFERÊNCIAS

- ADEMOLA, I. O.; ODENIRAN, P. O. Co-infection with *Plasmodium berghei* and *Trypanosoma brucei* increases severity of malaria and trypanosomiasis in mice. **Acta tropica**, v. 159, p. 29-35, 2016.
- AGNANDJI, S. T. *et al.* First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. **The New England Journal of Medicine**, v. 365, p. 1863–1875, 2011.
- ALIBERTI, J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 2, p. 162-170, 2005.
- ALMERIA, S. *et al.* Cytokine gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from *Neospora caninum* naturally infected dams throughout gestation. **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 3, p. 237-243, 2012.
- AMANI, V. *et al.* Involvement of IFN- γ receptor-mediated signaling in pathology and anti-malarial immunity induced by *Plasmodium berghei* infection. **European Journal of Immunology**, v. 30, n. 6, p. 1646-1655, 2000.
- AMANTE, F. H. *et al.* Immune-mediated mechanisms of parasite tissue sequestration during experimental cerebral malaria. **The Journal of Immunology**, v. 185, p. 3632– 3642, 2010.
- ANDERSON, C. F. *et al.* CD4+ CD 5– Foxp3– Th1 cells are the source of IL-10– mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, p. 285-297, 2007.
- ANTONELLI, L. R. *et al.* The CD14 $^{+}$ CD16 $^{+}$ inflammatory monocyte subset displays

increased mitochondrial activity and effector function during acute *Plasmodium vivax* malaria. **PLoS Pathogens**, v. 10, e1004393, 2014.

ARAMBURÚ, J.; RAMAL, C.; WITZIG, R. Malaria Reemergence in the Peruvian Amazon Region. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, p. 209–215, 1999.

ARBOLEDA SÁNCHEZ, J. *et al.* Malaria grave por *Plasmodium falciparum*. **Medicina Intensiva**, v. 34, p. 574-574, 2010.

ARIIZUMI, K. *et al.* Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 20157-20167, 2000.

ARTAVANIS-TSAKONAS, K.; RILEY, E. M. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN- γ from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*- infected erythrocytes. **The Journal of Immunology**, v. 169, p. 2956–2963, 2002.

ATAIDE, M. A. *et al.* Malaria-induced NLRP12/NLRP3-dependent caspase-1 activation mediates inflammation and hypersensitivity to bacterial superinfection. **PLoS Pathogens**, v. 10, e1003885, 2014.

AWANDARE, G. A. *et al.* Mechanisms of erythropoiesis inhibition by malarial pigment and malaria-induced proinflammatory mediators in an *in vitro* model. **American Journal of Hematology**, v. 86, p. 155–162, 2011.

BACCARELLA, A. *et al.* Loss of Toll-like receptor 7 alters cytokine production and against experimental cerebral malaria. **Malaria Journal**, v. 13, p. 354, 2014.

BALBOA, L. *et al.* Monocyte-derived dendritic cells early exposed to *Mycobacterium tuberculosis* induce an enhanced T helper 17 response and transfer mycobacterial antigens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 306, p. 541-553, 2016.

BALDACCI, P.; MENARD, R. The elusive malaria sporozoite in the mammalian host. **Molecular Microbiology**, v. 54, p. 298–306, 2004.

BARUCH, D. *et al.* *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 3497-3502, 1996.

BASTOS, K. R. *et al.* Impaired macrophage responses may contribute to exacerbation of blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* malaria in interleukin-12-deficient mice. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 22, p. 1191–1199, 2002.

BEITING, D. P. *et al.* Differential Induction of TLR3-Dependent innate immune Signaling by Closely Related Parasite Species. **PLoS One**, v. 9, e88398, 2014.

BELNOUE, E. *et al.* On the pathogenic role of brainsequestered alphabeta CD8 T cells in experimental cerebral malaria. **The Journal of Immunology**, v. 169, p. 6369– 6375, 2002.

BERENDT, A. *et al.* Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. **Nature**, v. 341, n. 6237, p. 57-59, 1989.

BIRON, C. A.; GAZZINELLI, R. T. Effects of IL-12 on immune responses to microbial infections: a key mediator in regulating disease outcome. **Current Opinion in Immunology**, v. 7, p. 485-496, 1995.

BOURGEOIS, C. *et al.* Conventional dendritic cells mount a type I IFN response against *Candida* spp. requiring novel phagosomal TLR7- mediated IFN- β signaling. **The Journal of**

Immunology, v. 186, p. 3104-3112, 2011.

BOYLE, M. J. *et al.* Human antibodies fix complement to inhibit *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes and are associated with protection against malaria. **Immunity**, v. 42, p. 580-590, 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia Prático de tratamento da malária no Brasil.

Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_malaria.pdf>. Acesso em: 29 ago.

BROWN, G. D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 33–43, 2006.

BUCHER, K. *et al.* Schistosoma co-infection protects against brain pathology but does not prevent severe disease and death in a murine model of cerebral malaria. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p 21–31, 2011.

BUXTON, D. *et al.* *Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis: new aspects of an old story. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 25-28, 2007.

CALDERARO, A. *et al.* Accurate identification of the six human *Plasmodium* spp. causing imported malaria, including *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium knowlesi*. **Malaria Journal**, v. 12, p. 321, 2013.

CHAMILOS, G. *et al.* Generation of IL-23 producing dendritic cells (DCs) by airborne fungi regulates fungal pathogenicity via the induction of TH-17 responses. **PLoS ONE**, v. 5, e12955, 2010.

CHANG, K. H.; STEVENSON, M. M. Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 1501–1516, 2004.

CHENETTE, E. J. Recente buzz in malária research. **The FEBS Journal**, v. 284, p. 2556–2559, 2017.

CLARK, I.; ROCKETT, K. The cytokine theory of human cerebral malaria. **Parasitology Today**, v. 10, p. 410-412, 1994.

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

CLARK, I. A. *et al.* Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. **Malaria Journal**, v. 5, p. 85, 2006.

COBAN, C. *et al.* Pathological role of Tol-like receptor in cerebral malaria. **International Immunology**, v. 19, p. 67-79, 2007.

COBAN, C. *et al.* Immunogenicity of whole-parasite vaccines against *Plasmodium falciparum* involves malarial hemozoin and host TLR9. **Cell Host & Microbe**, v. 7, p. 50–61, 2010.

COHEN, S.; MCGREGOR, I.; CARRINGTON, S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. **Nature**, v. 192, p. 733-737, 1961.

COHEN, S.; BUTCHER, G.; CRANDALL, R. Action of malarial antibody in vitro. **Nature**, v. 223, p. 368-371, 1969.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E. *et al.* Temporal distribution and parasite load kinetics in blood and tissues during *Neospora caninum* infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 2491-2494, 2006.

COWMAN, A. F.; BERRY, D.; BAUM, J. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. **The Journal of Cell Biology**, v. 198, p. 961-971, 2012.

COWMAN, A. F.; TONKIN, J. C.; THAM, W-H.; DURAISINGH, M. T. The molecular basis of Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. **Cell Host & Microbe**, v. 22, p. 232-245,

2017.

CRAMER, J. P. *et al.* MyD88/IL-18-dependent pathways rather than TLRs control early parasitaemia in non-lethal *Plasmodium yoelii* infection. **Microbes and Infection**, v. 10, p. 1259–1265, 2008.

CROMPTON, P. D. *et al.* A prospective analysis of the Ab response to *Plasmodium falciparum* before and after a malaria season by protein microarray. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, p. 6958-6963, 2010.

CUNNINGTON, A. J., RILEY, E. M.; WALTHER, M. Stuck in a rut? Reconsidering the role of parasite sequestration in severe malaria syndromes. **Trends in Parasitology**, v. 29, p. 585–592, 2013.

DAS, S.; *et al.* Multiple essential functions of *Plasmodium falciparum* actin-1 during malária bood-stage development. **BMC Biology**, v. 15, p. 70, 2017.

DAVOLI-FERREIRA, M. *et al.* Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 prompts potent inflammatory stimuli during *Neospora caninum* infection. **Scientific Reports**, v. 6, p. 29289, 2016.

de OCA, M. M.; ENGWERDA, C.; HAQUE, A. *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) infection of C57BL/6J mice: a model of severe malaria. **Methods in Molecular Biology**, v. 1031, p. 203-213, 2013.

de SOUZA, J. B. *et al.* Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. **Parasitology**, v. 137, p. 755–772, 2010.

DEANE, L. M.; CAUSEY, O. R.; DEANE, M. P. Notas sobre a distribuição e a biologia dos anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil. **Revista de Serviço Especial de Saúde Pública**, v. 1, p. 827–965, 1948.

DEL FRESNO, C. *et al.* Interferon- β production via dectin-1-Syk- IRF5 signaling in dendritic cells is crucial for immunity to *C. albicans*. **Immunity**, v. 38, p. 1176-1186, 2013.

DELVES, M. *et al.* The activities of Current Antimalarial Drugs on the Life Cycle Stages of Plasmodium: A Comparative Study with Human and Rodent Parasites. **Plos Medicine**, v. 9, e1001169, 2012.

DRICKAMER, K.; FADDEN, A. J. Genomic analysis of C-type lectins. **Biochemical Society Symposia**, v. 69, p. 59-72. 2002.

DRUMMOND, R. A.; BROWN, G. D. Signalling C-type lectins in antimicrobial immunity. **PLoS Pathogens**, v. 9, e1003417, 2013.

DUBEY, J. *et al.* Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, p. 1269-1285, 1988.

DUBEY, J.; JONES, J. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International journal for parasitology**, v. 38, p. 1257-1278, 2008.

DUBEY, J. *et al.* Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary parasitology**, v. 181, p. 382-387, 2011.

ECKWALANGA M, *et al.* Murine AIDS protects mice against experimental cerebral malaria: downregulation by interleukin 10 of a T-helper type 1 CD4 cell-mediated pathology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 8097– 8101, 1994.

ENGWERDA, C. R. *et al.* Locally up-regulated lymphotoxin alpha, not systemic tumor necrosis factor alpha, is the principle mediator of murine cerebral malaria. **The Journal of Experimental Medicine**, v, 195, p. 1371–1377, 2002.

ENOMOTO, M. *et al.* Blockage of Spontaneous Ca²⁺ Oscillation Causes Death in intraerythrocytic *Plasmodium falciparaum*. **Plos One**, v. 7, e39499, 2012.

FAUCONNIER, M. *et al.* IL-12R2 is essential for the development of experimental cerebral malaria. **The Journal of Immunology**, v. 188, p. 1905–1914, 2012.

FLORES-MENDOZA, C. *et al.* Natural *Plasmodium* Infections in *Anopheles darlingi* and *Anopheles benarrochi* (Diptera: Culicidae) from Eastern Peru. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, p. 489–494, 2004.

FORATTINI, O. P. **Entomología médica: Parte Geral, Diptera, Anophelini**. Volume I. São Paulo: Faculdade de Higiene e Saúde Pública. Universidade de São Paulo, 1962.

FORATTINI, O. P. Exophilic Behavior of *Anopheles darlingi* Root in a southern region of Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 21, p. 291–304, 1987.

FOWKES, F. J.; BOEUF, P.; BEESON, J. G. Immunity to malaria in an era of declining malaria transmission. **Parasitology**, v. 143, p. 139-153, 2016.

FRAENKEL, S.; BERGMAN, Y. Variability and exclusion in host and parasite: epigenetic regulation of Ig and var expression. **The Journal of Immunology**, v. 177, p. 5767-5774, 2006.

FRANÇA, T. C. *et al.* A complete model of the *Plasmodium falciparum* bifunctional enzyme dihydrofolate reductase-thymidylate synthase: a model to design new antimalarials. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, p. 450-454, 2004.

FRANÇA, T. C.; SANTOS, M. G. D.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, v. 31, p. 1271-1278, 2008.

FRANKLIN, B. S. *et al.* MyD88-dependent activation of dendritic cells and CD4⁺ T lymphocytes mediates symptoms, but is not required for the immunological control of parasites during rodent malaria. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 881–890, 2007.

FRANKLIN, B. S. *et al.* Malaria primes the innate immune response due to interferon- γ induced enhancement of Toll-like receptor expression and function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 106, p. 5789–5794, 2009.

FRANKLIN, B. S. *et al.* Therapeutical targeting of nucleic acid-sensing Toll-like receptors prevents experimental cerebral malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**

of the United States of America, v. 108, p. 3689–3694, 2011.

GAZZINELLI, R. T. *et al.* Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, v. 153, p. 2533-2543, 1994.

GAZZINELLI, R. T. *et al.* Innate sensing of malaria parasites. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, p. 744–57, 2014.

GAZZINELLI, R. T.; ROPERT, C.; CAMPOS, M. A. Role of the Toll/interleukin- 1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. **Immunological reviews**, v. 201, p. 9-25, 2004.

GEIJTENBEEK, T. B. H; GRINGHUIS, S. I. C-type lectin receptors in the control of T helper cell differentiation. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, p. 433-448, 2016.

GENTON, B. *et al.* A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces *Plasmodium falciparum* density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase 1- 2b trial in Papua New Guinea. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, p. 820– 827, 2002.

GESSNER, M. A. *et al.* Dectin-1-dependent interleukin-22 contributes to early innate lung defense against *Aspergillus fumigatus*. **Infection and Immunity**, v. 80, p. 410– 417, 2012.

GHANI, A. C. *et al.* Loss of population levels of immunity to malaria as a result of exposure-reducing interventions: consequences for interpretation of disease trends. **PLoS One**, v. 4, p. e4383, 2009.

GOHEEN, M. M. *et al.* The role of the red blood cell in host defence against falciparum malaria: an expanding repertoire of evolutionary alterations. **Br. J. Haematol**, DOI: 10.1111/bjh. 14886

GONÇALVES, B. P. *et al.* Parasite burden and severity of malaria in Tanzanian children. **The New England Journal of Medicine**, v.370, p. 1799-1808.

GONDIM, L. F. *et al.* Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*.

International Journal for parasitology, v. 34, p. 159-161, 2004.

GOODRIDGE, H. S. *et al.* Differential use of CARD9 by dectin-1 in macrophages and dendritic cells. **The Journal of Immunology**, v. 182, p. 1146-1154, 2009.

GOODRIDGE, H. S. *et al.* Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a‘phagocytic synapse’. **Nature**, v. 472, p. 471-475, 2011.

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 13, p. 133-150, 2013.

GOUBAU, D.; DEDDOUCHÉ, S.; REIS E SOUSA, C. Cytosolic sensing of viruses. **Immunity**, v. 38, p. 855-869, 2013.

GOWDA, N. M., WU, X.; GOWDA, D. C. TLR9 and MyD88 are crucial for the development of protective immunity to malaria. **The Journal of Immunology**, v. 188, p. 5073–5085, 2012.

GRAU, G. E. *et al.* Monoclonal antibody against interferon gamma can prevent experimental cerebral malaria and its associated overproduction of tumor necrosis factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 86, p. 5572–5574, 1989.

GRAU, G. E. *et al.* Platelet accumulation in brain microvessels in fatal pediatric cerebral malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 187, p. 461– 466, 2003.

GRINGHUIS, S. I. *et al.* Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-κ activation through Raf-1 and Syk. **Nature Immunology**, v. 10, p. 203–213, 2009.

GRINGHUIS, S. I. *et al.* Selective c-Rel activation via Malt1 controls anti-fungal TH- 17 immunity by dectin-1 and dectin-2. **PLoS Pathogens**, v. 7, e1001259, 2011.

GRINGHUIS, S. I. *et al.* Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1 β via a noncanonical caspase-8 inflammasome. **Nature Immunology**, v.

13, p. 246-254, 2012.

GUERMONPREZ, P. *et al.* Inflammatory Flt3l is essential to mobilize dendritic cells and for T cell responses during *Plasmodium* infection. **Nature Medicine**, v. 19, p. 730–738, 2013.

GUÍA para la atención clínica integral del paciente con malaria. Bogotá: Instituto Nacional de Salud, 2010.

GUIA prático de tratamento da malária no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. GUIA de Vigilância em Saúde. Brasilia: Ministério da Saúde, 2013.

HAQUE, A. *et al.* High Parasite Burdens Cause Liver Damage in Mice following *Plasmodium berghei* ANKA infection Independently of CD8+ T Cell-Mediated Immune Pathology. **Infection and Immunity**, v. 79, p. 1882-1888, 2011.

HAQUE, A. *et al.* Type I interferons suppress CD4⁺ T-cell-dependent parasite control during blood-stage *Plasmodium* infection. **European Journal of Immunology**, v. 41, p. 2688–2698, 2011.

HAQUE, A. *et al.* Type I IFN signaling in CD8-DCs impairs Th1-dependent malaria immunity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 124, p. 2483–2496, 2014.

HARDISON S. E.; BROWN, G. D. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. **Nature Immunology**, v. 13, p. 817-822, 2012.

HED, J.; DAHLGREN, C.; RUNDQUIST, I. A simple fluorescence technique to stain the plasma membrane of human neutrophils. **Histochemistry**, v. 79, p. 105–110, 1983.

HEMPHILL, A.; VONLAUFEN, N.; NAGULESWARAN, A. Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 133, p. 261-278, 2006.

HERMSEN, C. *et al.* Depletion of CD4 or CD8 T-cells prevents *Plasmodium berghei* induced cerebral malaria in end-stage disease. **Parasitology**, v. 114, p. 7–12, 1997.

HIGASHINO-KAMEDA, M. *et al.* A critical role of Dectin-1 in hypersensitivity pneumonitis. **Inflammation Research**, v. 65, p. 235–244, 2015.

HILL, D. L. *et al.* Opsonising antibodies to *P. falciparum* merozoites associated with immunity to clinical malaria. **PLoS One**, v. 8, p. e74627, 2013.

HISE, A. G. *et al.* An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. **Cell Host & Microbe**, v. 5, p. 487-497, 2009.

HIWAT, H.; BRETAS, G. Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: a review. **Parasites and Vectors**, v. 4, p. 177, 2011.

HOCHMAN, S.; KIM, K. The impact of HIV coinfection on cerebral malaria pathogenesis. **Journal of Neuroparasitology**, v. 3, p. 235547, 2012.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. Comparison of the major antigens of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **International journal for parasitology**, v. 29, p. 1489-1496, 1999.

HOWES, R. E. *et al.* The global distribution of the Duffy blood group. **Nature Communications**, v. 2, p. 266, 2011.

HUAN, M. D. *et al.* Solubilization of water-insoluble β -glucan isolated from *Ganoderma lucidum*. **Journal of Environmental Biology**, v. 29, p. 237-242, 2008.

HUANG, B. W.; PEARMAN, E.; KIM, C. C. Mouse Models of Uncomplicated and Fatal Malaria. **Bio-protocol**, v. 5, e1514, 2015.

HUNT, N. H. *et al.* Murine cerebral malaria: the whole story. **Trends in Parasitology**, v. 26, p. 272–274, 2010.

HUNT, N. H. *et al.* Murine cerebral malaria: the whole story. **Trends in Parasitology**, v. 26, p. 272–274, 2010.

HUSSEIN, K.; MATIN, E.; NERLICH, A. G. Paleopathology of the juvenile Pharaoh

Tutankhamun-90th anniversary of discovery. **European Journal of Pathology**, v. 463, p. 475-479, 2013.

HYDE, J. E. Mechanisms of resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 165-174, 2002.

IDRO, R.; JENKINS, N. E.; NEWTON, C. R. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. **The Lancet Neurology**, v. 4, p. 827–840, 2005.

IDRO, R. *et al.* Burden, features, and outcome of neurological involvement in acute falciparum malaria in Kenyan children. **The Journal of the American Medical Association**, v. 297, p. 2232–2240, 2007.

ING, R., *et al.* Interaction of mouse dendritic cells and malaria-infected erythrocytes: uptake, maturation, and antigen presentation. **The Journal of Immunology**, v. 176, p. 441–450, 2006.

INNES, E. A. *et al.* Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 497-504, 2002.

ITZSTEIN, M. V. *et al.* Hot, sweet and sticky: the glycobiology of *Plasmodium falciparum*. **Trends in Parasitology**, v. 24, p. 210-218, 2008.

JAGANNATHAN, P. *et al.* IFN γ /IL-10 co-producing cells dominate the CD4 response to malaria in highly exposed children. **PLoS Pathogens**, v. 10, p. e1003864, 2014.

JOHN, C. C. *et al.* Adjunctive therapy for cerebral malaria and other severe forms of *Plasmodium falciparum* malaria. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, p. 997–1008, 2010.

JUNIOR, A. G. M. *et al.* SAG2A protein from *Toxoplasma gondii* interacts with both innate and adaptive immune compartments of infected hosts. **Parasites & Vectors**, v. 6, p. 63, 2013.

KAGIRA, J. *et al.* Prevalence and types of coinfections in sleeping sickness patients in Kenya

(2000/2009). **Journal of Tropical Medicine**, v. 2011, 248914, 2011.

KALANTARI, P. *et al.* Dual engagement of the NLRP3 and AIM2 inflammasomes by *Plasmodium*-derived hemozoin and DNA during malaria. **Cell Reports**, v. 6, p. 196–210, 2014.

KERRIGAN, A. M.; BROWN, G. D. Syk-coupled C-type lectins in immunity. **Trends in Immunology**, v. 32, p. 151-156, 2011.

KIHARA, M.; CARTER, J. A.; NEWTON, C. R. J. C. The effect of *Plasmodium falciparum* on cognition: a systematic review. **Tropical Medicine & International Health**, v. 11, p. 386 –397, 2006.

KING, J. S. *et al.* Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 40, p. 945-950, 2010.

KOMP, W. H. W. The occurrence of *Anopheles darlingi* Root in Central America. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 21, p. 659–670, 1941.

KOSSODO, S. *et al.* Interleukin- 10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria. **Immunology**, v. 91, p. 536-540, 1997.

KRISHNA, S. Adjunctive management of malaria. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 25, p. 484 – 488, 2012.

KUHN, S. M.; McCARTHY, A. E. Paediatric malaria: What do pediatricians need to know? **Paediatrics and Child Health**, v. 11, p. 349-354, 2006.

LANGHORNE, J. *et al.* Immunity to malaria: more questions than answers. **Nature Immunology**, v. 9, p. 725-732, 2008.

LARSON, R. L.; HARDIN, D. K.; PIERCE, V. L. Economic considerations for diagnostic and control options for *Neospora caninum*-induced abortions in endemically infected herds of beef cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, p. 1597-

1604, 2004.

LEVINE, N. D. **The protozoan phylum Apicomplexa**. Volume I. Boca Raton: CRC Press, 1988.

LI, C.; CORRALIZA, I.; LANGHORNE, J. A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 4435-4442, 1999.

LIEHL, P. *et al.* Host-cell sensors for *Plasmodium* activate innate immunity against liver-stage infection. **Nature Medicine**, v. 20, p. 47–53, 2014.

LIEHL, P. *et al.* Host-cell sensors for Plasmodium activate innate immunity against liver-stage infection. **Nature Medicine**, v. 20, p. 47–53, 2014.

LIMA-JUNIOR, D. S. *et al.* Dectin-1 Activation during *Leishmania amazonensis* Phagocytosis Prompts Syk-Dependent Reactive Oxygen Species Production To Trigger Inflammasome Assembly and Restriction of Parasite Replication. **The Journal Immunology**, ji1700258, 2017.

LOURES, F. V. *et al.* TLR-4 cooperates with Dectin-1 and mannose receptor to expand Th17 and Tc17 cells induced by *Paracoccidioides brasiliensis* stimulated dendritic cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 261, 2015.

MA, J. *et al.* Cutting edge: FYCO1 recruitment to dectin-1 phagosomes is accelerated by light chain 3 protein and regulates phagosome maturation and reactive oxygen production. **The Journal of Immunology**, v. 192, p. 1356-1360, 2014.

MACHADO, P. R. *et al.* Mecanismos de resposta imune às infecções Immune response mechanisms to infections. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, p. 647-664, 2004.

MARAKALALA, M. J.; KERRIGAN, A. M.; BROWN, G. D. Dectin-1: a role in antifungal defense and consequences of genetic polymorphisms in humans. **Mammalian Genome**, v. 22, p. 55-65, 2011.

MARTINS, Y. C. *et al.* Efficacy of different nitric oxide-based strategies in preventing experimental cerebral malaria by *Plasmodium berghei* ANKA. **PLoS One**, v. 7, e32048, 2012.

MATUSCHEWSKI, K. *et al.* *Plasmodium* sporozoite invasion into insect and mammalian cells is directed by the same dual binding system. **The EMBO Journal**, v. 21, p. 1597–1606, 2002.

McALLISTER, M. M. *et al.* Rapid communication: Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1473-1479, 1998.

MCINTOSH, M; STONE, B. A; STANISICH, V. A. Curdlan and other bacterial 1-3- beta-D-glucans. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, p. 163-173, 2005.

MEDANA, I. M.; TURNER, G. D. H. Human cerebral malaria and the bloodbrain barrier. **International Journal of Parasitology**, v. 36, p. 555–568, 2006.

MERCADO, T. I.; COATNEY, G. R. The course of the blood-induced *Plasmodium berghei* infection in white mice. **The Journal of Parasitology**, v. 37, p. 479-482, 1951.

MILLER, L. H., *et al.* Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. **Nature Medicine**, v. 19, p. 156–167, 2013.

MILLER, J. L. *et al.* Interferon- mediated innate immune responses against malaria parasite liver stages. **Cell Reports**, v. 7, p. 436–447, 2014.

MINEO, T. W. P. *et al.* Myeloid differentiation factor 88 is required for resistance to *Neospora caninum* infection. **Veterinary Research**, v. 40, p. 32, 2009.

MINEO, T. W. P. *et al.* Recognition by Toll-like receptor 2 induces antigen- presenting cell activation and TH1 programming during infection by *Neospora caninum*. **Immunology and Cell Biology**, v. 88, p. 825- 833, 2010.

MOHAN, A.; SHARMA, S. K.; BOLLINENI, S. Acute lung injury and acute respiratory

distress syndrome in malaria. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 45, p. 179-93, 2008.

MORENO, J. E. *et al.* Abundance, biting behavior and parous rate of anopheline mosquito species in relation to malaria incidence in gold mining areas of Southern Venezuela. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 21, p. 339–349, 2007.

MORRELL, C. N. *et al.* Beta interferon suppresses the development of experimental cerebral malaria. **Infection and Immunity**, v. 79, p. 1750 –1758, 2011.

MOTA, M. M. *et al.* Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. **Science**, v. 291, p. 141-144, 2001.

MOTA, M. M.; HAFALLA, J. C.; RODRIGUEZ, A. Migration through host cells activates *Plasmodium* sporozoites for infection. **Nature Medicine**, v. 8, p. 1318– 1322, 2002.

MURAMATSU, D. *et al.* Aureobasidium pullulans produced β -glucan is effective to enhance Kurosengoku soybean extract induced Thrombospondin-1 expression. **Scientific Reports**, v. 7, p. 2831. 2017.

NIIKURA, M. *et al.* IL-10 plays a crucial role for the protection of experimental cerebral malaria by coinfection with non-lethal malaria parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 40, p. 101–108, 2010.

NJAU, M. N.; JACOB, J. The enigma of memory B cells in malaria. **European journal of immunology**, v. 42, p. 3146-3149, 2012.

OCKENHOUSE, C. F. *et al.* Common and divergent immune response signaling pathways discovered in peripheral blood mononuclear cell gene expression patterns in presymptomatic and clinically apparent malaria. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 5561–5573, 2006.

O'DONNELL, R. A. *et al.* Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-119 are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. **Journal of Experimental Medicine**, v. 193, p. 1403-1412, 2001.

ONISHI, M. *et al.* Hemozoin is a potent adjuvant for hemagglutinin split vaccine without pyrogenicity in ferrets. **Vaccine**, v. 32, p. 3004–3009, 2014.

PALUDAN, S. R.; BOWIE, A. G. Immune sensing of DNA. **Immunity**, v. 38, p. 870- 880, 2013.

PENET, M. F. *et al.* Protection against cerebral malaria by the lowmolecular-weight thiol pantethine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 1321–1326, 2008.

PEREIRA, K. M. L. **Modelo murino - Plasmodium berghei para estudos em malária experimental.** 2016. 45 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

PERRY, J. A. *et al.* Cutting edge: the acquisition of TLR tolerance during malaria infection impacts T cell activation. **The Journal of Immunology**, v. 174, p. 5921– 5925, 2005.

PICHYANGKUL, S. *et al.* Malaria blood stage parasites activate human plasmacytoid dendritic cells and murine dendritic cells through a Toll-like receptor 9- dependent pathway. **The Journal of Immunology**, v. 172, p. 4926–4933, 2004.

PLATO, A.; WILLMENT, J. A.; BROWN, G. D. C-type lectin-like receptors of the dectin-1 cluster: ligands and signaling pathways. **International Reviews of Immunology**, v. 32, p. 134-156, 2013.

PRETTZ, J. *et al.* MapMalária: Um Sistema para Visualização e Monitoramento dos Casos de Malária no Brasil. **Anais do Computer on The Beach**, Florianópolis – Santa Catarina, 2015.

QUINTIN, J. *et al.* *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes. **Cell Host & Microbe**, v. 12, p. 223- 232, 2012.

RACHOU, R. G. Anofelinos do Brasil: Comportamento das espécies vetoras de malária. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 10, p. 145– 181, 1958.

RAGHUPATHY, R. Th 1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. **Immunology Today**, v. 18, p. 478-482, 1997.

RECHT, J. *et al.* Malaria in Brazil, Colombia, Peru e Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. **Malaria Journal**, v. 16, p. 273, 2017.

RENHE, D. C. **Malária grave murina: análise histopatológica e imunológica em tecido cerebral e pulmonar de camundongos C57BL/imunizados com parasitos vivos de fase sanguínea de *Plasmodium berghei* (Cepas ANKA e NK65) e desafiados com *Plasmodium berghei* ANKA.** 2015. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Imunologia e Doenças Infecto - Parasitárias/Genética e Biotecnologia)- Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, 2015.

RÉNIA, L. *et al.* Pathogenic T cells in cerebral malaria. **International Journal of Parasitology**, v. 36, p. 547–554, 2006.

RIBEIRO, D. P. et al. CpG-ODN combined with *Neospora caninum* lysate, but not with excreted-secreted antigen, enhances protection against infection in mice. **Vaccine**, v. 27, p. 2570-2579, 2009.

RILEY, E. M.; STEWART, V. A. Immune mechanisms in malaria: new insights in vaccine development. **Nature Medicine**, v. 19, p. 168–178, 2013.

ROESTENBERG, M. *et al.* Protection against a malaria challenge by sporozoite inoculation. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, p. 468–477, 2009.

RUDIN, W. *et al.* Interferon- γ is essential for the development of cerebral malaria. **European**

Journal of Immunology, v. 27, p. 810-815, 1997.

RUSSELL, P. F. Man's mastery of malaria. **American Journal of Public Health and The Nation's Health**, v. 45, p. 1490–1491, 1955.

RUSSELL, T. L. *et al.* Successful malaria elimination strategies require interventions that target changing vector behaviours. **Malaria Journal**, v. 12, p. 56, 2013.

SABCHAREON, A. *et al.* Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 45, p. 297-308, 1991.

SAEED, S. *et al.* Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. **Science**, v. 345, p. 1251086, 2014.

SANCHEZ, B. A. M.; VAROTTI, F. P., RODRIGUES, F. G.; CARVALHO, L. H. Validation of a *Plasmodium falciparum* parasite transformed with green fluorescent protein for antimalarial drug screening. **Journal of Microbiological Methods**, v.69, p. 518-522, 2007.

SANCHO, D.; REIS e SOUSA, C. Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis. **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 491-529, 2012.

SCHERF, A.; LOPEZ-RUBIO, J. J.; RIVIERE, L. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. **Annual Review of Microbiology**, v. 62, p. 445–470, 2008.

SCHOELER, G. B. *et al.* Geographical distribution of *Anopheles darlingi* in the Amazon Basin Region of Peru. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 19, p. 286–296, 2003.

SCHOFIELD, L.; GRAU, G. E. Immunological processes in malaria pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, p. 722–735, 2005.

SCHWARZER, E. *et al.* Phagocytosis of the malarial pigment, hemozoin, impairs expression of major histocompatibility complex class II antigen, CD54, and CD11c in human monocytes. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 1601–1606, 1998.

SCOTT, P. Development and regulation of cell-mediated immunity in experimental leishmaniasis. **Immunologic Research**, v. 27, p. 489-498, 2003.

SEDEGAH, M., FINKELMAN, F.; HOFFMAN, S. L. Interleukin 12 induction of interferon γ -dependent protection against malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 91, p. 10700–10702, 1994.

SEDER, R. A. *et al.* Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. **Science**, v. 341, p. 1359–1365, 2013.

SETTLES, E. W. *et al.* *Toxoplasma gondii* upregulates interleukin-12 to prevent *Plasmodium berghei*-induced experimental cerebral malaria. **Infection and Immunity**, v. 82, p. 1343-1353, 2014.

SEXTON, A. C. *et al.* Transcriptional profiling reveals suppressed erythropoiesis, up-regulated glycolysis, and interferon-associated responses in murine malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, p. 1245–1256, 2004.

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

SHIKANI, H. J. *et al.* Cerebral malaria: we have come a long way. **American Journal of Pathology**, v. 181, p. 1484–1492, 2012.

SILAMUT, K. *et al.* A quantitative analysis of the microvascular sequestration of malaria parasites in the human brain. **The American Journal of Pathology**, v. 155, p. 395– 410, 1999.

SILVA, H. B. *et al.* IFN- γ -induced priming maintains long-term strain-transcending immunity against blood- stage *Plasmodium chabaudi* malaria. **The Journal of Immunology**, v. 191, p. 5160–5169, 2013.

SILVA, M. V. *et al.* Dectin-1 compromises innate responses and host resistance against *Neospora caninum* infection. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 245, 2017.

SIMPSON, R. J. Homogenization of mammalian tissue. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 7, pdb.prot5455, 2010.

SOUSA, C. R. *et al.* Paralysis of dendritic cell IL-12 production by microbial products prevents infection-induced immunopathology. **Immunity**, v. 11, p. 637-647, 1999.

SPECHT, S. *et al.* Filaria induced IL-10 suppresses murine cerebral malaria. **Microbes and Infection**, v. 12, p. 635– 642, 2010.

SPONAAS, A. M. *et al.* Migrating monocytes recruited to the spleen play an important role in control of blood stage malaria. **Blood Journal**, v. 114, p. 5522– 5531, 2009.

SPOONER, R.; YILMAZ, Ö. The role of reactive-oxygen-species in microbial persistence and inflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 334-352, 2011.

STEVENSON, M. M. *et al.* IL-12-induced protection against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS requires IFN- γ and TNF- α and occurs via a nitric oxide- dependent mechanism. **The Journal of Immunology**, v. 155, p. 2545–2556, 1995.

STEVENSON, M. M.; RILEY, E. M. Innate immunity to malaria. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 169–180, 2004.

STRASSER, D. *et al.* Syk kinase-coupled C-type lectin receptors engage protein kinase C-d to elicit Card9 adaptor-mediated innate immunity. **Immunity**, v. 36, p. 32- 42, 2009.

SETTLES, E. W. et al. *Toxoplasma gondii* Upregulates Interleukin-12 to Prevent *Plasmodium berghei*-Induced Experimental Cerebral Malaria. v. 82, p. 1343-1353, 2014

SU, Z.; STEVENSON, M. M. IL-12 is required for antibody-mediated protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria infection in mice. **The Journal of Immunology**, v. 168, p. 1348–1355, 2002.

TANAKA, T. *et al.* Growth-inhibitory effects of interferon- γ on *Neospora caninum* in murine macrophages by a nitric oxide mechanism. **Parasitology Research**, v. 86, p. 768-771, 2000.

TANIGUCHI, T. *et al.* *Plasmodium berghei* ANKA causes intestinal malaria associated with dysbiosis. **Scientific Reports**, v. 5, p. 15699, 2015.

TAYLOR, W. R. *et al.* Respiratory manifestations of malaria. **Chest**, v. 142, p. 492– 505, 2012.

THERA, M. A. *et al.* A field trial to assess a blood-stage malaria vaccine. **The New England Journal of Medicine**, v. 365, p. 1004–1013, 2011.

TORGLER, R. *et al.* Sporozoite-mediated hepatocyte wounding limits *Plasmodium* parasite development via MyD88-mediated NF- κ B activation and inducible NO synthase expression. **The Journal of Immunology**, v. 180, p. 3990–3999, 2008.

TORGLER, R. *et al.* Sporozoite-mediated hepatocyte wounding limits *Plasmodium* parasite development via MyD88-mediated NF-κ activation and inducible NO synthase expression. **The Journal of Immunology**, v. 180, p. 3990–3999, 2008.

TOTH, A. *et al.* *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* induce different T-cell responses in human peripheral blood mononuclear cells. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 208, p. 690–698, 2013.

TRANAS, J. *et al.* Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, p. 765- 767, 1999.

URBAN, B. C. *et al.* *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. **Nature**, v. 400, p. 73–77, 1999.

VAN DEN BERG, L. M.; GRINGHUIS, S. I.; GEIJTENBEEK, T. B. H. An evolutionary perspective on C-type lectins in infection and immunity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1253, p. 149-158, 2012.

VAN DEN STEEN, P. E. *et al.* Immunopathology and dexamethasone therapy in a new model for malaria-associated acute respiratory distress syndrome. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 181, p. 957-968, 2010.

VAN DEN STEEN, P. E. *et al.* Pathogenesis of malaria- associated acute respiratory distress syndrome. **Trends in Parasitology**, v. 29, p. 346–358, 2013.

VIRIYAKOSOL, S. *et al.* Dectin-1 s required for resistance to coccidioidomycosis in mice. **mBio**, v. 4, e00597–00512, 2013.

VOS, T. *et al.* Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global

Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, v. 388, p. 1545–1602, 2016.

VOZA T. *et al.* Species-specific inhibition of cerebral malaria in mice coinfecte with *Plasmodium* spp. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 4777–4786, 2005.

WALTHER, M. *et al.* Innate immune responses to human malaria: heterogeneous cytokine responses to blood-stage *Plasmodium falciparum* correlate with parasitological and clinical outcomes. **The Journal of Immunology**, v. 177, p. 5736–5745, 2006.

WANG, H. *et al.* C-type lectin receptors differentially induce th17 cells and vaccine immunity to the endemic mycosis of North America. **The Journal of Immunology**, v. 192, p. 1107–1119, 2014.

WANG, H. *et al.* Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, v. 388, p. 1459–1544, 2016.

WASMUTH, J. D. *et al.* Integrated bioinformatic and targeted deletion analyses of the SRS gene superfamily identify SRS29C as a negative regulator of *Toxoplasma* virulence. **mBio**, v. 3, e00321-12, 2012.

WEVERS, B. A. *et al.* Fungal engagement of the C-type lectin Mincle suppresses dectin-1-induced antifungal immunity. **Cell Host & Microbe**, v. 15, p. 494–505, 2014.

WHITE, N. J. *et al.* Lethal malaria: Marchiafava and Bignami were right. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 208, p. 192–198, 2013.

WHITE, N. J. *et al.* Malaria. **The Lancet**, v. 383, p. 723–735, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Programmes – Malaria. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/en/>>. Acesso em: 29 ago.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Severe malaria. Tropical Medicine and Health. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/severe-malaria-tmih-2014/en/>>. Acesso em: 05 nov.

WILLMENT, J. A. *et al.* The human beta-glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells. **Europe Journal Immunology**, v. 35, p. 1539-1547, 2005.

WISPA, J. *et al.* Immunity to asexual blood stage malaria and vaccine approaches. **Immunology & Cell Biology**, v. 80, p. 401-414, 2002.

WU, J. *et al.* Strain-specific innate immune signaling pathways determine malaria parasitemia dynamics and host mortality. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 111, p. E511–E520, 2014.

WYKES, M. N. *et al.* *Plasmodium* strain determines dendritic cell function essential for survival from malaria. **PLoS Pathogens**, v. 3, e96, 2007.

WYKES, M. N.; GOOD, M. F. What really happens to dendritic cells during malaria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 864–870, 2008.

XIAO, Y. *et al.* Cross- Regulation of two type I Interferon Signaling pathways in Plasmacytoid Dendritic Cells Controls Anti-malaria Immunity and Host Mortality. **Immunity**, v. 45, p. 1093-1107, 2016.

YU, X. *et al.* Cross-Regulation of Two Type I Interferon Signaling Pathways in Plasmacytoid Dendritic Cells Controls Anti-malaria Immunity and Host Mortality. **Immunity**, v. 45, p.

1093-1107, 2016.

ZELENSKY, A. N.; GREADY, J. E. The C-type lectin-like domain superfamily. **The FEBS Journal**, v. 272, p. 6179-6217, 2005.

ZHANG, P. P. *et al.* The changes of Dectin-1 and TLR2 in human umbilical vein endothelial cells stimulated by Aspergillus fumigatus. **Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases**, v. 2, p. 91-94, 2011.

ANEXO I – Análise Final Comissão de Ética na Utilização de Animais



Universidade Federal de Uberlândia

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)

Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315

Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;

e-mail:ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 028/17 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 153/16

Projeto Pesquisa: “Busca por alvos imunes para o desenvolvimento de medidas profiláticas e terapêuticas contra malária em modelo murino”.

Pesquisador Responsável: Murilo Vieira Silva

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

Situação: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 17 de março de 2017.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUA/UFU