

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Patogenicidade das células T CD8⁺ em modelos experimentais de malária cerebral

Fernanda Garcia Guedes Baptista

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

2007

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Patogenicidade das células T CD8⁺ em modelos experimentais de malária cerebral

Fernanda Garcia Guedes Baptista

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Biologia Humana e Ambiente
submetida à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
realizada sob a orientação de:

Professora Doutora Ana Margarida Vigário

Professora Auxiliar na Universidade da Madeira
Investigadora no Instituto Gulbenkian de Ciência

Professora Doutora Deodália Dias

Professora Auxiliar na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
Investigadora na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Agradecimentos

Desde que me lembro, a descoberta e explicação dos fenómenos era algo que despertava o meu interesse. Porque nasce? Porque morre? Porque acontece? Estas e tantas outras questões assolavam-me constantemente, e foram elas que permitiram traçar o meu caminho na direcção da investigação científica. Todo este percurso só foi possível graças à colaboração de muita gente que, consciente ou inconscientemente, influenciou a minha decisão de realizar este Mestrado. Por tal, gostaria de agradecer:

Ao Instituto de Emprego e Formação Profissional pois sem o financiamento que me foi concedido, no âmbito do Programa de Estágios Profissionais, nunca teria tido a oportunidade de realizar este Mestrado.

Às Doutoradas Deodália Dias e Ana Maria Crespo pela coordenação do Mestrado.

À Doutora Ana Margarida Vigário, a minha mentora e tutora durante o Mestrado, por ter depositado em mim a confiança para este trabalho, e principalmente por estar sempre presente com o seu apoio, conhecimento e amizade, mesmo quando se encontrava longe geograficamente.

À Doutora Sylviane Pied por me ter aberto a porta para o seu grupo de trabalho.

Ao Instituto Gulbenkian de Ciência (IGC) pelas infra-estruturas e óptimo ambiente de trabalho, o qual só se consegue junto dos melhores profissionais. Por isso agradeço aqueles que de alguma forma participaram neste trabalho, em particular:

Ao Grupo da Mitose, que foi o primeiro local onde me iniciei nas artes da investigação científica, mas principalmente ao Doutor Álvaro Tavares por me ter aberto a porta para o trabalho laboratorial.

Às pessoas da Ala Gil Eanes por me terem acolhido de braços abertos e por terem paciência face todas as minhas dificuldades logísticas, durante a ausência física da minha orientadora.

Ao Rui Gardner, responsável pelo citómetro de fluxo, por estar sempre disponível para ajudar.

A todos os técnicos e tratadores responsáveis pela manutenção e gestão do biotério do IGC.

À Mónica, Sofia e Ana que sem elas a estadia e trabalho no IGC teria sido um caminho penoso. Agradeço-lhes pela sua amizade, companheirismo e o bom humor que as caracteriza, e por estarem presentes tanto nos bons como nos maus momentos.

Às "meninas do mestrado" (Patrícia, Márcia, Mara, Margarida e Inês) pelos bons momentos passados fora das horas de trabalho, mas que tantas dores de cabeças nos causaram aquando da combinação.

Aos meus amigos de longa data, entre eles Cris, Paty, Rute, Cláudia, David, Pedro, Bárbara, Mariana, Lara e Renato por terem sido tão compreensivos e persistentes, mesmo durante as minhas ausências; Ana, Fifas, Marco, Guida e Fred que apesar de estarem longe sempre os senti tão perto; Júlio, Perdocas, Fia, Filipe e David que, sempre que possível, estiveram presentes e me apoiaram.

Aos meus recentes amigos, mas já com um lugar especial no meu coração, David, Inês, Sandra, Tiago, Sandro, Sofia, João e Pedro, por terem tido uma participação tão activa nesta altura da minha vida e por terem facultado tão bons momentos de fuga e descanso; e ao Alcino por ser tão especial e me compreender tão bem, mantendo-me no caminho correcto e mostrando-me que a luz da esperança e optimismo está sempre acesa.

E claro, não podia faltar o meu eterno agradecimento à minha família, em especial à minha mãe, ao meu pai Paulo e à minha irmã Mónica, que sempre acreditaram em mim. Sem eles eu não existiria e sem o seu apoio não conseguiria ultrapassar todos os obstáculos que surgiram, surgem e surgirão durante a construção do meu ser.

Obrigada a todos!

ÍNDICE

RESUMO	IV
ABSTRACT (370)	V
ABREVIATURAS	VI
CAPÍTULO I	1
INTRODUÇÃO	1
1. Malária	2
1.1. <i>História</i>	3
1.2. <i>Em Portugal</i>	4
2. O parasita	5
2.1. <i>Ciclo de vida</i>	5
2.1.1. Fase assexuada	6
2.1.1.1. <i>Fase hepática</i>	7
2.1.1.2. <i>Fase eritrocítica</i>	8
2.1.2. Fase sexuada	9
2.2. <i>Anti-maláricos</i>	10
3. Imunologia da Malária	13
3.1. <i>Imunidade pré-eritrocítica (fase hepática)</i>	13
3.2. <i>Imunidade eritrocítica</i>	15
3.2.1. <i>Macrófagos e Células Dendríticas</i>	16
3.2.2. <i>Células B</i>	16
3.2.3. <i>Células NK</i>	16
3.2.4. <i>Células T CD4⁺</i>	17
3.2.5. <i>Células T CD8⁺</i>	17
4. Sintomatologia da malária	17
4.1. <i>Manifestações clínicas</i>	17
5. Imunopatologia da Malária	18
5.1. <i>Malária Cerebral</i>	18
5.1.1. <i>Doença nos humanos</i>	18
5.1.2. <i>Modelos animais experimentais</i>	20
5.1.2.1. <i>Patogénese da doença nos modelos experimentais</i>	20
5.1.2.2. <i>Papel das células T CD8⁺ na MC</i>	21
6. Objectivos e Relevância	22
CAPÍTULO II	23
TRABALHO PRÁTICO E RESULTADOS	23
1. Materiais e Métodos	24
<i>Animais</i>	24
<i>Parasita e Patologia</i>	24
<i>Tratamento Antimalárico</i>	24
<i>Colheita de Amostras e Purificação de Linfócitos</i>	25
<i>Cérebro</i>	25
<i>Baço</i>	25
<i>Imunomarcção e Análise de Citometria de Fluxo</i>	26
<i>Quantificação de Leucócitos Totais por Citometria de Fluxo</i>	27
<i>Quantificação, por qRT-PCR, de parasitas no cérebro de murganhos infectados</i>	28
<i>Permeabilidade da Barreira Hematoencefálica</i>	29

<i>Análise Estatística</i>	29
2. Resultados	29
2.1. Células T CD8 ⁺ activadas acumulam-se no cérebro de murganhos sem MC	29
2.2. A acumulação de células T CD8 ⁺ no cérebro não está correlacionada com a perda de integridade da BHE	33
2.3. A sequestração de GVp no cérebro não é necessária para a acumulação de células T CD8 ⁺ nos murganhos infectados com PbNK65	34
2.4. Os murganhos infectados com PbA e tratados, ao dia 5 p.i., com antimaláricos não desenvolvem MC nos dias seguintes	35
2.5. Os murganhos protegidos contra a MC após tratamento com Pirimetamina continuam a acumular células T CD8 ⁺ no cérebro	36
2.6. A sequestração de parasita no cérebro está correlacionada com o desenvolvimento de MC nos murganhos tratados com Pirimetamina	37
CAPÍTULO III	37
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	37
CAPÍTULO IV	40
PERSPECTIVAS FUTURAS	40
REFERÊNCIAS	42

Resumo

A malária cerebral (MC) é uma das patologias mais graves, originada pela infecção por *Plasmodium falciparum*. Apesar de desconhecidos os mecanismos exactos que contribuem para o desenvolvimento da neuropatologia, sabe-se que a sequestração de glóbulos vermelhos parasitados (GVp) e/ou células T CD8⁺ são dois factores implicados na patogénese da MC.

Murganhos C57Bl/6 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA), considerados o modelo murino experimental clássico de MC, partilham algumas características com a doença em humanos, e a sua utilização permite compreender melhor esta neuropatologia. Ao dia 6-7 pós infecção (p.i.) estes murganhos desenvolvem ataxia, paralisia dos membros e convulsões. Sabe-se que, neste modelo, ocorre sequestração de células T CD8⁺ no cérebro, imediatamente antes do aparecimento dos sintomas neurológicos, e que são importantes na fase final da neuropatologia. Apesar de até à data, só ter sido descrita a acumulação das células T CD8⁺ em animais infectados com *Plasmodium* que desenvolvem MC, observámos a existência destas células no cérebro de murganhos infectados por *P. berghei* NK65 (PbNK65), que não desenvolvem MC.

Neste trabalho, estas células T CD8⁺ foram caracterizadas nos dois modelos acima descritos. Observou-se que, tal como nos murganhos PbA-MC, estas células se encontram activadas no cérebro de murganhos infectados com PbNK65, apesar de não desenvolverem MC. Tal sugere que a sua presença não é suficiente para induzir a patologia.

Adicionalmente, verificámos que, ao dia 6-7 p.i., não se observou qualquer aumento na quantidade de parasita no cérebro de murganhos C57BL/6 infectados por PbA mas tratados com antimaláricos (os quais não desenvolvem a patologia ao dia 6-7 p.i. mas morrem com sintomas de MC ao dia 13-15 p.i.), mas ocorreu acumulação de células T CD8⁺.

Concluindo, estes resultados sugerem que o desenvolvimento de MC resulta da conjugação de, pelo menos, dois factores: presença no cérebro de células T CD8⁺ e de parasita.

Palavras-chave:

Malária Cerebral, Células T CD8⁺, Sequestração de GVp, *Plasmodium berghei* ANKA, *Plasmodium berghei* NK65

Abstract

Cerebral malaria (CM) is a serious complication of *Plasmodium falciparum* infection. Although the mechanism responsible for this neuropathology remains unknown, it is believed that parasitized Red Blood Cells (pRBC) and/or CD8⁺ T cells sequestration in brain are critical to the pathogenesis.

This mechanism is widely studied by infection of C57Bl/6 mouse with *P. berghei* ANKA (PbA) because it provides an experimental CM (ECM) model that shares some characteristics with the human disease. These mice die 6–12 after infection, due to the development of a complex neurological syndrome. pRBC sequestration in brain remains to be clearly shown on PbA-infected C57Bl/6 mice. Recent studies demonstrated a role of CD8⁺ T cells on the effector phase. These cells are sequestered immediately before neurological symptoms presentation and are important in the development of CM in a later stage of the infection. Furthermore, to date no quantitative analysis was conducted on the CD8⁺ T cells adhering to the brain vasculature of PbNK65-infected mice. Although infected with a PbA-related parasite strain, PbNK65-infected mice do not develop CM. Therefore, in this study we started by analysing the brain of these mice. Surprisingly, like in PbA-CM mice, the PbNK65 model also showed accumulation of activated CD8⁺ T cells in the brain. We found that PbNK65-infected mice have significantly lower parasite load in brain than CM mice. Moreover, when PbA-infected mice were treated with a pyrimetamina and chloroquine, they become protected, even when CD8⁺ T cell migrate to the brain. Our results clearly show that besides CD8⁺ T cells sequestration, pRBC-sequestration in the brain vessels is also necessary to the experimental CM (ECM) development. These results demonstrate also that the ECM model bears stronger resemblance to human CM than has been claimed.

Keywords:

Cerebral Malaria, CD8⁺ T cells, pRBC sequestration, *Plasmodium berghei* ANKA, *Plasmodium berghei* NK65

Abreviaturas

APC	Célula apresentadora de antígeno (<i>Antigen presentation cells</i>)
BE	Azul de Evans (<i>Blue Evans</i>)
BHE	Barreira hematoencefálica
ChI	Cloroquina (<i>Chloroquine</i>)
Células NK	Células <i>Natural Killer</i>
Células Th1	Células T auxiliares 1 (<i>T helper 1</i>)
Células Th2	Células T auxiliares 2 (<i>T helper 2</i>)
CSP	Proteína circunsporozoíto (<i>Circumsporozoit protein</i>)
GV	Glóbulos vermelhos
GVp	Glóbulos vermelhos parasitados
FACS	<i>Fluorescent-activated cell sorting</i>
FCS	Soro fetal de bovino (<i>Fetal calf serum</i>)
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
mAc	Anticorpo monoclonal
MC	Malária Cerebral
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MIF	Mediana da intensidade de fluorescência (<i>Mean Intensity Fluorescence</i>)
MSP	Proteína de Superfície do Merozoíto (<i>Merozoite Surface Protein</i>)
PbA	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA
PBMC	Células mononucleadas do sangue periférico (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)
PbNK65	<i>Plasmodium berghei</i> NK65
PFA	Paraformaldeído
PfEMP1	Proteína de Membrana do Eritrócito 1 (<i>Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1</i>)
p.i.	Pós infecção
PS	Fosfatilserina (<i>Phosphatidylserine</i>)
PV	Vacúolo Parasitóforo (<i>Parasitophorous Vacuole</i>)
Pyr	Pirimetamina (<i>Pyrimethamine</i>)
qRT-PCR	Reacção em cadeia da polimerase em tempo real
TNF	Factor de Necrose Tumoral (<i>Tumor necrosis factor</i>)

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1. Malária

A Malária (ou Paludismo) é uma infecção aguda e/ou crónica causada por protozoários do género *Plasmodium* que passa de indivíduo para indivíduo através da picada de um mosquito fêmea do género *Anopheles*. Apenas os mosquitos fêmea servem de vector directo para a transmissão, uma vez que só estes se alimentam de sangue (os machos vivem da seiva de plantas).

Embora seja uma doença prevenível e tratável, a malária é um dos maiores problemas de saúde, sendo a doença parasitária que mais afecta a população mundial, principalmente na África Sub-Saariana e em alguns locais da Ásia e América do Sul. Segundo dados recolhidos e publicados pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005), aproximadamente 40% da população mundial habita em zonas de risco. Por ano, 350-500 milhões de pessoas são infectadas, uma taxa só comparável à da SIDA/AIDS. Dentro deste grupo, mais de um milhão morre com a patologia, sendo as crianças, jovens e mulheres grávidas, na sua maioria africanos, aqueles que mais padecem desta doença. A morte é, geralmente, uma consequência de duas manifestações extremas: anemia severa e malária cerebral (MC). Muitas crianças que sobrevivem a casos severos sofrem danos cerebrais mais ou menos graves e têm dificuldades de aprendizagem.

O mosquito da Malária só sobrevive em áreas que apresentem temperaturas mínimas superiores a 15°C, e só atinge um número suficiente de indivíduos para a transmissão da doença em regiões onde as temperaturas médias sejam cerca de 20-30°C com humidade elevada, o que inclui todas as regiões tropicais de todos os continentes e muitas regiões subtropicais (fig.1). Hoje em dia, o continente africano é particularmente atingido, estando poupadas apenas o Norte e a África do Sul. No continente americano existe em toda a região central e norte da América do Sul, incluindo mais de metade do território do Brasil e ainda nas Caraíbas. Na Ásia está presente em todo o sub-continentes indiano, Médio Oriente, Irão, Ásia Central, Sudeste asiático, Indonésia, Filipinas e Sul da China (Figura1) (WHO, 2005).

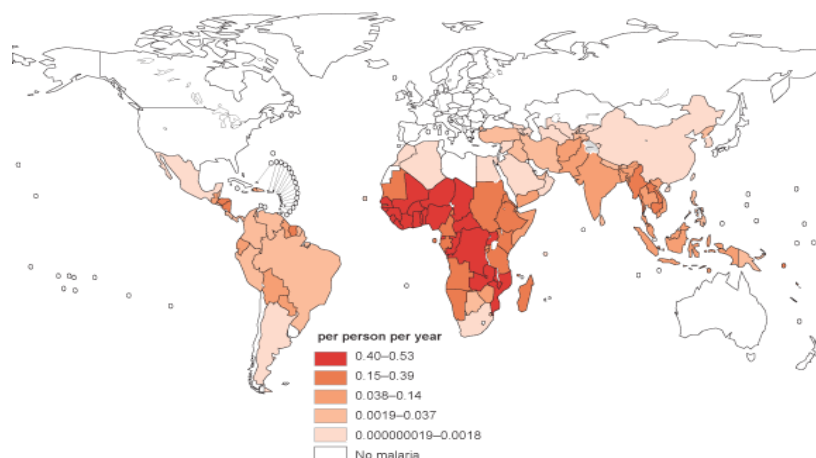


Figura 1. Distribuição mundial da Malária. Estimativa da incidência de episódios clínicos de malária (*World Malaria Report 2005*).

1.1. História

A malária é uma doença que ataca o homem desde a pré-história. Originada provavelmente no Continente Africano, que é conhecido como o "Berço da Humanidade", acompanhou a saga migratória do ser humano pelas regiões do Mediterrâneo, Mesopotâmia, Índia, e Sudeste Asiático. A chegada da doença ao Novo Mundo ainda hoje é motivo de especulações, já que não se dispõe de informações fiáveis.

Apesar da associação com a malária ser incerta, existem referências a febres sazonais e intermitentes em textos religiosos e médicos bastante antigos, entre os assírios, chineses e indianos, que relacionavam a doença à punição de deuses e presença de maus espíritos.

Só com o início da agricultura, há 10 000 anos, e com o crescimento populacional e destruição dos ambientes naturais, é que as populações de *Anopheles* aumentaram exponencialmente, iniciando-se a verdadeira epidemia de Malária que existe hoje.

No século V a.C., na Grécia, Hipócrates (460 a.C. – 370 a.C.), conhecido como "o pai da medicina", foi o primeiro a descrever detalhadamente o quadro clínico da malária e algumas das suas complicações, descartando a superstição. Este médico grego observou que algumas pessoas tinham picos de febre em cada três dias (febres terciárias), as quais eram distintas e mais severas do que aquelas que surgiam em cada quatro dias (febres quaternárias). Mais tarde, veio a saber-se que este facto se deve a infecções com diferentes espécies de *Plasmodium*. Hipócrates estabeleceu ainda uma relação entre a doença e as estações do ano ou os locais frequentados pelos doentes. No século II d.C., diversos médicos gregos e romanos deixaram várias referências sobre a doença, que ocorria em epidemias cíclicas na Grécia, Itália e diversas partes da Europa, onde era conhecida como "Febre Romana".

Durante quase 1500 anos pouco foi acrescentado ao conhecimento sobre a doença e o seu tratamento. Somente no século XVII, os missionários Jesuítas observaram, junto de populações indígenas da América do Sul, que a casca de uma árvore nativa designada Cinchona, que contém quinino e cujo nome só foi atribuído em 1735, podia ser utilizada para tratar as febres cíclicas (Haldar *et al.*, 2007). Os Chineses também usavam uma planta, a Artemísia, para o mesmo fim, a qual recentemente foi considerada uma "nova" droga antimalária revolucionária.

No século XVIII, a doença recebeu o nome italiano de "*mal aire*" (em Latim *malus aria*), que significa mau ar, supondo-se que eram os vapores emanados pelas águas estagnadas que provocavam a patologia.

Embora a Chinchona já fosse há muito usada no tratamento da malária, apenas em 1820 os franceses Pierre Pelletier e Joseph Caventou extraíram com sucesso o quinino, o princípio activo antimalárico (Schlitzer *et al.*, 2007). Só com a utilização do quinino, o primeiro fármaco antimalárico é que os europeus puderam sobreviver em grande número no interior africano (Schlitzer *et al.*, 2007).

Apenas no final do século XIX, quando bacteriologistas e patologistas desvendavam as causas de diversas doenças infecciosas, bem como o papel dos insectos na transmissão de algumas doenças, é que o conhecimento sobre as “febres da água negra” passou por um período de importantes descobertas. Em 1880, Charles L. A. Laveran (Prémio Nobel da Fisiologia ou Medicina de 1907), médico do exército francês, foi o primeiro a observar e descrever o agente causador de malária como sendo um protozoário do género *Plasmodium* que se encontrava no interior dos glóbulos vermelhos humanos. O modo de transmissão da doença foi sugerido por Sir Patrick Manson, físico inglês, que propôs que a propagação do parasita da malária era feita pelo mosquito *Anopheles*, o que veio a ser provado em 1898 por Sir Ronald Ross (Prémio Nobel da Fisiologia ou Medicina 1902), físico indiano de origem escocesa, que encontrou formas do parasita no interior de um mosquito que se tinha alimentado de um portador da doença. O quadro completo do ciclo de desenvolvimento sexuado do parasita da malária na fêmea do mosquito *Anopheles* foi obtido posteriormente graças aos investigadores italianos Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli e Batista Grassi, em estudos realizados entre 1898 e 1899 que demonstraram que o agente responsável pela malária se encontrava no aparelho digestivo dos mosquitos que o transmitiam.

Durante a primeira metade do século XX foram muitos os estudos que se dedicaram ao controlo da Malária, especialmente no sentido de reduzir ou eliminar a presença de locais de criação do insecto transmissor, o que se mostrou bastante eficiente em algumas situações. Foram desenvolvidos estudos para a síntese de substâncias com acção insecticida, que apresentaram o seu auge em 1942, com a obtenção por Paul Muller do composto dicloro-difenil-tricloroetano (D.D.T.). Após uma grande campanha para tentar erradicar a doença, por volta de 1970, os programas de erradicação diminuíram o risco da doença em cerca de 53% da população residente em áreas endémicas de malária, evitando milhões de mortes e contribuindo para o desenvolvimento sócio-económico de grandes áreas, especialmente na Ásia, Sul e Sudeste da Europa e no continente Americano. Entretanto, devido à redução das actividades de controlo, crises económicas, aumento dos custos dos insecticidas, aparecimento de resistência dos mosquitos aos insecticidas e dos parasitas aos antimaláricos a situação piorou na década de 1980, observando-se um aumento progressivo no número de casos na maioria dos países, com excepção da Europa e América do Norte. Este facto levou à revisão da estratégia global de erradicação, visando reduzir os níveis de transmissão. Apesar de tudo, ainda hoje a doença se faz sentir em cerca de 100 países, especialmente na África, Ásia e Américas Central e do Sul.

1.2. Em Portugal

Em Portugal até meados do século XX houve alguns casos de malária transmitida por *Anopheles*, os quais se multiplicavam em pântanos e campos de cultivo de arroz. No entanto, nunca houve uma situação catastrófica como a actual em África, porque o clima frio nunca permitiu a multiplicação de número suficiente de mosquitos. O último caso

autóctone foi em 1962, tendo no fim do século XIX afectado principalmente o Ribatejo, Alentejo e Trás-os-Montes, com algumas dezenas de casos anuais causados por *P. falciparum* ou *P. vivax*, transmitidos pelo *Anopheles maculipennis*, que prefere o gado ao homem. Apenas no final do século XX a Malária foi erradicada da região mediterrânea, incluindo Sul da Europa (nomeadamente Portugal) e no Sul e Oeste dos EUA. Hoje em dia não há casos de malária transmitida em Portugal.

2. O parasita

O agente patogénico da malária é um protozoário do género *Plasmodium*, pertencente ao filo *Apicomplexa*. O filo caracteriza-se pela presença de uma estrutura que reúne três organelos (anel polar, roptrias e *micronemes*) na extremidade apical, designado por complexo apical (Figura 2). É aqui que se encontra toda a maquinaria necessária à entrada dos esporozoítos nos hepatócitos e dos merozoítos nos glóbulos vermelhos (GV).

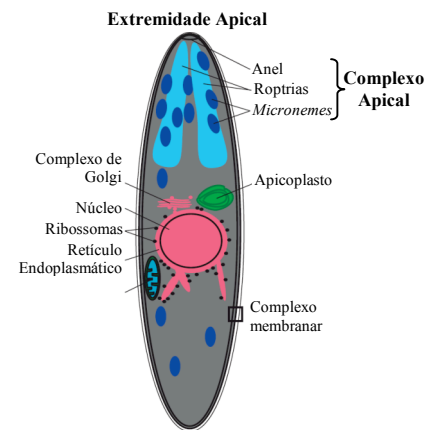


Figura 2: Esquema de um esporozoítio de *Plasmodium* (imagem adaptada de Kappe *et al.*, 2004)

Este parasita pode ser transmitido através da picada do mosquito *Anopheles*, por via sanguínea (transfusões sanguíneas, toxicodependentes) ou por via vertical (malária congénita).

Embora existam mais de 100 espécies diferentes de *Plasmodium*, são conhecidas apenas quatro que infectam os seres humanos (Clark *et al.*, 2006): *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*. Aquele que provoca a infecção mais severa e mortal é o *P. falciparum*.

A espécie de parasita predominante em toda a África tropical, Ásia e América Latina é o *P. falciparum*, enquanto que o *P. vivax* é mais comum em regiões como a Índia e a América Latina (Figura 3). As infecções por *P. ovale* são mais restritas às regiões tropicais do Oeste de África, enquanto que o *P. malariae* ocorre um pouco por todo o mundo, mas com baixa taxa de incidência.

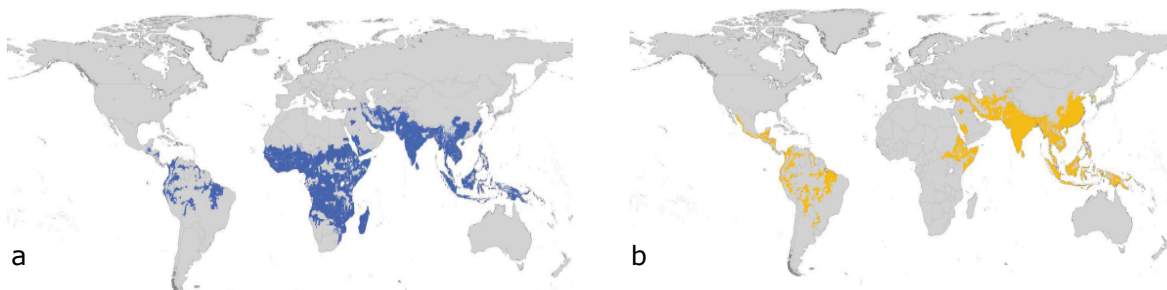


Figura 3: Distribuição global do (a) *P. falciparum* e (b) *P. vivax* em 2005 (Guerra *et al.*, 2006).

2.1. Ciclo de vida

O ciclo de vida do *Plasmodium* divide-se em duas fases: uma assexuada e outra sexuada. A fase assexuada tem lugar no hospedeiro vertebrado ou intermediário, e divide-

se em duas etapas, a hepática e a eritrocítica. A fase sexuada ocorre no intestino delgado do vector, ou hospedeiro definitivo (Figura 4).

Dependendo da espécie de parasita e hospedeiro, os ciclos pré-eritrocítico (ou hepático) e eritrocítico e as formas de GV infectadas variam. No caso dos parasitas que infectam os humanos, o ciclo pré-eritrocítico ocorre num período de 7 a 12 dias, e o ciclo eritrocítico varia conforme a espécie de parasita invasor. O *P. falciparum* tem um ciclo eritrocítico de 36 a 48 horas, causando a “febre terçã maligna”, isto é, com acessos de febre a cada 3 dias, e infecta quer GV maduros como reticulócitos. Por outro lado, o ciclo eritrocítico do *P. malariae* tem a duração de 72 horas, causando “febres quartãs”, ou seja, acessos de febre a cada 4 dias, e infecta apenas os GV maduros. Ambos os parasitas das espécies *P. vivax* e o *P. ovale* têm um ciclo de vida de 48 horas, e infectam exclusivamente os reticulócitos, causando a chamada “febre terçã benigna”.

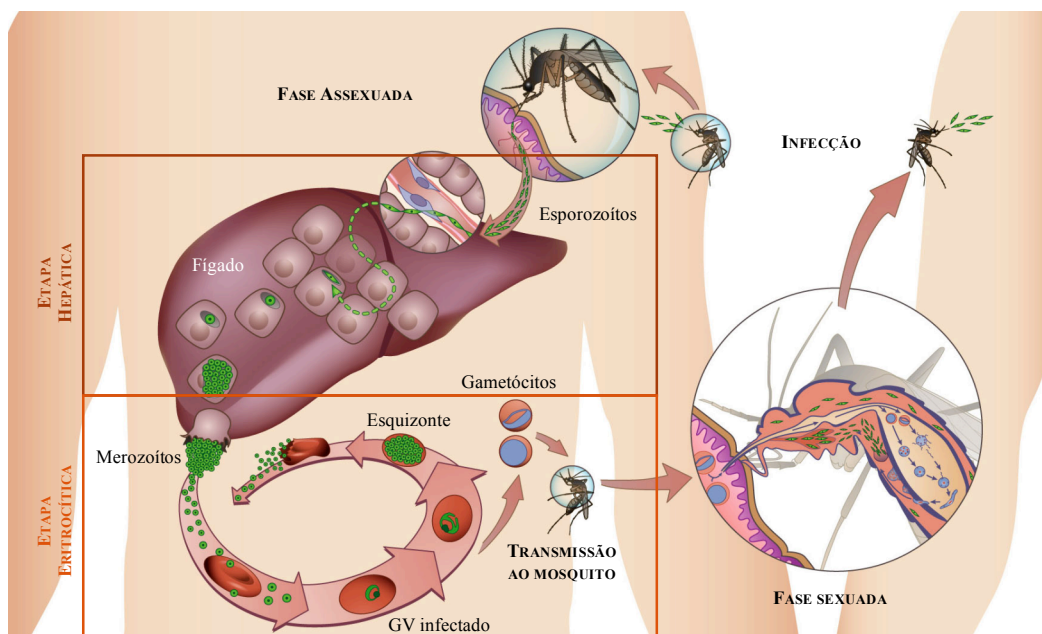


Figura 4: Ciclo de vida do *Plasmodium*. (Imagem adaptada da editada pela Unidade de Malária do Instituto de Medicina Molecular, 2006)

2.1.1. Fase assexuada

A fase assexuada do ciclo de vida do parasita da malária, que ocorre dentro do hospedeiro vertebrado, é constituída por duas etapas ou fases: a hepática e a sanguínea ou eritrocítica.

A infecção por malária inicia-se quando os esporozoítos de *Plasmodium* entram no hospedeiro vertebrado através da picada de um mosquito *Anopheles* fêmea infectado (Figura 4). Os mosquitos transmitem, normalmente, menos de 100 esporozoítos por picada (Vanderberg, 1977; Frevert *et al.*, 2005), que são depositados no tecido subcutâneo do hospedeiro, ou, com menor frequência, directamente na rede sanguínea (Amino *et al.*, 2006). Em minutos, estes esporozoítos migram até ao fígado,

onde irão infectar os hepatócitos, dentro dos quais se desenvolvem. (Sidjanski e Vanderberg, 1997; Vanderberg e Frevert, 2004). Dá-se assim início à etapa hepática da fase assexuada do ciclo de vida do parasita que é totalmente assintomática.

2.1.1.1. Fase hepática

Para terem acesso aos hepatócitos onde replicam, os esporozoítos necessitam de ficar sequestrados no fígado, para depois atravessarem o epitélio sinusoidal, o qual é composto por endotélio especializado, altamente fenestrado, e células de Kupffer (macrófagos residentes do fígado).

A sequestração dos esporozoítos dá-se através da ligação à camada celular sinusoidal. Inicialmente pensava-se que este sequestro era mediado pela ligação dos esporozoítos via proteína circunsporozoíto (CSP) e proteína de adesão relacionada com a trombosporina (TRAP), as quais ligar-se-iam aos proteoglicanos de sulfato de heparano hepáticos (Frevert *et al.*, 1993; Ying *et al.*, 1997). Trabalhos recentes sugerem que o sequestro inicial dos esporozoítos da malária, no fígado, é mediado pela interacção da CSP com: 1) proteoglicanos de matriz extracelular secretados pelas células de Ito (células armazenadoras de lipídios que se encontram localizadas no espaço de Disse em contacto directo com os hepatócitos e com o epitélio sinusoidal); 2) condroitina; e 3) proteoglicanos de sulfato de heparano expressos na superfície dos hepatócitos (Pradel *et al.*, 2002; Pradel e Frevert, 2001).

Após a sequestração, os esporozoítos deslizam então ao longo da camada de células endoteliais do sinusoide até encontrarem as células de Kupffer, que expressam proteoglicanos à superfície que serão reconhecidos pelo parasita (Pradel *et al.*, 2002; Pradel e Frevert, 2001; Pradel *et al.*, 2004; Meis *et al.*, 1985; Sinden e Smith, 1982), para depois este as atravessar (Frevert *et al.*, 2005).

Uma vez dentro do parenquima hepático, os esporozoítos atravessam vários hepatócitos, perfurando a membrana celular, não infectando logo o primeiro que encontram (Mota *et al.*, 2001). Ao passar pelos hepatócitos, os esporozoítos deixam um rasto de CSP nas células que atravessaram. A membrana de algumas destas células volta a fechar, permitindo a sua sobrevivência e tornando-as possivelmente capazes de apresentar o antigénio (Ag) do esporozoíto. Tal sugere que os Ag dos esporozoítos poderão ser apresentados não só pelas células infectadas, mas também pelas células atravessadas. Tem sido demonstrado que esta migração do esporozoíto através das células hospedeiras é um passo essencial para a infecção final (Mota *et al.*, 2001; Mota *et al.*, 2002; Mota *et al.*, 2003).

Dentro dos hepatócitos, cada esporozoíto desenvolve-se em centenas de merozoítos, sendo que cada um pode invadir um glóbulo vermelho. Contudo se fossem libertados directamente para rede sanguínea, poderiam ser reconhecidos pelas células de Kupffer e outras células fagocitárias existentes nos sinusóides do fígado (Terzakis *et al.*, 1979). No entanto, o parasita desenvolveu uma estratégia

para aumentar a sua sobrevivência, manipulando as células hospedeiras e garantindo desta forma a libertação dos merozoítos na rede sanguínea. No final da maturação formam-se merossomas, vesículas de merozoítos cuja membrana tem origem na membrana plasmática dos hepatócitos infectados. Esses merossomas, que são libertados para os sinusóides do fígado, asseguram a libertação de merozoítos vivos directamente na circulação e protegem-nos da fagocitose (Angelika *et al.*, 2006) (figura 5).

No caso da infecção por *P.ovale* ou *P.vivax*, alguns dos esporozoítos alojados no fígado transformam-se numa forma dormente, os hipnozoítos, que meses ou anos mais tarde podem causar re-incidências da doença.

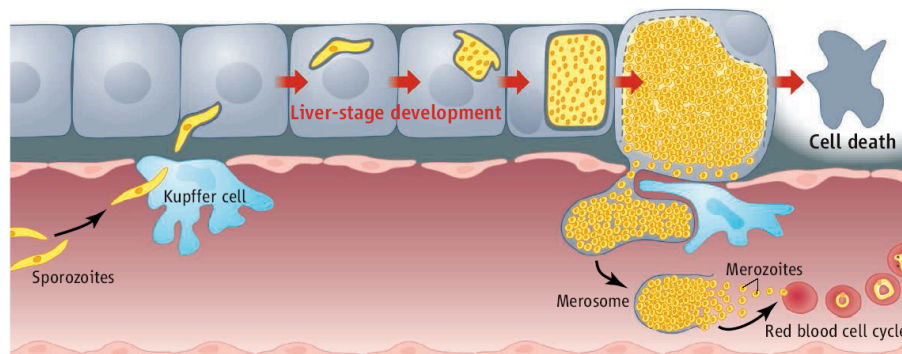


Figura 5: Modelo de infecção do fígado por esporozoítos de *Plasmodium* e passagem dos merozoítos para a rede sanguínea (Cowman e Kappe, 2006).

2.1.1.2. Fase eritrocítica

Após a fase hepática, os merozoítos libertados para a rede sanguínea infectam os glóbulos vermelhos do hospedeiro. O processo de invasão destas células progride de forma exponencial, alternando ciclos de proliferação e libertação, e é semelhante para todas as espécies de *Plasmodium*. A duração do ciclo de replicação assexuado dentro dos glóbulos vermelhos (GV) depende da espécie do parasita, durando cerca de 48 ou 72 horas, tal como foi referido anteriormente (Haldar *et al.*, 2007).

Quando no interior dos GV, o parasita consome grandes quantidades de hemoglobina, que se pensa utilizar como fonte de aminoácidos. Esta é transportada pelo citoplasma do parasita até ao vacúolo digestivo, onde sofre uma série de proteólises, decompondo-se em pequenos péptidos que são exportados novamente para o citoplasma. No entanto, o parasita não consegue exportar o grupo heme da hemoglobina, e este sofre uma oxidação, originando a ferroprotoporfirina IX que, quando em elevadas concentrações, é tóxica para o parasita. O parasita contorna este problema formando um polímero insolúvel de ferroprotoporfirina IX, denominado hemozoína.

Esta fase culmina com a eclosão de um esquizonte maduro e a libertação de novos merozoítos, que irão infectar novos GV, sendo a libertação o processo que contribui para a natureza periódica das febres da malária.

Estudos demonstraram que os componentes tanto do parasita como dos GV regulam a entrada e o desenvolvimento intracelular do parasita através da remodelação das membranas do hospedeiro. Estes eventos incluem: a) a invaginação da membrana celular do hospedeiro durante a entrada do parasita resultando na criação da membrana do vacúolo parasitóforo (*parasitophorous vacuole* - PV) que envolve o organismo intracelular e b) o desenvolvimento de alterações antigénicas, estruturais e de transporte durante o desenvolvimento do parasita (Haldar *et al.*, 2007).

A entrada do parasita nos GV é um processo complexo e dinâmico (Dvorak *et al.*, 1975). Numa fase inicial desta etapa são necessárias umas proteínas de interacção que se encontram na superfície do merozoíto designadas por proteínas de superfície do merozoíto (*merozoite surface proteins* - MSPs). Após o primeiro contacto e reconhecimento, o merozoíto reorganiza a sua extremidade apical, onde se localizam os organelos secretores especializados, promovendo a sua junção para a invasão. As proteínas do *micronemes* estabelecem a junção enquanto que as próprias promovem a formação do PV. A interacção inicial parece estimular uma rápida onda de deformação através da membrana do GV, seguida da formação de uma junção estável parasita-célula hospedeira (Bannister *et al.*, 2000).

Apesar de se saber que a bicamada dos GV envolve o parasita num vacúolo não foram detectadas nessa estrutura as principais proteínas dos GV. No entanto existem estudos recentes que mostraram que proteínas dos GV são recrutadas para o PV (Lauer *et al.*, 2000; Samuel *et al.*, 2001; Harrison *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2004; Nagao *et al.*, 2002), mas estas só representam uma pequena percentagem do total das proteínas da membrana dos GV e por isso estudos anteriores falharam na detecção de proteínas da célula hospedeira na membrana do PV (Haldar *et al.*, 2007).

2.1.2. Fase sexuada

Durante a fase eritrocítica, alguns parasitas diferenciam-se em agametócitos macho (microgametócitos) e fêmea (macrogametócitos). Para completar o ciclo de vida, estas formas parasitárias necessitam de serem ingeridas pelo mosquito fêmea, durante a picada de um mamífero infectado, de forma a ocorrer o desenvolvimento sexual, antes de haver infecção de um novo hospedeiro vertebrado. Neste ponto a estratégia do *P. vivax* difere da do *P. falciparum*. O *P. vivax* desenvolve gametócitos logo após a libertação de merozoítos pelo fígado; os gametócitos do *P. falciparum* desenvolvem-se muito mais tarde. O tratamento precoce dos ataques clínicos de malária com antimaláricos contra a fase sanguínea de *P. falciparum* também pode

matar os gametócitos em desenvolvimento; o *P. vivax* transmite-se antes da fase sintomática da doença.

No lúmen do intestino do mosquito, os gametócitos desenvolvem-se em gâmetas, sendo os masculinos exoflagelados e móveis (Billker *et al.*, 2004). Após a sua fusão com os gâmetas femininos, origina-se o zigoto, que se desenvolve num oocineto, uma forma móvel que atravessa o epitélio do intestino e se aloja, um dia depois da picada, na membrana basal (Vlachou *et al.*, 2004). Aí se desenvolve um oocisto. Quando completamente desenvolvidos, os oocistos eclodem e libertam esporozoítos infecciosos, que migram até às glândulas salivares dos mosquitos, prontos para a próxima fase de transmissão (Vlachou *et al.*, 2006).

2.2. Anti-maláricos

Depois da II Guerra Mundial, os especialistas de saúde pública tinham um plano ambicioso de erradicação da malária através de várias vias, incluindo o D.D.T. (dicloro-difenil-tricloroetano) contra os mosquitos e uma campanha global de luta contra os parasitas. Estes esforços fracassaram, maioritariamente devido ao desenvolvimento de resistência por parte do parasita à cloroquina (Chl), o principal antimalárico usado na altura (Arav-Boger e Shapiro, 2005).

Embora muito trabalho esteja a ser feito com o objectivo de criar uma vacina contra a malária, estima-se que ainda vá demorar muitos anos até que se possa utilizar em humanos. Desta forma, as drogas antimaláricas são necessárias não só para o tratamento de estabilização da infecção mas também de prevenção da malária em viajantes saudáveis, que vão para países endémicos de malária (Wellems e Miller, 2003). Juntamente com antipiréticos, os antimaláricos são a medicação que normalmente mais se utiliza nas áreas tropicais do mundo. No entanto, pelo facto de terem surgido variantes de *P. falciparum* e *P. vivax* que são resistentes aos antimaláricos mais baratos, o desenvolvimento de novos antimaláricos tornou-se uma prioridade. Estes podem ser variantes de drogas já existentes ou novos compostos que são direccionados contra novos alvos.

Tradicionalmente, os agentes antimaláricos podem ser classificados tendo em conta os estadios do ciclo de vida do parasita sobre os quais actuam (Schlitzer *et al.*, 2007). Desta forma, existem 1) os esquizonticidas sanguíneos, que actuam sobre os estádios intraeritrocíticos assexuados do parasita; 2) as drogas esquizonticidas tecidulares que matam os esquizontes hepáticos, prevenindo o aparecimento das formas sanguíneas, tendo portanto acção profiláctica; 3) os hipnozoiticidas, que actuam sobre os estadios intra-hepáticos persistentes de *P. vivax* e *P. ovale*, prevenindo deste modo as reincidências que são originadas por estes estadios dormentes; 4) e finalmente os gametócitocidas, que destroem as formas sexuadas intra-eritrocíticas do parasita e previnem a transmissão do humano para o mosquito (Schlitzer *et al.*, 2007). A necessidade urgente de combater o alastramento de parasitas resistentes tem favorecido a procura por agentes esquizonticidas sanguíneos, em detrimento de agentes com acção profiláctica (Carraz *et al.*, 2006). Desta forma, existe um número limitado de drogas que são realmente efectivas contra os

estádios de infecção do parasita no fígado, e pouca investigação tem sido dirigida neste sentido. Outros compostos, como antibióticos, antihistamínicos ou drogas anticancerígenas têm também sido reportados pela sua actividade contra os estádios pré-eritrocíticos do parasita, mas esta actividade não é exclusiva para esta fase (Schlitzer *et al.*, 2007; Vangapandu *et al.*, 2007; Carraz *et al.*, 2006).

Tendo em atenção as características químicas dos antimaláricos existem 4 grandes grupos que distinguem estes agentes: quinolinas, antifolatos, atovaconas e artemisininas.

Ao longo da história, os antimaláricos que se têm mostrado mais importantes e utilizados são as quinolinas. Normalmente, os antimaláricos deste grupo actuam durante a fase sanguínea do ciclo de vida do *Plasmodium* (Foley e Tilley, 1998), inibindo a dimerização da molécula heme e/ou prevenindo a eliminação dos dímeros do vacúolo digestivo para o citoplasma, onde a hemozoina é formada (Fitch, 2004; Hoppe *et al.*, 2004). Isto leva à acumulação de heme livre dentro do *Plasmodium*, o qual se torna altamente tóxico para o parasita. Porém, pensa-se que algumas quinolinas, como a primaquina, tenham como alvo a fase hepática (Baird e Rieckmann, 2003; Baird *et al.*, 2003). Os antimaláricos mais conhecidos, pertencentes a este grupo, são a cloroquina, primaquina, quinino e mefloquina.

O quinino, extraído da Chinchona, foi um dos primeiros agentes antimaláricos a ser usado. Contudo, hoje em dia a resistência do parasita a este composto é quase universal devido ao mau uso. O mesmo aconteceu com a cloroquina que, apesar de ter sido até hoje a melhor droga de uso isolado no controlo da Malária (Schlitzer *et al.*, 2007), durante os anos 80 do século XX, o imenso sucesso desta droga, aliada à esperança da erradicação da Malária, levou a um uso massivo e descontrolado da cloroquina em algumas regiões do globo, sendo que várias estirpes de *Plasmodium* desenvolveram resistência a esta droga. (Cunha-Rodrigues *et al.*, 2006). De momento 80% das estirpes de *P.falciparum* isoladas são resistentes à cloroquina (Hoppe *et al.*, 2004; Fitch, 2004.).

A mefloquina tem também sido usada no combate à malária, mas a sua eficiência no Sudeste Asiático tem vindo a baixar, para além dos problemas que tem apresentado em termos de tolerância quando usado profilacticamente.

O azul de metileno, corante particularmente bom a marcar o parasita e selectivamente tóxico contra o mesmo, é o composto que constituiu a base para o início do desenvolvimento de compostos antimaláricos sintéticos. A primaquina é um exemplo de uma droga sintética originada através da modificação química deste composto, sendo uma das únicas drogas anti-reincidência contra os estádios dormentes de *P.vivax* e *P.ovale*. Tem verdadeira acção profiláctica, mas existe o risco de hemólise quando administrada a pacientes com deficiência no enzima glucose 6-fosfato desidrogenase (que, refira-se, representam uma percentagem importante da população Africana), pelo que tem sido destituída (Schlitzer *et al.*, 2007). Também a mepacrina pode ser obtida por uma substituição da cadeia lateral do azul de metileno. Este composto foi introduzido em 1932, e apesar dos efeitos colaterais da sua aplicação, serviu para o controlo da malária entre as

tropas Americanas durante a guerra do pacífico, quando o Japão cortou o fornecimento de quinino.

Dois compostos activos contra o estágio hepático da doença, mas principalmente contra os estádios sanguíneos, são os antifolatos e a atovacona. A administração destes compostos tem, no entanto, sido acompanhada de episódios de resistência, limitando a actividade profiláctica destas drogas.

Os antifolatos são compostos criados para inibir a síntese dos co-factores do folato que são necessários para a síntese nucleotídica e para o metabolismo dos aminoácidos. Previnem a divisão nuclear do *Plasmodium* na fase esquizonte intra-eritrocítica e hepática. Consequentemente estas drogas actuam mais lentamente contra o *Plasmodium* do que as quinolinas. Os antifolatos são eliminados lentamente, um facto que facilita o desenvolvimento de resistência. Quando os antifolatos são utilizados sozinhos, a resistência desenvolve-se rapidamente como resultado da mutação das enzimas alvo (Dieckmann e Jung, 1986). Este facto tem acelerado a descoberta de novas drogas antifolato e novas combinações de drogas (Wongsrichanalai *et al.*, 2002). Contudo, o parasita já desenvolveu resistência a algumas combinações. Os antifolatos mais utilizados são a pirimetamina (Pyr) e cloroguanina (Cunha-Rodrigues *et al.*, 2006).

As atovaconas são inibidores da cadeia respiratória (Fry e Beesley, 1991; Srivastava *et al.*, 1997), que têm sido também aplicados na luta contra a malária, mais especificamente em conjunto com o proguanil, que é um remédio recente com alta eficácia e profilaxia, mas muito dispendioso (Schlitzer *et al.*, 2007; Vangapandu *et al.*, 2007). Em ensaios clínicos, as atovaconas são bem toleradas e eficazes, mas as taxas de recrudescência são altas devido ao rápido desenvolvimento de resistência do *Plasmodium* à droga.

As artemisininas, isoladas em 1971 (Schlitzer *et al.*, 2007; Vangapandu *et al.*, 2007), têm um largo espectro de acção com todas as fases do parasita dentro dos GV, particularmente nas formas anelares jovens (Skinner *et al.*, 1996), e suprimem a transmissão dos gametócitos (Chen *et al.*, 1994). As artemisininas acumulam-se selectivamente nos GV infectados por *P.falciparum* (Gu *et al.*, 1984) e, embora o seu modo de acção ainda seja controverso, pensa-se que elas possam matar os parasitas via radicais livres originados pela activação das artemisininas pelo heme ferroso e ferro livre exógeno (Meshnick, 2002). Contudo, a hipótese da activação dependente do heme não é consistente com a descoberta de que estas drogas não se acumulam no vacúolo digestivo, onde o heme é abundante, mas sim nas membranas do parasita (Ellis *et al.*, 1985), nem com a observação que elas afectam as fases do parasita que não contém hemozoina, como as formas anelares jovens (Skinner *et al.*, 1996) e os gametócitos (Chen *et al.*, 1994). As artemisininas actuam mais rapidamente que qualquer outra droga antimalárica que se conhece (White, 1994; White e Olliaro, 1998) e a resistência de *P. falciparum* a artemisininas ainda não emergiu (Brockman *et al.*, 2000; Price e Nosten, 2001), mesmo na China onde os extratos de planta contendo artemisina foram usados durante 2000 anos. Tal facto se

deve à eficácia da droga e ao seu curto tempo de vida (White, 1997). Um dos maiores problemas das artemisininas é o alto custo de seu isolamento e a sua pobre solubilidade (Barradell e Fitton, 1995).

Devido à escassez da planta de onde é extraída e à baixa solubilidade em água ou óleo da artemisinina recentemente têm-se sintetizado vários compostos análogos. Um destes compostos semi-sintéticos é o artemeter.

Outro dos compostos obtidos a partir da artemisina é o artenusato. Uma particularidade deste composto advém do facto de ser altamente solúvel, e consequentemente administrado por via intravenosa, o que adquire particular importância no caso do tratamento da Malária severa (Schlitzer *et al.*, 2007; Vangapandu *et al.*, 2007).

O sucesso de algumas drogas antimaláricas baseadas em produtos naturais, como o quinino ou a artemisinina, tem conduzido a um crescente interesse por plantas reportadas como tendo actividade preventiva ou antimalária, como uma potencial fonte de agentes antimalária. Da síntese de compostos análogos a estes agentes naturais é possível obter vários compostos com 39 a 67 vezes mais actividade e 2 a 3 vezes menos citotóxicos (Vangapandu *et al.*, 2007).

3. Imunologia da Malária

As pessoas residentes nas áreas endémicas de malária, como consequência da exposição repetida ao *Plasmodium*, podem desenvolver dois tipos de imunidade: a clínica, que limita a resposta inflamatória do hospedeiro ao parasita, e consequentemente os sintomas graves; e a anti-parasita que consiste em mecanismos que inibem ou limitam a replicação do parasita. As crianças que vivem nessas áreas de transmissão da malária são infectadas muito precocemente, desenvolvendo os sintomas de doença severa durante os primeiros cinco anos de vida. Mas, como a imunidade se desenvolve com o número crescente de infecções, a doença torna-se menos severa e o número de parasitas circulantes no sangue diminui. A resposta imune adquirida é específica da espécie e perde-se se a pessoa sair da área endémica à malária. Pensa-se que este desenvolvimento lento da imunidade protectora nas áreas endémicas da malária reflecte a aquisição de imunidade específica para muitos antígenos variantes naturais do parasita (Newbold *et al.*, 1997; Saul, 1999). Uma explicação alternativa ou adicional consiste na modulação activa do sistema imunitário do hospedeiro pelo parasita, inibindo o desenvolvimento de respostas imunes específicas (Plebanski *et al.*, 1997; Gilbert *et al.*, 1998; Plebanski *et al.*, 1999).

3.1. Imunidade pré-eritrocítica (fase hepática)

A imunidade pré-eritrocítica pode ser dirigida contra os esporozoítos livres desde a sua injeção no hospedeiro, através da picada do mosquito, até à fase intra-hepática. Pensa-se, no entanto, que o desenvolvimento do parasita *Plasmodium spp* dentro dos hepatócitos do hospedeiro seja o maior alvo para a imunidade protectora contra a fase pré-eritrocítica (Hoffman *et al.*, 1996).

Os anticorpos contra os esporozoítos podem proteger através da opsonização,

levando à eliminação dos esporozoítos antes que estes alcancem o hepatócito, ou interferindo com o processo de invasão dos hepatócitos (Esposito *et al.*, 1988; Pasquetto *et al.*, 1988; Silvie *et al.*, 2004). Até à data não é claro se a presença ou o nível de anticorpos que reconhecem os esporozoítos estejam relacionados com a protecção contra a infecção ou a doença.

Mais recentemente, o estudo da imunidade pré-eritrocítica centrou-se nos mecanismos mediados por células (Tsuji e Zavala, 2003). Nesta área, a disponibilidade de modelos murinos permitiu a dissecação de mecanismos efectores, revelando considerável complexidade.

Quando os esporozoítos são atenuados por exposição à radiação X e γ são capazes de invadir os hepatócitos *in vivo*, tal como os esporozoítos normais, no entanto são incapazes de se desenvolver em estadios que infectem os eritrócitos, não ocorrendo sintomas clínicos nem a transmissão da malária (Suhrieb *et al.*, 1990).

Humanos e animais experimentais injectados com esporozoítos atenuados podem tornar-se completamente resistentes à infecção por um período variável de tempo (Nardin *et al.*, 1999; Nussenzweig e Nussenzweig, 1989; Hoffman *et al.*, 1996). Ainda não é claro porquê que a vacinação com esporozoítos atenuados induz uma imunidade tão forte comparada com a induzida pelas infecções naturais. Contudo, existem vários factores que parecem estar implicados: o grande número de esporozoítos utilizados (centenas de milhares por vacinação comparado com 1 a 100 por picada nas infecções naturais) (Beier *et al.*, 1991; Hoffman *et al.*, 1991), a possibilidade de persistência, por longos períodos, dos esporozoítos atenuados no fígado (Scheller e Azad, 1995) e a indução da apoptose dos hepatócitos que se segue à infecção por esporozoítos atenuados mas não normais, permitindo assim a exposição dos antígenos do esporozoíto ao sistema imunitário (Leiriao *et al.*, 2005; James, 2005).

Inicialmente, foi proposto que a protecção contra a fase pré-eritrocítica seria mediada directamente pelos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs), que têm uma actividade citotóxica, provocando a apoptose das células infectadas, os hepatócitos, eliminando assim os parasitas intracelulares (Hoffman *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 1988; Schmiege *et al.*, 2003). Contudo, as citocinas e outros factores, incluindo o óxido nítrico (NO), também estão implicados. Foi demonstrado que é necessário interleucina (IL)-12 e células matadoras naturais (NK: *Natural Killer*) na protecção induzida pela imunização de murganhos BALB/c com esporozoítos irradiados ou DNA plasmídico (Doolan e Hoffman, 2000). Isto levou à proposta de que as células T CD8⁺ específicas para o parasita estão implicadas num mecanismo de imunidade adaptativa levando à produção de IFN- γ . Este IFN- γ leva à produção de IL-12, que por sua vez induz a produção de IFN- γ adicional pelas células NK e outras células, num *feedback* positivo que representa um importante mecanismo de amplificação. Desta forma, tal protecção não parece ser mediada directamente pela destruição clássica dependente de Perforina, Granzima ou Fas (Renggli *et al.*, 1997; Doolan e Hoffman, 2000), mas antes pela indução de cascatas de interacção entre células (células

CD8⁺ ou NK) e citocinas (IL-12 e IFN- γ), levando à produção de efectores finais como o NO.

Por outro lado, sabe-se também que as células T CD4⁺ são essenciais para a manutenção da expansão e sobrevivência das células T CD8⁺ (van der Heyde *et al.*, 1993).

3.2. Imunidade eritrocítica

Os parasitas da malária desenvolvem-se dentro dos GV, os quais não expressam moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC). Contudo, os glóbulos vermelhos parasitados (GVp) expressam à sua superfície antígenos codificados pelo parasita, sendo os mais importantes os antígenos de superfície variáveis (VSAs). Aquele que se encontra melhor caracterizado é o PfEMP1 (proteína 1 variável de merozoíto de *P. falciparum*), capaz de mediar a ligação de GVp a, por exemplo, pequenas vénulas em diferentes tecidos do hospedeiro, tais como cérebro, pulmões e fígado, ocorrendo sequestração de estadios maduros de parasita. Tal resulta numa patologia local e também interfere com a capacidade do baço limpar os parasitas do sangue (Good *et al.*, 2005).

Durante a ruptura dos GV, os detritos do parasita e também os detritos celulares são libertados na corrente sanguínea activando uma resposta imunitária, causando alguns dos sintomas clínicos da Malária, que incluem febre, dores de cabeça, fadiga e náuseas. Se a infecção for de *P. falciparum*, podem haver sintomas adicionais mais graves como: choque circulatório, síncope (desmaios), convulsões, delírios e crises vaso-oclusivas. Se não diagnosticada e tratada, a Malária maligna causada por *P. falciparum* pode evoluir rapidamente, resultando em morte. Ao contrário, a Malária "benigna" resulta muitas vezes em debilitação crónica, mas raramente em morte. Sintomas crónicos incluem a anemia, cansaço, debilitação com redução da capacidade de trabalho e da inteligência funcional, hemorragias e enfartes de incidência muito aumentada.

Numa primeira linha de defesa do hospedeiro à infecção, o sistema imune responde de várias formas, tentando eliminar o parasita. Uma das vias é através da opsonização (isto é, neutralização directa) dos merozoítos e dos GVp por anticorpos dirigidos contra os antígenos do parasita que se expressam à superfície destas células, tornando-as mais fáceis de serem ingeridas pelos macrófagos e outras células do sistema imune. Estes anticorpos também podem ajudar as proteínas do Complemento a destruir os parasitas ou a prevenir a infecção de novos GV por merozoítos. Desta forma, a protecção contra a fase sanguínea é parcialmente mediada por anticorpos. Por outro lado, a estimulação das células mononucleares do sangue humano periférico para a libertação de citocinas pro-inflamatórias, tais como factor de necrose tumoral (TNF)- α , IFN- γ , IL-12 e IL-18, é outra consequência da resposta imune aos antígenos do parasita. Estas citocinas podem ter uma função importante na activação de monócitos (Esparza *et al.*, 1987), neutrófilos (Djeu *et al.*, 1990), células T (Yokota *et al.*, 1988) e células NK (Østensen *et al.*, 1987) do hospedeiro. Esta resposta causa alguns sintomas da doença. Por exemplo, os sintomas de febre da malária estão associados aos altos níveis TNF- α que é libertado pelos macrófagos quando ocorre a lise dos GVp e, conseqüentemente, a libertação de um grande número de

parasitas na rede sanguínea.

3.2.1. Macrófagos e Células Dendríticas

Após a ingestão das células infectadas, os macrófagos passam a exprimir antígenos do parasita à sua superfície. As células T reconhecem-nos e ligam-se a esses antígenos, ficando activadas e libertando citocinas que promovem nova activação celular, destruição do parasita e produção de anticorpos.

As citocinas libertadas pelos macrófagos activados, como por exemplo a IL-6, IL-12 e o TNF- α activam os leucócitos (monócitos, neutrófilos, etc) e aumentam a activação das NK. Por outro lado, também ocorre a activação das células dendríticas que, em conjunto com os macrófagos, vão induzir a resposta das células T através da apresentação de péptidos do parasita, via MHC classe I ou II e da produção de citocinas (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003).

3.2.2. Células B

Durante a patologia, também ocorre activação das células B, via células T auxiliares 2 (Th2 - *T helper 2*) e citocinas libertadas. Esta activação leva à secreção de anticorpos contra as moléculas do parasita necessárias para a invasão dos GV, e de anticorpos que reconhecem as moléculas de adesão do parasita ao endotélio expressas na superfície dos GV (Bull *et al.*, 1998). Estes anticorpos têm a capacidade de impedir que os merozoítos invadam os GV e de aumentar a remoção dos GVp em circulação, respectivamente, promovendo a sua eliminação no baço pelos macrófagos. A interacção dos GV opsonizados com estas células do sistema imune induz a libertação de mais TNF- α que, embora tenha a capacidade de activar as células efectoras, tem também um papel na patogénese, estando associado à gravidade da doença e às febres típicas da malária (Perlmann *et al.*, 2002).

3.2.3. Células NK

As células NK são linfócitos envolvidos na fase inicial de defesa contra as infecções virais e infecções bacterianas intracitoplasmáticas. Estas células apresentam uma importante actividade citotóxica e produzem altos níveis de citocinas pró-inflamatórias.

Tanto nos humanos como nos modelos de malária de murganhos, as células NK parecem ser, dentro das células mononucleadas do sangue periférico (PBMC - *peripheral blood mononuclear cells*), uma fonte principal de IFN- γ durante a fase inicial da infecção (Roetynck *et al.*, 2006). No entanto, verificou-se que, *in vitro*, é necessária a cooperação dos macrófagos/monócitos, através da produção de IL-18, para estimular a actividade das células NK (Baratin *et al.*, 2005)

Apesar de tudo, as funções *in vivo* das células NK durante a malária continuam enigmáticas, e muitas questões continuam por esclarecer, tal como a base molecular do reconhecimento directo dos GVp por estas células (Roetynck *et al.*, 2006).

3.2.4. Células T CD4⁺

O interesse nas células T CD4⁺ efectoras na imunidade anti-malária tem crescido nestes últimos tempos. O papel das células T CD4, na resposta imune contra o parasita, foi demonstrado através: i) da depleção selectiva destas células *in vivo*; ii) da transferência de células T CD4⁺ para murganhos imuno-deficientes e iii) pela capacidade demonstrada por estas células, quando provenientes de humanos infectados, de inibirem o crescimento do parasita *in vitro* (Brake *et al.*, 1988; Cavacini *et al.*, 1986). Estas células compreendem, pelo menos, 2 tipos celulares distintos, consoante as citocinas que produzem: as células T auxiliares 1 (Th1 – *T helper 1*) e as Th2. As células Th1 produzem IFN- γ e IL-2, que são importantes no controlo da fase inicial da infecção activando os macrófagos. As células Th2 produzem IL-4 e IL-10, responsáveis pela activação das células B que produzem anticorpos (resposta humoral), desempenhando um importante papel na eliminação do parasita nas fases tardias da infecção (Torre *et al.*, 2002; Troye-Blomberg *et al.*, 1994).

3.2.5. Células T CD8⁺

O papel protector das células T CD8⁺ contra os esporozoítos e a fase hepática da malária já foi comprovado através de vários trabalhos em roedores, onde a depleção das células T CD8⁺ *in vivo* remove a protecção, a transferência de células T CD8⁺ para murganhos não infectados confere protecção, e murganhos β -2-microglobulina ^{-/-} (os quais não expressam MHC classe I e consequentemente não têm células T CD8⁺) não ficam protegidos por imunização activa ou por transferência de células T do baço *wild-type* de murganhos imunes (Kumar e Miller, 1990; Vinetz *et al.*, 1990; Podoba e Stevenson, 1991, White *et al.*, 1996)

No entanto, as células T CD8⁺ também podem contribuir para a sintomatologia associada à malária, e tal acontece durante a fase sanguínea da patologia. A infecção pelo parasita da malária pode induzir uma reacção inflamatória intravascular, que pode ser observada em órgãos que têm um importante papel na sobrevivência da rede sanguínea, como é o caso do fígado e do baço, como resultado das interacções entre o parasita e as células do hospedeiro. As células T CD8⁺, conhecidas pela sua função citotóxica, quando activadas migram para esses tecidos onde a exposição inicial se deu e provocam a apoptose das células infectadas. Como alguns tecidos podem não ser apropriados para a destruição dos parasitas, a localização de células T CD8⁺ nestes tecidos pode contribuir para a imunopatologia da malária (Lackner *et al.*, 2006).

4. Sintomatologia da malária

4.1. Manifestações clínicas

A malária enquanto doença aguda, e na sua fase sintomática, manifesta-se geralmente entre 10 a 35 dias depois da infecção através da picada do mosquito. Em geral os primeiros sintomas são náuseas e vómitos; arrepios, suores e tremores seguidos

de febre ligeira e intermitente (com vários picos de febre compreendidos entre os 39° e 41° C), sintomas estes que poderão ser confundidos com a sintomatologia da gripe; megalosplenia e hepatomegalia (aumento exagerado do baço e fígado, respectivamente), anemia e icterícia. Os pacientes adultos costumam apresentar também acidose láctica e hipoglicemia que podem conduzir a uma falha dos rins. O mesmo não acontece nas crianças infectadas.

Os sintomas começam apenas a manifestar-se quando o parasita se multiplica assexuadamente nos GV, sendo que os picos de febre correspondem ao rebentamento dos mesmos.

5. Imunopatologia da Malária

Caso a malária não seja tratada eficazmente, esta pode progredir para formas severas como a anemia severa e a malária cerebral, resultantes em parte de uma resposta inflamatória exagerada (McGuire *et al.*, 1994; Luty *et al.*, 2000).

5.1. Malária Cerebral

A malária cerebral (MC) é a patologia mais grave que pode resultar da infecção por *P. falciparum* nos humanos.

Apesar de continuar controverso e desconhecido o mecanismo responsável por esta neuropatologia, acredita-se viamente que a sequestração no cérebro de GVp e/ou células T CD8⁺ são ambos críticos para a patogénese na sua fase final.

5.1.1. Doença nos humanos

A malária cerebral é diagnosticada nos humanos quando um paciente com parasitémia confirmada, provocada pela infecção por *P. falciparum*, apresenta um conjunto de sintomas: hiperpirexia (episódios de febre de pelo menos 40° C), convulsões e sinais de disfunção cerebral, que incluem encefalopatia com alterações de consciência, que variam de um estado de dormência a coma profunda, podendo mesmo levar à morte do paciente (Schmutzhard e Gerstenbrand, 1984).

A patogenicidade desta doença ainda é desconhecida, mas devido ao seu impacto nas crianças e mulheres grávidas, vários esforços têm sido feitos para se descobrir os mecanismos e melhorar a sua caracterização a nível patológico. Neste momento acredita-se que a patologia resulta na junção de duas teorias: i) na teoria da obstrução que propõe que a sequestração dos GVp na microvasculatura do cérebro pode levar à obstrução da circulação sanguínea e consequente anoxia (Warrell *et al.*, 1988; Pongponratn *et al.*, 1991; Berendt *et al.*, 1994); ii) na teoria da inflamação onde é sugerido que a patologia cerebral pode resultar de reacções imunológicas que afectam a integridade do revestimento endotelial vascular (Grau *et al.*, 1989, Butcher *et al.*, 1990, Clark e Rockett, 1994, Eling e Kremsner, 1994, Grau e Wassmer, 1994, Patnaik *et al.*, 1994; Eling e Sauerwein, 1995). Vários estudos têm sido feitos no sentido de comprovar essas teorias. A associação das células T à patologia cerebral foi sugerida

pela primeira vez por Edington (Edington, 1967) que se baseou na observação de Trowell em que crianças com o síndrome de Kwashiorkor, cujo timo se encontra atrofiado, encontravam-se protegidas da malária severa, desenvolvendo raramente MC (Trowell *et al.*, 1954). Mais tarde, a sequestração dos leucócitos no cérebro foi descrita em pacientes que morreram de MC (Toro and Roman 1978). Recentemente, estudos imunohistológicos de cérebros de crianças da República do Malawi, que sucumbiram com MC, revelaram uma acumulação importante de leucócitos e plaquetas intravasculares, quando comparadas com crianças que morreram de outras complicações de malária (Clark 2003; Mackenzie *et al.*, 1999).

Contudo, apesar da citoaderência dos GVP às células endoteliais da microvasculatura cerebral em pessoas infectadas com *P. falciparum* ser um factor necessário, a observação deste fenómeno em casos de malária sem sintomas de MC (Silamut *et al.*, 1999) sugere que outros factores estão implicados.

Sabe-se que o cérebro de uma pessoa que morre com MC apresenta-se edematoso e inchado, com hemorragias petequiais, o córtex cerebral e do cerebelo de cor cinzenta, com evidências histológicas de parasitas sequestrados dentro dos vasos cerebrais, e presença de macrófagos contendo grânulos de hemozoina (revisto por Haldar *et al.*, 2007). O sequestro de GV contendo estadios maduros do parasita (trofozoítos e esquizontes) nos microvasos do cérebro e doutros tecidos é, como já foi dito, resultado da expressão de proteínas do parasita, na superfície do GV, que medeiam a ligação destes GVP às células endoteliais da microvasculatura (Su *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995). Esta sequestração tem sido descrita ao longo dos anos, e foi o primeiro sintoma, detectado histologicamente após a morte dos pacientes com MC, a ser associado à patologia. No entanto, ainda não se sabe como este fenómeno contribui para a patogénese da doença (Miller *et al.*, 2002; Seydel *et al.*, 2006). Tendo em conta que a MC é o resultado dos efeitos sistémicos da progressão da infecção por *P. falciparum*, hoje em dia já se começa a estudar outros órgãos e tecidos que se sabe também terem parasitas sequestrados. Existem estudos moleculares recentes que sugerem que a sequestração do parasita pode ser específica do tecido onde é sequestrado (Mota *et al.*, 2000).

A confirmação da sequestração cerebral por autópsia não é possível ser praticada, na maioria das situações, e por isso novas ferramentas têm sido validadas (Beare *et al.*, 2004 Milner *et al.*, 2005). Como a retina é uma extensão do Sistema Nervoso Central, o exame a essa estrutura por oftalmoscopia pode vir a ser útil no diagnóstico e monitorização da malária severa, como tem vindo a ser feito para outras condições, tais como a diabetes e o edema cerebral. Já existem estudos que correlacionam as hemorragias retinianas com as observadas no cérebro em autópsias de crianças africanas que morreram com MC (White *et al.*, 2001). O mesmo também foi feito em modelos murinos (Hunt *et al.*, 2006).

Adicionalmente às alterações do Sistema Nervoso Central, a sequestração e outras patologias têm sido observadas noutros órgãos. Por exemplo, o fígado de pessoas que faleceram com malária severa surge, na autópsia, com uma cor escura porque existem muitos macrófagos contendo a hemozoina retida no seu interior (Haldar *et al.*, 2007). Outro dado surpreendente é o facto do sistema gastrointestinal conter muitos mais parasitas sequestrados do que o cérebro (Seydel *et al.*, 2006).

5.1.2. Modelos animais experimentais

Para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nesta doença, têm sido utilizados modelos animais experimentais, sistema reproduzível e de fácil manipulação, que, apesar de não reflectir exactamente as condições humanas, assemelha-se em alguns aspectos. Os modelos experimentais murinos de MC estão indicados na tabela 1.

Tabela 1: Comparação do modelo humano com os modelos experimentais de roedores para a MC. +: observado; -: não observado; N.I.: não indicado; CMC: células mononucleadas

Espécies de <i>Plasmodium</i>	Hospedeiro	Sequestração	Sintomas Neurológicos	Referência bibliográfica
<i>P. falciparum</i>	Homem	GVp e CMC	+	Turner <i>et al.</i> , 1994
<i>PbA</i>	Murganhos CBA/ca	GVp	+	Rest, 1982 Grau <i>et al.</i> , 1987
<i>PbA</i>	Murganhos Balb/c	-	-	Kossodo & Grau, 1993
<i>PbA</i>	Murganhos C57Bl/6	Leucócitos	+	Kossodo & Grau, 1993
<i>PbA</i>	Murganhos DBA/2	Leucócitos	+	Neill <i>et al.</i> , 1992
<i>PbA</i>	Murganhos (Balb/c x C57Bl/6)	GVp e Leucócitos	+	Hearn <i>et al.</i> , 2000
<i>PbK173</i>	Murganhos C57Bl/6	Leucócitos	+	Curfs <i>et al.</i> , 1989
<i>P. yoelii</i> 17XL	Murganhos <i>swiss</i>	GVp	+	Kaul <i>et al.</i> , 1994
<i>P. yoelii</i> 17XL	Murganhos Balb/c	GVp	+	Haque <i>et al.</i> , 2001
<i>P. yoelii</i> 17XL	Murganhos DBA/2	-	-	Haque <i>et al.</i> , 2001

5.1.2.1. Patogénese da doença nos modelos experimentais

Actualmente, os murganhos C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (*PbA*) são considerados o modelo murino experimental clássico de MC. Este modelo caracteriza-se por desenvolver, por volta do dia 6-7 de infecção, um padrão de sintomas típico de MC: ataxia, paralisia dos membros, convulsões e coma.

Os primeiros estudos realizados com modelos experimentais para a MC foram efectuados nos anos 60 utilizando roedores. Nestes foi demonstrado que a timectomia neonatal em hamsters prevenia a MC, tal como o tratamento com anticorpos anti células T CD4 ou T CD8 em hamsters e murganhos (Wright *et al.*,

1971; Grau *et al.*, 1986; Yañez *et al.*, 1996; Hermsen *et al.*, 1997). Deste modo, foi sugerida a associação entre as células T e a neuropatologia. Mais tarde, recorrendo a análises histopatológicas de cérebros de murganhos com MC, observou-se que existe sequestração de leucócitos e GVp no cérebro a nível intravascular, tal como nos humanos, e que este recrutamento ocorre ao mesmo tempo que o aparecimento dos sinais neurológicos (Neill e Hunt, 1992). No entanto, nos modelos murinos, ao contrário do observado nos humanos, a sequestração é predominantemente de leucócitos, incluindo macrófagos, células T (CD4⁺ e CD8⁺) e neutrófilos, encontrando-se células dendríticas, células B e células NK em menor quantidade (Belnoue *et al.*, 2002). Usando quer anticorpos depletantes quer animais deficientes para algumas destas células, foi demonstrado que muitos destes leucócitos ou não estão implicados directamente na patologia ou estão envolvidos apenas numa fase inicial da doença, como é o caso das células T CD4⁺ (Grau *et al.*, 1986; Yañez *et al.*, 1996; Hermsen *et al.*, 1997; Boubou *et al.*, 1999; Belnoue *et al.*, 2002; Bagot *et al.*, 2004).

5.1.2.2. Papel das células T CD8⁺ na MC

Utilizando modelos murinos, tem vindo a ser demonstrado que as células T CD8⁺ têm um papel predominante na fase efectora da patologia (Yañez *et al.*, 1996; Hermsen *et al.*, 1997; Belnoue *et al.*, 2002). Foi demonstrada a correlação entre a ocorrência da neuropatologia em murganhos infectados com PbA com o aumento significativo das células CD8⁺TCRVβ8⁺ no sangue periférico (Boubou *et al.*, 1999). Também, comparando modelos de roedores de MC com modelos de não MC foi possível estabelecer a correlação entre o número de células T CD8⁺ sequestradas no cérebro e o desenvolvimento da patologia (Belnoue *et al.*, 2002; Nitcheu *et al.*, 2003; Bagot *et al.*, 2004).

Reforçando a importância das células T CD8⁺ no desenvolvimento da doença, verificou-se que a depleção destas células, no dia anterior ao desenvolvimento dos sintomas neurológicos, pode proteger 100% dos animais (Belnoue *et al.*, 2002; Hermsen *et al.*, 1997). Estes resultados indicam claramente que as células T CD8⁺ estão implicadas no desenvolvimento da MC num estadios tardio da infecção.

Contudo, o contexto necessário para a sua função efectora continua desconhecido, e por isso têm vindo a ser desenvolvidos estudos que procuram esclarecer o seu papel no(s) mecanismo(s) que conduz(em) ao desenvolvimento desta patologia. Neste momento, a principal hipótese apontada para explicar o mecanismo que conduz ao desenvolvimento da MC é que o material do parasita possa ser ingerido pelas células endoteliais do cérebro (previamente activadas pelo IFN-γ e/ou TNF produzidos em resposta à infecção), levando à sua eventual apresentação às células T CD8⁺ no contexto do MHC classe I. A partir desse momento, estas células T activadas induzirão a apoptose das células

apresentadoras de antigénio, neste caso as células endoteliais, levando à perda de integridade da BHE (Rénia *et al.*, 2006).

São conhecidos diferentes mecanismos de destruição de células alvo mediados pelas células T CD8⁺: via das perforinas, via do Fas/ligando Fas (CD95/CD95L), via do TNF e via do ligando relacionado com o TNF indutor de apoptose (TRAIL). Utilizando murganhos deficientes em perforina demonstrou-se que a via citotóxica dependente da perforina, mas independente de Fas/ligando Fas, está envolvida na patogénese da MC (Nitcheu *et al.*, 2003). Estudos recentes revelaram que a apoptose das células endoteliais do cérebro é dependente da presença de perforina (Potter *et al.*, 2006). Os resultados desse trabalho vêm reforçar a hipótese, acima indicada, de que as células T CD8⁺, através da libertação de perforina e granzima B, induzirão a apoptose das células endoteliais levando à quebra da BHE (Rénia *et al.*, 2006). Todavia, esta hipótese ainda está por comprovar.

6. Objectivos e Relevância

Apesar do envolvimento evidente das células T CD8⁺ na MC, ainda existem alguns factos que necessitam de ser investigados, nomeadamente, o fenótipo exacto destas células, assim como o contexto necessário para que elas exerçam a sua função efectora no cérebro. Os resultados poderão ser úteis para se compreender, verdadeiramente, a fisiopatologia da doença, e eventualmente se poder vir a intervir numa fase avançada da patologia.

Por outro lado, apesar dos estudos publicados até ao momento demonstrarem que as células T CD8⁺ só estão presentes no cérebro de murganhos que desenvolvem MC, o nosso grupo dispõe de um outro modelo murino de malária onde também se observa uma acumulação equivalente de células T CD8⁺ no cérebro mas sem que haja desenvolvimento de patologia cerebral. Este modelo consiste em murganhos infectados com uma outra linha de parasita, o *P. berghei* NK65 (PbNK65). Baseando-se nestes modelos, várias hipóteses podem ser levantadas para explicar a presença das células T CD8⁺ no cérebro sem que exerçam a sua actividade efectora, entre outras, o seu estado de activação ou o seu potencial de indução de morte nas células alvo.

O estudo comparativo das células T CD8⁺ que se acumulam no cérebro dos animais que desenvolvem MC com os modelos em que os animais não desenvolvem a patologia pode dar-nos pistas sobre o fenótipo e os mecanismos de acção destas células que são patogénicas. Este conhecimento poderá contribuir para o desenvolvimento de novas terapias para a fase tardia da doença.

CAPÍTULO II

TRABALHO PRÁTICO E RESULTADOS

1. Materiais e Métodos

Animais

Em todas as experiências foram utilizados murganhos machos C57BL/6 (dos laboratórios Jackson) com 6 a 10 semanas de idade. Todos os animais foram criados e mantidos em condições específicas e livres de patógenos, no Biotério do Instituto Gulbenkian de Ciência (IGC). As experiências com murganhos foram realizadas de acordo com as normas autorizadas pelo Ministério Português da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas segundo recomendações da União Europeia e aprovadas nos Decretos-Lei n.º 129/92 de 6 de Julho e 197/96 de 16 de Outubro, com as devidas alterações introduzidas pelas Portarias n.º 1005/92 de 23 de Outubro e 1131/97 de 7 de Novembro.

Parasita e Patologia

Neste estudo foram utilizados GVp com *P. berghei* ANKA clone 1.49L (PbA), *P. berghei* ANKA transgénico para proteína verde fluorescente (PbA-GFP) (Franke-Fayard *et al.*, 2004) ou *P. berghei* NK65 (PbNK65). Os parasitas foram preparados a partir de sangue de um murganho C57BL/6 infectado e conservados a -80° C em *stocks* de 10⁷ GVp/ml de tampão Alsevier [10,25 g Dextrose (Sigma), 3,95 g Citrato de Sódio, 2,1 g Cloreto de Sódio, 50 ml Glicerina (todos da Carlo Erba), 450 ml de água destilada, ajustado a pH 6,1 e filtrado].

Os murganhos foram infectados através de injeção intraperitoneal (i.p.) com 10⁶ GVp para o PbA ou PbA-GFP, e 3,5x10⁶ GVp para o PbNK65. Os murganhos infectados foram monitorizados diariamente determinando a parasitémia, ou seja a percentagem de GVp calculada a partir da contagem ao microscópio do número de GVp em pelo menos 1000 GV, em esfregaços de sangue, corados com Giemsa [10% Giemsa (Merck), 10% Tampão Giemsa 10x (5 g Na₂HPO₄12H₂O, 2 g KH₂PO₄ ambos da Carlo Erba, num litro de água destilada e ajustado a pH 7,5)]. Foi também registada a ocorrência ou não de desenvolvimento dos sintomas de MC experimental que incluem paralisia, desvio da cabeça, ataxia, convulsões e coma. Oitenta a 100% dos murganhos infectados com PbA ou PbA-GFP morrem com MC entre os dias 6 e 8 após infecção, com parasitémia moderada. Os restantes 20% morrem com hiperparasitémia e anemia por volta do dia 21 após infecção. Os murganhos infectados com PbNK65 têm uma parasitémia moderada ao dia 7 após infecção mas não desenvolvem MC, morrendo durante a segunda semana de infecção com valores de parasitémia elevados sem desenvolvimento de quaisquer sintomas de MC.

Tratamento Antimalárico

Para os tratamentos antimaláricos foram utilizadas duas drogas: Pirimetamina (Pyr, Sigma) e Cloroquina (CHL, Sigma).

Para a Pyr, murganhos infectados com PbA foram tratados durante a noite, 15-18 horas antes do desenvolvimento dos sintomas neurológicos de MC. Dependendo da via de administração, a droga antimalárica foi preparada em DMSO (Sigma) com diferentes

concentrações: 7 mg/ml para ser ingerida através da água de beber ou 1,25 mg/ml para ser injectada i.p.. Resumidamente, a solução *stock* de Pyr para ser ingerida foi preparada em DMSO e depois diluída 100x na água que os murganhos bebem, cujo pH foi ajustado com HCl a 3,5-5,0; a que foi utilizada para injectar, foi preparada em DMSO e posteriormente diluída 20x em PBS 1x (Gibco) (Ono *et al.*, 2007) antes de serem injectados, via i.p., 100 µl em cada murganho (a concentração final de DMSO injectada de 5% não é tóxica para os murganhos)

Para a CHL, murganhos infectados com PbA foram tratados com uma simples dose injectada i.p., nas últimas 18-24 horas antes do início da MC. Este antimalárico foi preparado em PBS a uma concentração de 7 mg/ml e, por cada murganho, foram injectados 100 µl do antimalárico.

Na maioria dos animais este tratamento previne o desenvolvimento de MC no dia seguinte (dia 6 ou 7 pós infecção (p.i.)). Murganhos infectados com PbA e tratados com DMSO diluído em água para beber ou 5% de DMSO injectado i.p., foram utilizados como controlo, e desenvolvem MC ao dia 6 ou 7 p.i..

Colheita de Amostras e Purificação de Linfócitos

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar e analisar as características físicas e moleculares de partículas microscópicas num meio líquido, através de um aparelho de detecção óptico e/ou eletrónico, o citómetro de fluxo.

Neste trabalho, como foram analisadas células de cérebro e baço, foi necessário preparar primeiramente uma suspensão celular.

Cérebro

Os murganhos com ou sem sinais de MC foram sacrificados e o cérebro de cada um foi removido, após perfusão intracardíaca (i.c) com PBS para remover do cérebro os GV e leucócitos circulantes. Depois de removidos e pesados, os cérebros foram dilacerados, individualmente, em HBSS (Gibco) suplementado com 0,05% Colagenase tipo VIII (Sigma) e 2 U/µl DNase (Sigma). O extracto de tecido cerebral foi incubado a 37° C durante 20 minutos com agitação, posteriormente passado por um filtro (*cell strainer*, Falcon) e centrifugado a 4°C durante 10 minutos a 300g. As células presentes no *pellet* foram purificadas, por centrifugação a 1100g durante 20 minutos à temperatura ambiente, em *Percoll* (Pharmacia) a 30% (v/v). Após rejeição do sobrenadante, as células purificadas, presentes no *pellet*, foram ressuspensas em meio RPMI completo [meio de cultura RPMI-1640 (Gibco) suplementado com soro fetal de bovino (FCS) a 10%, Penicilina a 100 U/ml, Estreptomicina a 100 µg/ml, 2β-Mercaptoetanol a 50 µM, Hepes a 10 mM, and Piruvato de Sódio a 1 mM (todos da Life Technologies)], e o volume exacto foi medido para se poder calcular mais tarde o número total de células.

Baço

Os murganhos com ou sem sinais de MC foram sacrificados e o baço de cada um foi removido. Os baços foram dilacerados a 4° C, individualmente, em HBSS suplementado

com 2 U/ μ l DNase (Sigma) utilizando *cell strainers* (Falcon). Centrifugou-se a 4^o C e o *pellet* foi tratado com tampão de lise ACK (*Ammonium-Chloride-Potassium*) [0,15 M NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, 1 mM Na₂EDTA (todos da Carlo Erba)] durante 1 minuto à temperatura ambiente, de forma a lisar os GV. Depois, parou-se a reacção adicionando 7 ml de tampão *Sort* [PBS 1x suplementado com 2% FSC]. Após nova centrifugação, foram adicionados 7 ml de meio RPMI completo.

Imunomarcção e Análise de Citometria de Fluxo

Para a análise por citometria de fluxo, cada partícula passa através do feixe de luz, dispersando-a de alguma forma, e os fluorocromos existentes na partícula podem ser excitados de modo a emitir luz numa frequência mais alta do que a da fonte de luz, que será captada pelos detectores do citómetro. De modo a ser possível a sua detecção, as células analisadas neste trabalho tiveram de ser marcadas com anticorpos (imunomarcção), contra antigénios celulares específicos, conjugados com fluorocromos. Deste modo, as suspensões celulares foram incubadas, em microplacas de 96 poços de fundo redondo, com 50 μ l de uma diluição apropriada de FcBlock (utilizado para bloquear a aderência de anticorpos ao receptor Fc, existente em algumas células do sistema imune), durante 30 minutos a 4^o C. Após lavagem com tampão *FACS* [PBS 1x suplementado com 2% FSC e 0,02% Azida Sódica], as suspensões celulares foram incubadas com 50 μ l das diluições apropriadas de anticorpos monoclonais (mAc) conjugados com fluorocromos. As diluições de FcBlock e mAc foram feitas em tampão *FACS*. Após a imunomarcção de superfície, os GV contaminantes foram lisados com *FACS Lysing Solution* (Becton Dickinson).

Para a marcação de IFN- γ intracelular, as células foram incubadas a 37^o C em 5% CO₂ durante 3 horas com 50 ng/ml de Acetato de Forbolmiristato (PMA, Sigma), 500 ng/ml de Ionomicina (Sigma) e 10 ng/ml de Brefeldina A (Sigma) em meio RPMI completo. As células foram lavadas com tampão *FACS* e incubadas com FcBlock e mAc como descrito anteriormente para a marcação de superfície. Após lavagem, as células foram fixadas com 2% de Paraformaldeído (PFA) em PBS 1x à temperatura ambiente, durante 30 minutos. As células foram depois permeabilizadas utilizando o tampão *PermWash* (BD Bioscience) e incubadas durante 30 minutos com 50 μ l das diluições apropriadas de mAc em *PermWash*. A marcação para a Granzima B foi feita sem o passo de incubação com meio RPMI completo durante 4h, mas o restante protocolo foi idêntico ao descrito para a marcação de IFN- γ intracelular. Para controlo de possíveis marcações inespecíficas dos anticorpos de marcação intracelular utilizaram-se isotipos controlo.

Os mAc utilizados para as marcações celulares encontram-se descritos na tabela 2.

anti-CD69	IgG de murganho	H1.2F3	b	Superfície	BD PharMingen
anti-CD44	IgG de murganho	IM7	FITC / PE	Superfície	BD PharMingen
anti-CD62-L	IgG de murganho	MEL-14	PE	Superfície	BD PharMingen
anti-CD11c	IgG de murganho	HL3	PE	Superfície	BD PharMingen
anti- H-2K ^b	IgG de murganho	AF6-88.5	b	Superfície	BD PharMingen
anti-IFN- γ	IgG ₁ de murganho	XMG1.2	FITC	Intracelular	BD PharMingen
anti-Granzima B	IgG de murganho	16G6	PE	Intracelular	eBiosciences
anti-CD45	IgG de murganho	30-F11	PE	Superfície	eBiosciences
anti-CD8 α	IgG _{2b} de rato	YTS169.4	Cy5	Superfície	IGC
anti-CD4	IgG _{2b} de rato	GK1.5-8	FITC	Superfície	IGC
anti-TCR $\alpha\beta$	IgG de Hamster Americano	H57-597	PE; FITC	Superfície	IGC
CD16/CD32 (FcBlock)	IgG _{2b} de rato	2.4G2	-	-	IGC
anti-CD11b	IgG _{2b} de rato	M1/70	Cy5	Superfície	IGC

Tabela 2: Lista de mAc utilizados na marcação celular para FACS. Os fluorocromos conjugados foram: FITC = Isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein isothiocyanate*); PE = Ficoeritrina (*Phycoerythrin*); Cy5 = Cianina (*Cyanine 5*); e b = biotina. Os anticorpos produzidos no IGC resultam da purificação feita a partir de sobrenadantes de cultura dos clones referidos na tabela. Para as marcações efectuadas com anticorpos biotinilados utilizou-se um segundo produto conjugado com um fluorocromo produzido no IGC: a estreptavidina (SAV) conjugada com FITC.

A aquisição por citometria de fluxo foi efectuada num citómetro de fluxo FACScalibur[®] (BD Bioscience) com o *software* CellQuest[™] (BD Biosciences). A análise dos dados recolhidos foi efectuada com o *software* FlowJo[®] (Tree Star, Inc).

Quantificação de Leucócitos Totais por Citometria de Fluxo

Um determinado volume da suspensão celular foi diluído em tampão FACS ao qual se adicionou um número conhecido de *beads* de látex (Coulter).

Para determinar o número total de células no cérebro e no baço foram adquiridas 400 *beads* no citómetro de fluxo e fez-se uma separação de acordo com o tamanho (FSC: *Forward Scatter*) e a granulosidade (SSC: *Side Scatter*) das células. Este passo permitiu a separação dos leucócitos (Figura 6). Utilizando as ferramentas do *software* FlowJo[®] delimitou-se a área correspondente à população de leucócitos adquirida e obteve-se o seu número. Da mesma forma obteve-se o número de *beads* adquiridas (cerca de 400). O número total de leucócitos foi determinado tendo em conta o número exacto de *beads* adicionadas, o número adquirido de leucócitos (equivalente às 400 *beads*) e o volume total de suspensão celular.

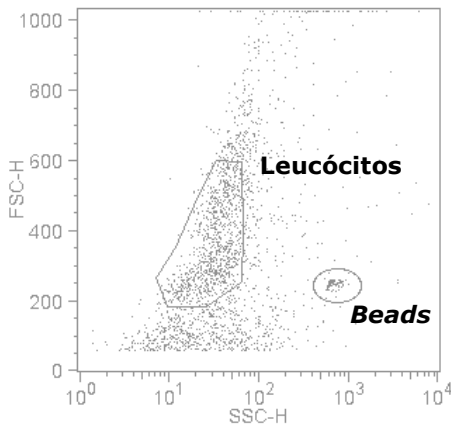


Figura 6: Representação da análise de resultados de citometria de fluxo para quantificação de células totais do cérebro de murganhos. Separação de células por tamanho e granulosidade.

Quantificação, por qRT-PCR, de parasitas no cérebro de murganhos infectados

A reacção em cadeia da polimerase (*PCR - polymerase chain reaction*) a tempo real, também conhecida como *qRT-PCR*, é uma técnica que permite em simultâneo a amplificação e quantificação em tempo real (como número absoluto de cópias ou quantidade relativa) de uma sequência específica de uma amostra de ácido desoxirribonucleíco (DNA). Frequentemente, a *qRT-PCR* é combinada com a *RT-PCR* (*reverse transcription polymerase chain reaction*) para quantificar ácido ribonucleíco mensageiro (mRNA) que se encontra em baixos níveis, de forma a quantificar a expressão relativa de um gene numa determinada célula ou tecido.

Neste estudo, pretendeu-se quantificar a expressão relativa do gene *18S* do parasita, e para tal os murganhos infectados foram sacrificados e, após perfusão i.c. com PBS, o cérebro foi removido e homogeneizado num tampão de digestão que consiste no tampão de desnaturação do *RNeasy Mini Kit* (Quiagen) suplementado com 1% de 2β-Mercaptoetanol (Sigma). O RNA foi extraído segundo as instruções do produtor do *RNeasy Mini Kit* (Quiagen).

Para a síntese da primeira cadeia de cDNA a partir dos moldes de RNA utilizou-se o *AMV Reverse Transcriptase Kit* (Roche) seguindo o protocolo sugerido pelo produtor. A expressão relativa do gene *18S* do parasita foi determinada no equipamento ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems) utilizando o *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do produtor. A expressão do gene *housekeeping hprt* (*Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyltransferase*) foi utilizada como referência endógena. As reacções de amplificação tiveram lugar num volume de reacção total de 20 µl, contendo *primers* específicos para o gene *18S* de PbA ou para o gene *hprt* de murganho, cujas sequências foram 5' - AAG CAT TAA ATA AAG CGA ATA CAT CCT TAC - 3' e 5' - GGA GAT TGG TTT TGA CGT TTA TGT G - 3'; e 5' - TGC TCG AGA TGT GAT GAA GG - 3' e 5' - TCC CCT GTT GAC TGG TCA TT - 3', nas proporções de 0,8 pmoles/µl ou 0,16 pmoles/µl, respectivamente. As condições dos ciclos de PCR foram: 1 ciclo de 10 minutos a 95°C; 45 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. A amostra de cDNA de referência utilizada para obter as curvas *standard* foi obtida a partir de GVp.

Para quantificar a expressão relativa do gene do parasita, a quantidade relativa de mRNA do gene *18S* do parasita foi dividida pela quantidade de mRNA do gene *hprt* medido na mesma amostra, para normalizar dentro da possível variação de quantidade e qualidade do RNA entre amostras diferentes. Esta normalização permite a comparação exacta da expressão do gene do parasita entre amostras diferentes, tendo em conta que a expressão do gene *hprt*, usado na normalização, é muito semelhante em todas as amostras.

Permeabilidade da Barreira Hematoencefálica

Para avaliar a integridade da barreira hematoencefálica durante a infecção recorreu-se ao Azul de Evans (AE). O AE é um corante não tóxico que se liga à albumina do soro, e tem sido utilizado em estudos de permeabilidade de vasos sanguíneos. A sua passagem através dos vasos sanguíneos para os tecidos pode ser detectada por pelo menos 3 métodos distintos: coloração do tecido, a um nível macroscópico; auto-fluorescência vermelha do BE em secções do tecido, recorrendo a microscopia de fluorescência; ou quantificação, por espectrofotometria, no sobrenadante de tecidos homogeneizados ou utilizando um diluente (Kuschanaroff *et al.*, 1999; Hamer *et al.*, 2002). Neste trabalho, foi utilizado este último método.

Resumindo, 200 µl de AE (Sigma) a 2% em PBS foram injectados, por via intravenosa (i.v.) no *sinus* orbital dos murganhos. Após uma hora, os murganhos foram sacrificados e todo o fluido circulante foi lavado através de perfusão i.c. com PBS. Os cérebros depois de removidos foram pesados e colocados em 2ml de Formamida (Merck) durante 48h a 37° C, de forma a extrair o AE do cérebro. A absorvância do sobrenadante foi então medida em microplacas de 96 poços de fundo plano a $\lambda = 620$ nm, num leitor de placas ELISA (BioRad). A concentração de AE foi calculada utilizando uma curva padrão feita a partir de diluições em série. Os resultados foram expressos em µg de AE por g de cérebro.

Análise Estatística

As diferenças entre os valores médios de dois grupos, num determinado momento, foram analisadas para significância estatística com o *software* GraphPad Prism version 3.0 (San Diego, CA) usando o teste não paramétrico Mann-Whitney. $P < 0.05$ foi considerado significativo.

2. Resultados

2.1. Células T CD8⁺ activadas acumulam-se no cérebro de murganhos sem MC

Uma característica que define o modelo experimental clássico (murganhos C57BL/6 infectados com PbA) é o desenvolvimento de sinais neurológicos de MC levando à morte a maioria dos animais infectados (80-100%), aos dias 6-7 p.i. (Figura 7a). Os restantes murganhos acabam por sucumbir com parasitémia elevada, cerca do dia 21 p.i. (Figura 7b).

Até ao momento, vários estudos publicados demonstraram uma correlação directa entre a acumulação de células T CD8⁺ no cérebro e o desenvolvimento de MC em

murganhos infectados com *Plasmodium* (Belnoue *et al.*, 2002; Bagot *et al.*, 2004; Nitcheu *et al.*, 2003). No entanto, até hoje não há qualquer referência quanto à quantidade de células T CD8⁺ sequestradas no cérebro de murganhos infectados com PbNK65, uma linha de parasita muito próxima do parasita PbA. Os murganhos C57BL/6 quando infectados com PbNK65 não desenvolvem MC, morrendo com hiperparasitêmia durante a terceira semana de infecção (Figura 7a e b).

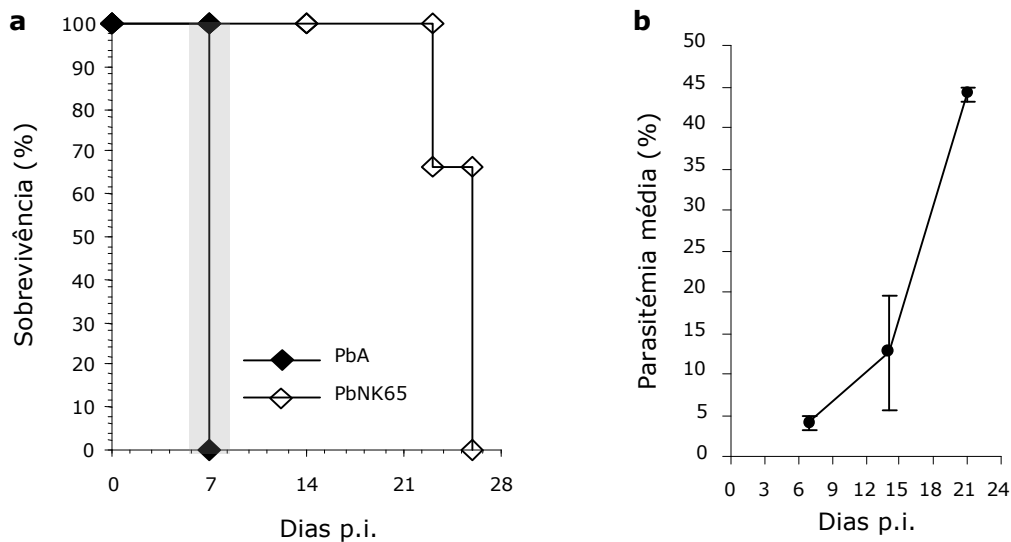


Figura 7. Murganhos infectados com PbNK65 não desenvolvem MC ao dia 6-7 p.i., acabando por morrer durante a terceira semana de infecção, com hiperparasitêmia. **(a, b)** Percentagem de sobrevivência de murganhos infectados com PbA (n=7) ou PbNK65 (n=3). **(b)** Parasitêmia média de murganhos infectados PbNK65 aos dias 7 (n=4), 14 (n=6) e 21 (n=2) p.i.. As áreas sombreadas indicam o momento em que os murganhos apresentam os sintomas de MC.

Neste trabalho, começou-se por comparar o número de leucócitos acumulados no cérebro dos murganhos sem MC (SMC) infectados com PbNK65 (dia 7 p.i.) com os murganhos infectados com PbA mostrando sinais neurológicos de MC (dias 6-7 p.i.). Surpreendentemente, o número total de leucócitos no cérebro aumentou em ambos os modelos, murganhos infectados com PbA ou PbNK65, apesar de apenas os primeiros desenvolverem MC (Figura 8). Tal facto levou-nos a analisar mais detalhadamente as diferenças desta população sequestrada no cérebro nos dois modelos.

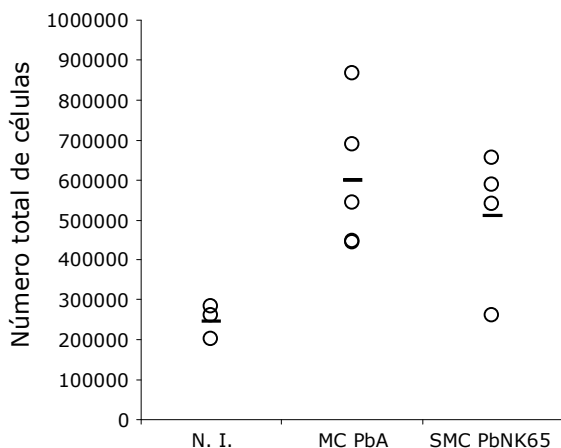


Figura 8. O número total de leucócitos aumenta tanto nos cérebros de murganhos infectados com PbNK65 como nos infectados com PbA, ao dia 6-7. Os leucócitos foram isolados, após perfusão i.c., a partir de cérebros de murganhos não infectados (n=4), murganhos infectados com PbA mostrando sintomas neurológicos (n=5) ou murganhos infectados com PbNK65 (n=4) ao dia 7 p.i. e analisados por citometria de fluxo. Os resultados são representativos de pelo menos 3 experiências independentes. Cada símbolo representa um murganho individual e as barras horizontais representam a média de cada grupo.

Utilizando a citometria de fluxo e baseado na expressão relativa de CD45 e CD11b (Ford *et al.*, 1995), foi possível demonstrar que a microglia (CD45⁺CD11b⁺) apresentava sinais de activação revelados através do aumento da expressão de MHC classe I nos dois modelos, quando comparados com murganhos não infectados (NI) (Figura 9a). Por outro lado, a proporção de macrófagos e células T também aumentou (Figura 8b), em particular o número total de células CD8⁺ aumentou significativamente em ambos os modelos de infecção (Figura 9c). Cerca de 98% destas células CD8⁺ eram positivas para CD3 ou TCRαβ, nos dois modelos, o que confirma o facto de serem células T (resultados não mostrados).

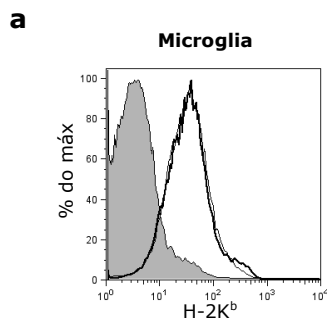
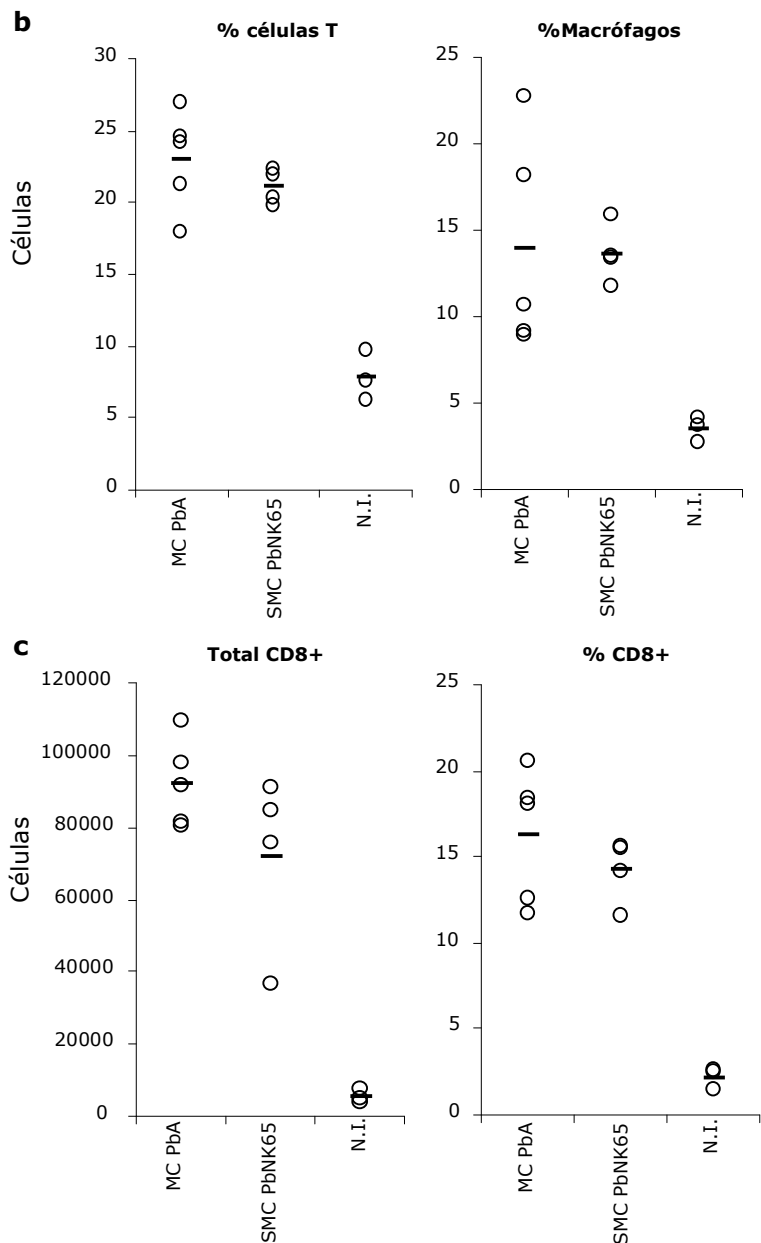


Figura 9. As células T CD8⁺ acumulam-se no cérebro de murganhos C57Bl/6 sem MC (SMC) infectados com PbNK65. Os leucócitos foram isolados, após perfusão i.c., a partir de cérebros de murganhos não infectados (n=3), murganhos infectados com PbA mostrando sintomas neurológicos (n=5) ou murganhos infectados com PbNK65 ao dia 7 p.i. (n=4) e analisados por citometria de fluxo. Os resultados são representativos de pelo menos 3 experiências independentes. **(a)** O histograma corresponde à análise de citometria de fluxo para a expressão da molécula MHC classe I presente nos murganhos C57Bl/6 (H-2K^b) na microglia (definida como células CD45⁺CD11b⁺) em murganhos não infectados (histograma sombreado), infectados com PbA (linha normal) ou com PbNK65 (linha grossa). O eixo horizontal representa a intensidade da fluorescência em unidades arbitrárias. **(b, c)** Percentagem ou número total de macrófagos (definidos como CD45⁺CD11b⁺), linfócitos (definidos como CD45⁺CD11b⁻) e células T CD8⁺ isoladas a partir de cérebros de murganhos infectados ou não. Cada símbolo representa um murganho individual e as barras horizontais representam a média de cada grupo.



De seguida perguntámo-nos se o estado de activação das células T CD8⁺ acumuladas no cérebro era idêntico nos dois modelos de infecção. Verificámos que, em ambas as infecções dos parasitas, quase todas as células T CD8⁺ expressam CD44 (Figura 10a) na sua superfície e têm um fenótipo CD62-L^{low} (Figura 10b), ambos indicadores de um estado de activação das células. Contrariamente, as células T CD8⁺ que expressam CD69 e CD11c (um marcador de activação expresso em certas subpopulações de células T CD8⁺ activadas (Huleatt e Lefrancois, 1995), não aumentaram tanto nos murganhos infectados com PbNK65 comparativamente com os infectados com PbA e com sintomas de MC (MIF= 20,5±8,2 vs 62,6±11,4) (Figura 10a e b). De modo a medir o potencial de citotoxicidade das células T CD8⁺ quantificámos o IFN-γ (após estimulação *in vitro*) e a Granzima B (GranzB) intracelulares. Verificámos que, em ambos os modelos, a percentagem de células GranzB⁺ dentro da população de células T CD8⁺IFN-γ⁺ é significativamente maior do que dentro da população de células T CD8⁺IFN-γ⁻ (resultados não mostrados). Contudo, apesar da frequência de células T CD8⁺ que são GranzB⁺ ser significativamente mais baixa nos murganhos infectados com PbNK65 do que nos infectados com PbA, a proporção de células T CD8⁺ que segregam IFN-γ é muito idêntico em ambos os modelos (Figura 10a).

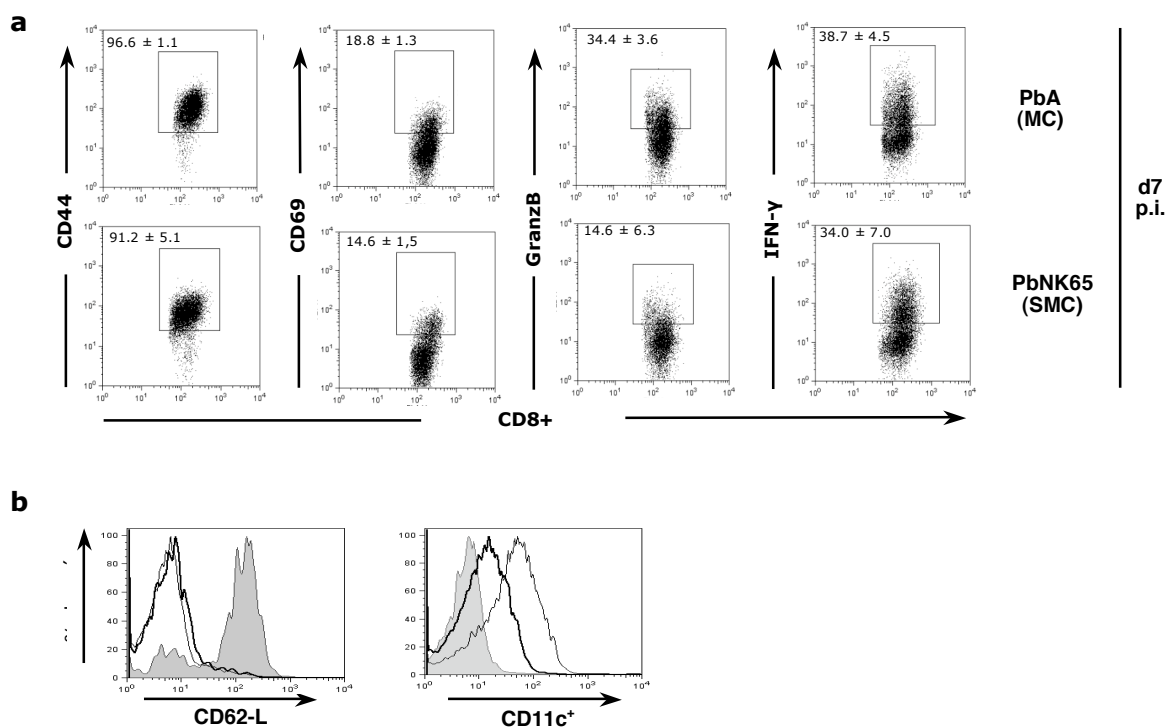


Figura 10. As células T CD8⁺ acumulam-se no cérebro de murganhos C57Bl/6 sem MC (SMC) infectados com PbNK65. Os leucócitos foram isolados, após perfusão i.c., a partir de cérebros de murganhos não infectados (n=3), murganhos infectados com PbA mostrando sintomas neurológicos (n=5) ou murganhos infectados com PbNK65 ao dia 7 p.i. (n=4) e analisados por citometria de fluxo. Os resultados são representativos de pelo menos 3 experiências independentes. **(a, b)** Os gráficos de pontos e os histogramas correspondem à análise da expressão de marcadores de activação, dentro da população de células CD8⁺. Os números nos gráficos de pontos representam a percentagem (média ± desvio padrão) da subpopulação indicada. Os histogramas correspondem à expressão de CD62-L ou CD11c nas células T CD8⁺ de murganhos não infectados (histograma sombreado), infectados com PbA (linha normal) ou com PbNK65 (linha grossa).

Adicionalmente, quisemos saber se as células T CD8⁺ continuam presentes no cérebro de murganhos infectados com PbNK65, depois do dia 7 de infecção. Verificámos que quantidades idênticas de células T CD8⁺, apresentando um estado activado (resultados não mostrados), são observadas mais tarde nos cérebros (dia 14 p.i.) e mantêm-se até ao dia em que os murganhos morrem com hiperparasitémia, cerca do dia 21 (Figura 11).

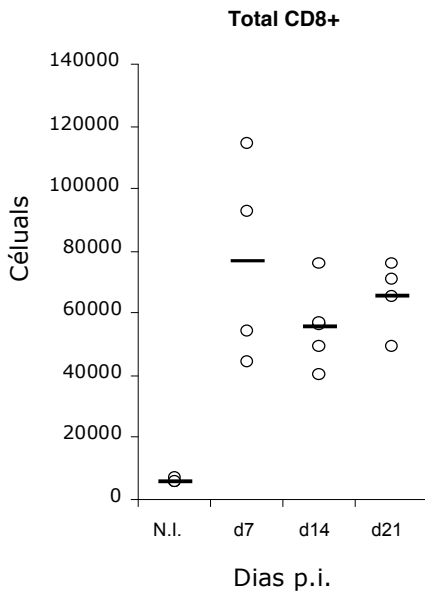


Figura 11. Número total de células T CD8⁺ isoladas a partir de cérebros de murganhos não infectados (N.I., n=5) e infectados com PbNK65 aos dias 7 (n=4), 14 (n=5) e 21 (n=4) p.i.. Cada símbolo representa um murganho individual e as barras horizontais representam a média de cada grupo. Os leucócitos foram isolados, após perfusão i.c., a partir de cérebros de murganhos não infectados (n=3), murganhos infectados com PbA mostrando sintomas neurológicos (n=5) ou murganhos infectados com PbNK65 ao dia 7 p.i. (n=4) e analisados por citometria de fluxo. Os resultados são representativos de pelo menos 3 experiências independentes.

Estes resultados sugerem que a sequestração de células T CD8⁺ activadas no cérebro de murganhos infectados com *Plasmodium* pode não ser suficiente, apesar de necessária, para induzir o início de MC.

2.2. A acumulação de células T CD8⁺ no cérebro não está correlacionada com a perda de integridade da BHE

A quebra da BHE e a acumulação de células T CD8⁺ no cérebro têm sido associadas com o desenvolvimento da MC experimental. Questionámo-nos então se a presença de células T CD8⁺ activadas no cérebro, de murganhos que não desenvolvem MC, poderia ser suficiente para induzir a quebra da BHE. Tal como anteriormente descrito, observou-se que a permeabilidade da BHE aumenta nos murganhos em MC infectados com PbA, fenómeno que se verifica através do aumento significativo ($P < 0,05$) da acumulação de Azul de Evans no tecido cerebral nesses murganhos, quando comparados com os controlos não infectados (Figura 11). Em contraste, não se verificou qualquer extravasão de Azul de Evans nos murganhos infectados com PbNK65 (Figura 12), apesar da acumulação de células T CD8⁺ nos seus cérebros (Figura 9c e 11).

Tais resultados sugerem que a integridade da BHE não fica comprometida em animais que não desenvolvem MC, apesar da acumulação de células T CD8⁺ nos seus cérebros. Desta forma, não existe qualquer relação entre a acumulação destas células e a perda de integridade da BHE.

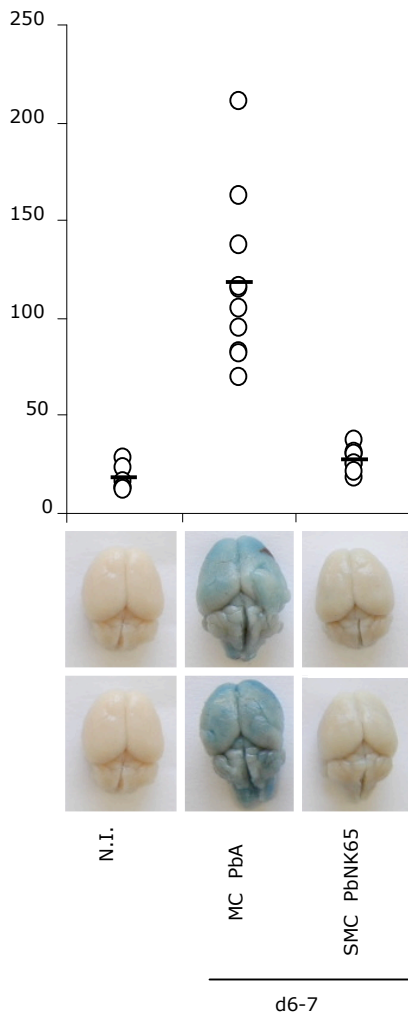


Figura 12. Murganhos C57Bl/6 infectados com PbNK65 não se verifica a quebra da BHE, ao dia 7 p.i.. A quebra da BHE foram medidas em cérebros de murganhos depois de perfusão i.c.. A quebra vacular da BHE foi medida através da quantificação de corante Azul de Evans no tecido cerebral e é apresentada como µg Azul de Evans por g de tecido cerebral.

2.3. A sequestração de Gvp no cérebro não é necessária para a acumulação de células T CD8⁺ nos murganhos infectados com PbNK65

Na sequência dos resultados anteriores, colocámos a hipótese de que, adicionalmente às células T CD8⁺, a sequestração de Gvp no cérebro é fundamental para o desenvolvimento de MC, apesar de não ser necessário para induzir a migração/sequestração das células T CD8⁺ para o cérebro.

De forma a testar esta possibilidade, quantificámos por *qRT-PCR* a quantidade de parasita sequestrado no cérebro de murganhos infectados. Os infectados por PbA com sintomas de MC (dia 6-7 p.i.) demonstraram ter uma quantidade significativamente mais elevada ($P < 0,05$) de parasita quando comparada com os murganhos infectados com PbNK65, no mesmo dia de infecção (Figura 13). Estes resultados não devem ser o reflexo da parasitemia circulante tendo em conta que a quantidade de parasita no sangue é apenas um pouco menor nos infectados com PbNK65 (Figura 7b). Para além disso, as células circulantes do sangue foram lavadas por perfusão i.c. antes da remoção do cérebro.

Resumindo, estes resultados sugerem que a sequestração do parasita é crítica para o desenvolvimento da patologia, mas não é necessária para a sequestração das células T CD8⁺.

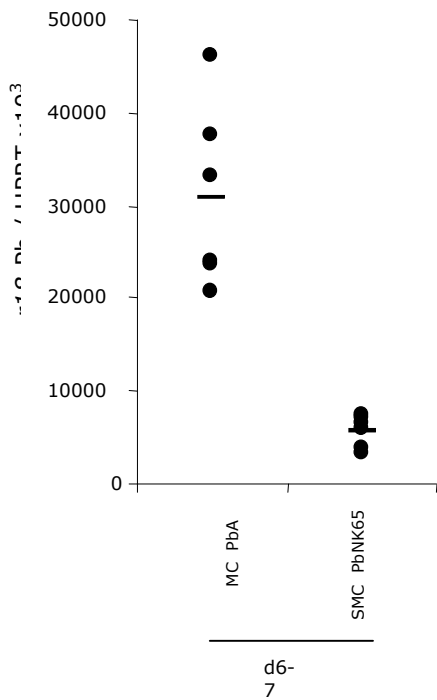


Figura 13. Murganhos C57Bl/6 infectados com PbNK65 não sequestram parasita no cérebro, ao dia 7 p.i.. A quantificação de parasita foram medidas em cérebros de murganhos depois de perfusão i.c.. A expressão no cérebro de mRNA foi quantificada por qRT-PCR e é apresentada como o número médio de moléculas de mRNA *r18S* de parasita por mRNA *Hprt* ($\times 10^3$).

2.4. Os murganhos infectados com PbA e tratados, ao dia 5 p.i., com antimaláricos não desenvolvem MC nos dias seguintes

Para confirmar a importância da sequestração dos GVP no desenvolvimento da MC em ratinho sinfectados com PbA, utilizando um outro modelo experimental, o qual consiste em murganhos C57BL/6 infectados com PbA e tratados com um antimalárico, Pirimetamina (Pyr), ao dia 5 p.i., altura em que o número de células T CD8⁺ no cérebro é ainda reduzido. Quando os murganhos são tratados durante a noite com Pyr na água de beber ou por injeção i.p., cerca de 15-24h antes do início da MC, estes ficam protegidos da neuropatologia nos dias seguintes (Figura 13a). A parasitemia sanguínea diminui significativamente depois do tratamento, mas o parasita não é completamente eliminado (dados não mostrados). Alguns dias mais tarde, a parasitemia começa a aumentar novamente, e por volta do dia 14 p.i., a maioria dos murganhos tratados desenvolve MC. Os sintomas neurológicos surgem muito rápido nestes murganhos, e tal acontece apenas quando a parasitemia é equivalente aos murganhos não tratados mas infectados com PbA, ao dia 6 p.i. (Figura 14).

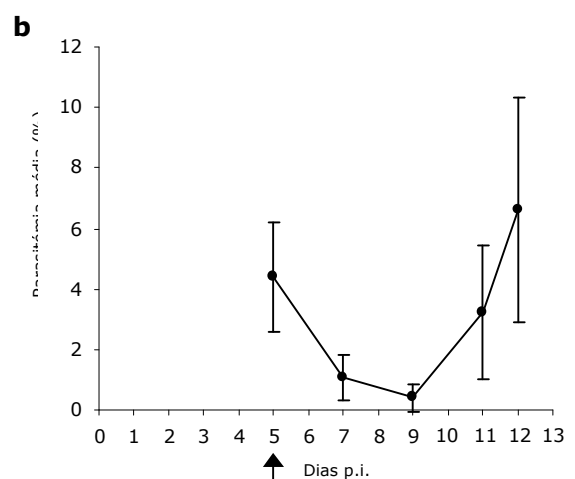
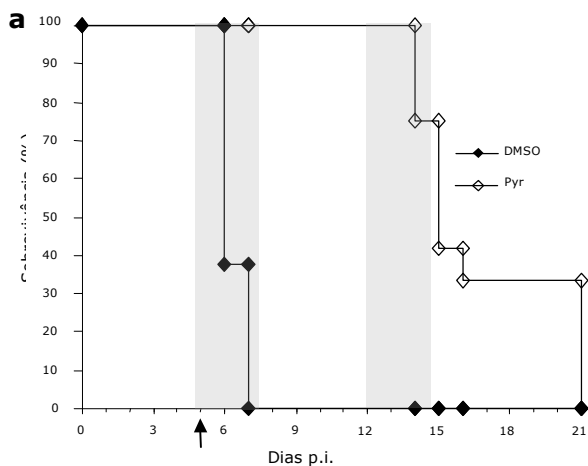


Figura 14. Murganhos C57Bl/6 infectados com PbA e tratados, ao dia 5 p.i., com antimalárico ficam protegidos da neuropatologia nos dias seguintes, desenvolvendo MC por volta do dia 14 p.i., quando a parasitemia é equivalente à do dia 6 p.i. dos murganhos infectados com PbA e tratados com DMSO, utilizados como controlo, que desenvolvem MC ao dia 6-7 p.i.. Os resultados são representativos de pelo menos 3 experiências independentes. **(a)** Percentagem de sobrevivência de murganhos infectados com PbA e tratados com DMSO (n=8) e de murganhos infectados com PbA e tratados com Pyr (n=8). As áreas sombreadas indicam o momento em que os murganhos apresentam os sintomas de MC. **(b)** Parasitemia média de murganhos infectados com PbA e tratados com CHL (n=7).

Quando os murganhos são infectados com PbA-GFP (uma linha de parasita resistente à Pyr (Franke-Fayard *et al.*, 2004)) e tratados com o antimalárico, eles não ficam protegidos da MC (Figura 15). Isto demonstra que a diminuição da parasitemia nas últimas horas, antes do desenvolvimento da patologia, é responsável pela protecção contra a MC e não um efeito secundário do antimalárico no hospedeiro.

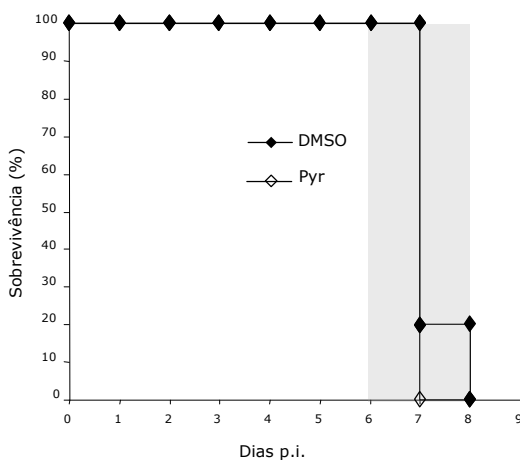


Figura 15. A protecção contra a MC de murganhos infectados com PbA conferida pelo tratamento com Pyr deve-se à diminuição de parasitemia e não a um efeito secundário do antimalárico no hospedeiro. Percentagem de sobrevivência de murganhos C57Bl/6 infectados com PbA-GFP (uma linha de parasita resistente à Pyr, Franke-Fayard, 2004) tratados com DMSO (n=4) ou Pyr (n=5) ao dia 5 p.i..

O efeito de outro antimalárico, a Cloroquina (CHL), foi também avaliado. Os murganhos injectados i.p. com uma simples dose de CHL, nas últimas 18-24 horas antes do início da MC, também mostram total protecção contra a MC. De igual forma, esses ratinhos tratados também desenvolvem a neuropatologia mais tarde, por volta do dia 14 p.i., quando a parasitemia aumenta (Figura 14b).

Estes resultados sugerem que o parasita presente nas últimas horas, imediatamente antes do aparecimento da MC, é crítico para o desenvolvimento da patologia.

2.5. Os murganhos protegidos contra a MC após tratamento com Pirimetamina continuam a acumular células T CD8⁺ no cérebro

A correlação entre a sequestração no cérebro das células T CD8⁺ e o desenvolvimento de MC nos murganhos infectados com PbA foi estabelecida num estudo recente (Belnoue *et al.*, 2002;).

Para verificar se a protecção à MC nos murganhos tratados com Pyr está associada à inibição da migração/sequestração das células T CD8⁺ no cérebro, estas células foram quantificadas e analisadas, recorrendo novamente à citometria de fluxo, no cérebro de murganhos infectados tratados ou não com Pyr. Deste modo, verificou-se que, ao dia 7 p.i., as células T CD8⁺ acumulam-se no cérebro dos murganhos tratados com Pyr, apesar

deste não apresentarem sintomas de MC (Figura 16). Tal como para os murganhos infectados com PbNK65, uma vez estas células acumuladas no cérebro elas mantêm-se sequestradas, neste caso até ao dia em que os murganhos desenvolvem MC, cerca do dia 14 p.i. (Figura 16). No entanto, será necessário repetir estes ensaios tendo em conta o reduzido número de murganhos, e a grande amplitude entre os valores obtidos (Desvio padrão = ± 61713).

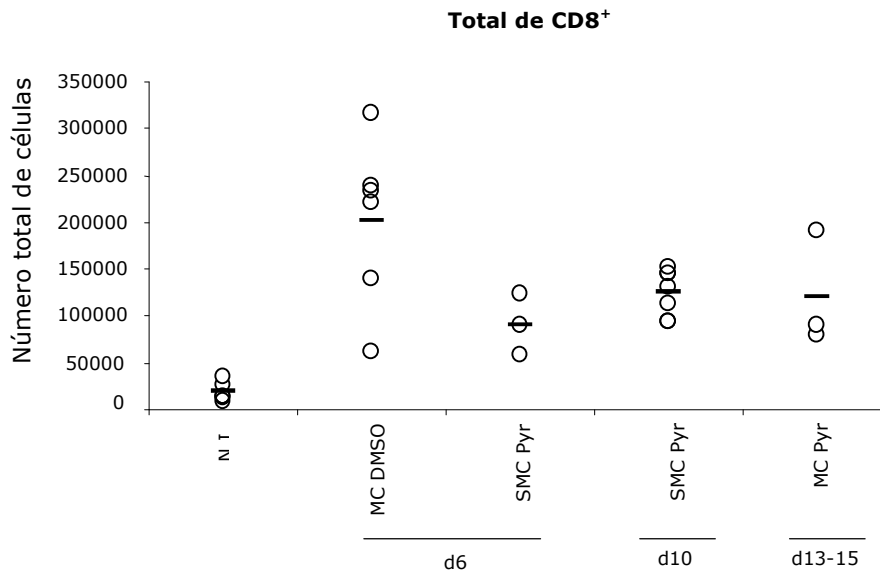


Figura 16. Murganhos C57Bl/6 infectados com PbA e tratados, ao dia 5 p.i., com um antimalárico, a Pirimetamina (Pyr), ficam protegidos da neuropatologia (SMC Pyr) nos dias seguintes, desenvolvendo MC por volta do dia 14 p.i. (MC Pyr), quando a parasitemia é equivalente à do dia 6 p.i. dos murganhos infectados com PbA e tratados com DMSO, utilizados como controlo, que desenvolvem MC ao dia 6-7 p.i. (MC DMSO). Os resultados são representativos de pelo menos 3 experiências independentes. Número total de células T CD8⁺ isoladas, após perfusão i.c., a partir de cérebros de murganhos C57Bl/6 não infectados (N.I.) (n=6); MC DMSO, ao dia 6 p.i. (n=6); SMC Pyr, ao dia 6 p.i. (n=3) e ao dia 10 (n=7) e MC Pyr ao dia 13-15 (n=3). Cada símbolo representa um murganho individual e as barras horizontais representam a média de cada grupo.

De seguida analisámos o estado de activação das células T CD8⁺ acumuladas no cérebro dos murganhos infectados e tratados ou não. Verificámos que as células T CD8⁺ dos cérebros de tratados com Pyr expressam marcadores de activação à sua superfície ao dia 6-7 p.i., mas a proporção destas células não aumentou tanto quanto as dos murganhos sem tratamento e com sinais da neuropatologia. No entanto, a expressão aumenta ao longo do tempo de infecção. O mesmo acontece quando quantificámos o IFN- γ (após estimulação *in vitro*) e a GranzB intracelulares. Porém, é necessário efectuar mais ensaios com estes modelos de tratamento, e por isso os dados não são mostrados.

Estes resultados sugerem mais uma vez, que a sequestração das células T CD8⁺ no cérebro, apesar de necessária, não é suficiente para induzir os sinais neurológicos da MC.

2.6. A sequestração de parasita no cérebro está correlacionada com o desenvolvimento de MC nos murganhos tratados com Pirimetamina

Correlacionado com o desenvolvimento ou não de MC, não foi observada extravasão de Azul de Evans ao dia 6-7 p.i. nos murganhos infectados com PbA e tratados com Pyr,

contrariamente com o observado nos murganhos controlo para o tratamento, infectados com PbA e com sinais de MC (Figura 17b). Contudo, foi observado um aumento de permeabilidade, ao dia 14 p.i., no cérebro de murganhos infectados com PbA e tratados com Pyr, que se encontravam numa fase terminal da neuropatologia (Figura 17b).

A quantidade de parasita sequestrada no cérebro aumenta significativamente ao dia 6 de infecção nos murganhos utilizados como controlo para o tratamento mostram claramente sintomas de MC, relativamente aos animais no dia 5 de infecção (momento do tratamento com Pyr). Contudo, nenhum aumento da quantidade de parasita foi observado nos murganhos tratados com Pyr ao dia 6 p.i. (Figura 17a). Na realidade, existe mesmo uma pequena diminuição da quantidade de parasita, quando comparada com o dia 5 p.i..

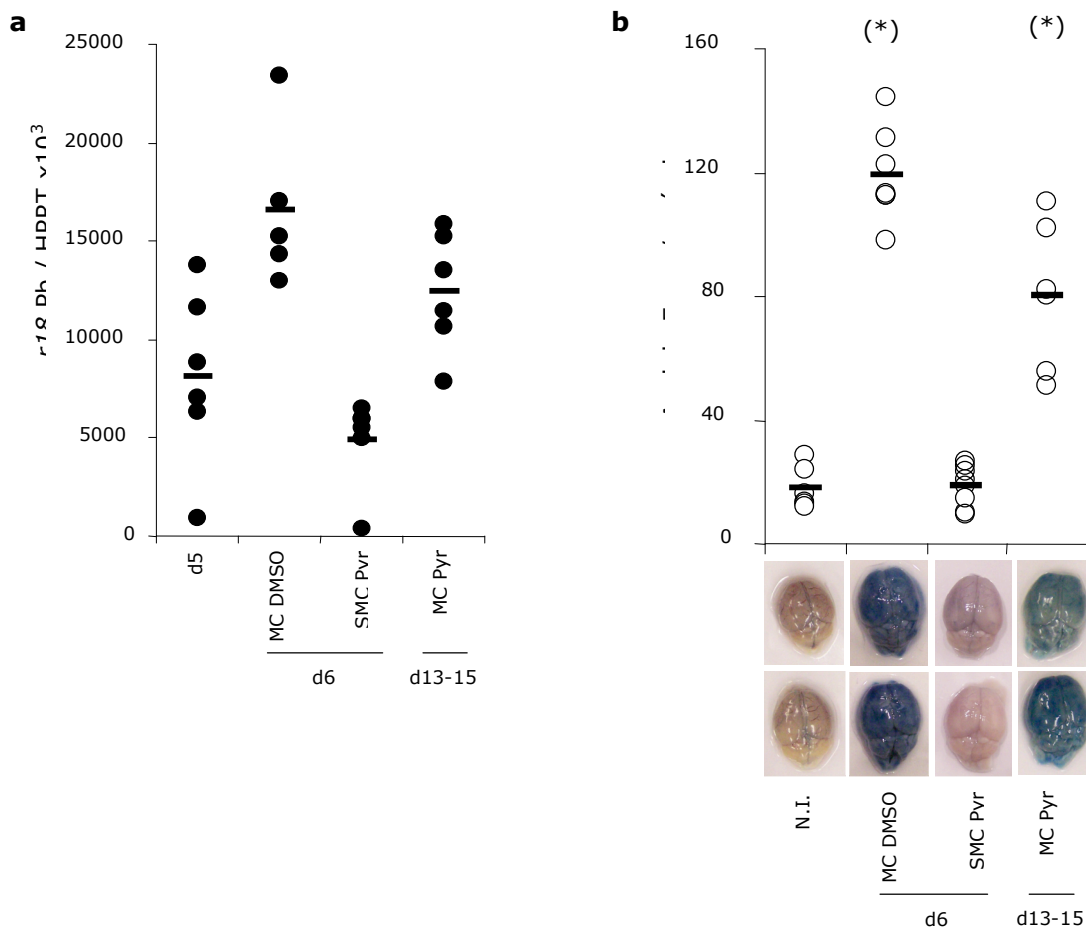


Figura 17. A sequestração de parasita no cérebro está correlacionada com o desenvolvimento de MC nos murganhos tratados com Pirimetamina **(a)** A expressão no cérebro de mRNA foi quantificada por *qRT-PCR* e é apresentada como o número médio de moléculas de mRNA *r18* de parasita por mRNA *Hprt* ($\times 10^3$). **(b)** A quebra vascular ao nível da BHE foi medida através da quantificação de corante Azul de Evans no tecido cerebral, depois da perfusão i.c. dos murganhos. As diferenças significativas ($P < 0,05$) estão indicadas com (*).

Estes resultados sugerem que a sequestração do parasita no cérebro nas últimas horas, imediatamente antes do início da MC, é crítico para o desenvolvimento da patologia, mas não para a sequestração das células T CD8⁺ no cérebro.

CAPÍTULO III

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O conhecimento dos mecanismos exactos que contribuem para a patogénese da MC é crucial para o desenvolvimento de intervenções clínicas mais eficientes.

A sequestração de GVP e leucócitos, predominantemente células T CD8⁺, no cérebro (Belnoue et al, 2002; Yañez et al, 1996, Berendt et al, 1994) e a resposta inflamatória originada pela infecção por *Plasmodium spp*, pensa-se serem os dois factores principais envolvidos na patogénese da malária cerebral (Clark e tal, 1994).

Investigar os mecanismos que levam ao desenvolvimento dos sintomas de MC nos humanos é complexo, pois o estudo em humanos impõe algumas barreiras éticas e sociais, sendo difícil a obtenção de resultados. Torna-se então importante a utilização de modelos animais experimentais e que estes sejam similares à MC humana de forma a entender os mecanismos que levam à patologia e ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. No entanto, até à data não existe qualquer modelo que mimetize a neuropatologia, havendo mesmo estudos que sugerem a existência de diferenças entre a MC humana e a experimental, diferenças essas relacionadas com a sequestração de células no cérebro. Ao contrário do observado nos humanos, cujas células acumuladas no cérebro são maioritariamente GVP, nos modelos murinos a sequestração é predominantemente de leucócitos (Belnoue et al., 2002).

Sabe-se agora que as células T CD8⁺ activadas são sequestradas no cérebro imediatamente antes do desenvolvimento dos sintomas neurológicos e que a sua presença é totalmente necessária para o desenvolvimento da MC nos murganhos (Réria et al., 2006; Belnoue et al, 2002; Bagot et al, 2004). O estado de activação é traduzido na segregação de IFN- γ , uma citocina conhecida como sendo um mediador de MC (Amani et al., 2000; Hunt et al., 2003), e estas células parecem actuar via citotoxicidade mediada pela Perforina (Nitcheu et al., 2003; Potter et al., 2006). No entanto, a contribuição parcial da sequestração dos GVP nos modelos murinos bem como a sua interdependência com as células T CD8⁺ sequestradas não é bem conhecida, sendo necessário compreender como estes factores interactivam causando a patologia.

Com o nosso trabalho foi possível responder a essas e outras questões. Utilizando murganhos infectados com uma outra linha de *P. berghei* (PbNK65), a qual não induz a MC, verificámos que a acumulação de células T CD8⁺ no cérebro desses murganhos, tal como acontece nos murganhos infectados com PbA que desenvolvem MC, apesar de ser uma acumulação sensivelmente inferior. Uma explicação poderá ser que mesmo que haja um aumento dramático no infiltrado de células T CD8⁺ activadas no cérebro de murganhos infectados com PbNK65, estas serão quantitativamente insuficientes para desenvolver a patologia cerebral. Por outro lado, estas células também se acumulam no cérebro de murganhos infectados com PbA que se encontram protegidos contra a MC, através de tratamento com antimaláricos.

Curiosamente, ocorre uma *up-regulation* na expressão de CD11c nestas células CD8⁺CD3⁺ (células T CD8⁺) acumuladas no cérebro desses ratinhos infectados com PbNK65. Com excepção dos linfócitos CD8⁺ do epitélio intestinal (Huleatt e Lefrancois, 1995), a expressão de CD11c não é normalmente descrita para as células T CD8⁺. Por conseguinte, esta observação é

de algum modo interessante pois em estudos anteriores (Klonowski KD, Immunity 2004) já foi proposto que a dinâmica de entrada e retenção de células de memória efectoras no cérebro e na lâmina própria intestinal é diferente, comparativamente a todos os outros tecidos periféricos. Por exemplo, a expressão no cérebro é de 84% contra os 41% e 63% expressos no sangue e baço, respectivamente. Por outro lado, estas células T CD8⁺CD11c⁺ também se acumulam no cérebro de murganhos infectados com PbA que se encontram protegidos contra a MC, através de tratamento com antimaláricos.

A administração rápida de antimaláricos no início dos sintomas neurológicos é responsável pela sobrevivência da maioria das crianças (cerca de 80%), enquanto que os restantes 20% continuam a morrer de MC (Newton e Krishna 1998). Para os últimos, é importante encontrar uma terapia adicional que tenha como alvo outros contribuidores para a patogénese, enquanto que a terapia antiparasita mata o parasita circulante, na fase eritrocítica. Para tal, é fundamental entender os eventos tardios implicados na patogénese.

Resumindo, com este trabalho foi possível determinar que a migração de células T CD8⁺ para o cérebro, numa fase tardia da infecção, é necessária, mas não suficiente, para o desenvolvimento da neuropatologia. Deste modo, o antigénio do parasita não é essencial para a migração cerebral das células T CD8⁺ patogénicas, o que não exclui o papel das citocinas no seu recrutamento a partir da circulação. Também foi observado que a presença do parasita no cérebro nesta fase tardia poderá ser um cofactor essencial para o desenvolvimento da MC, mas a sua sequestração no cérebro não é necessária à migração/sequestração das células T. Isto não significa que os GVp por PbA não utilizem os mesmos ligandos, que as células T CD8⁺, para serem sequestrados no cérebro. Deste modo, os resultados sugerem que o desenvolvimento de MC experimental é um resultado da conjugação de dois factores: presença no cérebro de células T CD8⁺ e de parasita.

Ou o parasita não se liga aos mesmos ligandos

Por último, a relevância dos modelos murinos para a MC humana tem sido questionada. No entanto, os resultados apresentados neste trabalho sugerem que o modelo murino clássico de MC (murganhos C57BL/6 infectados com PbA) é muito mais idêntico à situação humana do que tem sido pensado.

CAPÍTULO IV

PERSPECTIVAS FUTURAS

Tendo em conta o aumento substancial da parasitemia no sangue dos murganhos infectados com PbNK65 ao longo da infecção, até à sua morte, seria interessante observar o que acontece à quantidade de parasita sequestrada nos cérebros destes murganhos aos dias 21 p.i. (dia correspondente ao momento imediatamente antes dos murganhos deste modelo morrerem com hiperparasitemia, sem mostrar quaisquer sintomas de MC) e 14 p.i. (dia intermédio em termos de parasitemia). Para tal será então necessário proceder à quantificação do PbNK65, por *qRT-PCR*, no cérebro deste modelo de infecção, nos dias 6-7, 14 e 21 p.i., comparando-os com os resultados obtidos para o modelo murino clássico de MC.

Segundo Rénia *et al*, as células endoteliais da microvasculatura cerebral desempenham um papel na neuropatologia, participando como células apresentadoras de antigénio para as células T CD8⁺, no contexto do MHC classe I. Segundo esta hipótese, a partir desse momento, as células T activadas induzirão a apoptose das células endoteliais dos microvasos cerebrais, levando à perda de integridade da BHE (Rénia *et al*, 2006). Numa primeira fase, tornar-se-á importante determinar a activação das células endoteliais, detectando ICAM / VCAM no cérebro. Para tal, o protocolo de purificação destas células a partir de cérebros de murganhos infectados com PbA terá de ser optimizado pois, até ao momento, não existem referências de como o fazer, sem que estas percam a sua integridade. Numa segunda fase, utilizando murganhos KO para a Caspase 3, tentaremos investigar o fenómeno da apoptose das células endoteliais. A citotoxicidade das células T CD8⁺ irá ser estudada em células T CD8⁺ purificadas a partir de cérebro de murganhos infectados, em ensaios de citotoxicidade *in vitro*.

Num estudo recente confirmou-se a importância da acumulação de heme livre na circulação sanguínea para a susceptibilidade do hospedeiro à MC (Pamplona *et al.*, 2007). Apesar do heme parecer estar implicado numa fase anterior à acumulação das células T CD8⁺ e dos GVP no cérebro, não deixa de ser interessante saber o que se passa nos cérebros dos nossos modelos de infecção. Para tal, a quantificação de heme livre na circulação sanguínea dos murganhos infectados com PbNK65 e dos infectados com PbA mas tratados com antimaláricos já começou a ser feita pelo nosso grupo, mas os resultados ainda não são conclusivos, e por isso não foram incluídos nesta dissertação.

REFERÊNCIAS

- Amani V, Vigário AM, Belnoue E, Marussig M, Fonseca L, Mazier D, Rénia L. (2000). Involvement of IFN-gamma receptor-mediated signaling in pathology and anti-malarial immunity induced by *Plasmodium berghei* infection. *Eur J Immunol.* **30**(6):1646-55.
- Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischeknecht F e Ménard R (2006). Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nature Medicine.* **12**(2):220-224
- Angelika S, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok J-M, Menard R e Heussler VT (2006). Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. *Science.* **313**(5791):1287- 1290
- Arav-Boger R e Shapiro TA (2005). Molecular mechanisms of resistance in antimalarial chemotherapy: the unmet challenge. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**:565-85
- Artavanis-Tsakonas K. Tongren JE e Ridley EM (2003). The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clinical & Experimental Immunology.* **133**(2):145-152
- Bagot S, Nogueira F, Collette A, do Rosário V, Lemonier F, Cazenave PA e Pied S (2004). Comparative Study of brain CD8⁺ T cells induced by sporozoites and those induced by blood-stage *Plasmodium berghei* ANKA involved in the development of cerebral malaria. *Infect. Immun.* **72**(5):2817-2826
- Baird JK e Rieckmann KH (2003). Can primaquine therapy for *vivax* malaria be improved? *Trends Parasitol.* **19**(3):115-120
- Baird JK, Fryauff DJ e Hoffman SL (2003). Primaquine for prevention of malaria in travelers. *Clin Infect. Dis.* **37**(12):1659-1667
- Bannister LH, Hopkins JM, Fowler RE, Krishna S e Mitchell GH (2000). A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitol. Today* **16**(10):427-33
- Baratin M, Roetyncq S, Lépolard C, Falk C, Sawadogo S, Uematsu S, Akira S, Ryffel B, Tiraby JG, Alexopoulou L, Kirschning CJ, Gysin J, Vivier E e Ugolini S (2005). Natural killer cell and macrophage cooperation in MyD88-dependent innate responses to *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **102**(41):14747-14752
- Barradell LB, Fitton A (1995). Artesunate. A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of malaria. *Drugs.* **50**(4):714-741
- Beare NA, Southern C, Chalira C, Taylor TE, Molyneux ME e Harding SP (2004). Prognostic significance and course of retinopathy in children with severe malaria. *Arch. Ophthalmol.* **122**(8):1141-47
- Beier JC, Onyango FK, Koros JK, Ramadhan M, Ogwang R, Wirtz RA, Koech DK e Roberts CR (1991). Quantitation of malaria sporozoites transmitted in vitro during salivation by wild Afrotropical *Anopheles*. *Med Vet Entomol.* **5**(1):71-79
- Belnoue E, Kayibanda M, Vigario AM, Deschemin JC, Van Rooijen N, Viguier M, Snounou G e Renia L (2002). On the pathogenic role of brain sequestered $\alpha\beta$ CD8⁺ T cells in experimental cerebral malaria. *J Immunol.* **169**(11):6369-6375
- Berendt AR, Turner GDH e Newbold CI (1994). Cerebral malaria: the sequestration hypothesis. *Parasitol. Today* **10**(10):412-414
- Billker O, Dechamps S, Tewari R, Wenig G, Franke-Fayard B e Brinkmann V (2004). Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell.* **117**(4):503-514
- Boubou MI, Collette A, Voegtli D, Mazier D, Cazenave PA, Pied S. (1999) T cell response in malaria pathogenesis: selective increase in T cells carrying the TCR V(beta)8 during experimental cerebral malaria. *Int Immunol.* **11**(9):1553-62.

- Brake D, Long C e Weidanz W (1988). Adoptive protection against *Plasmodium chabaudi adami* malaria in athimic nude mice by cloned T cell line. J Immunology. **140**(6):1989-1993
- Brockman A, Price RN, van Vugt M, Heppner DG, Walsh D, Sookto P, Wimonwattrawatee T, Looareesuwan S, White NJ e Nosten F (2000) *Plasmodium falciparum* antimalarial drug susceptibility on the north-western border of Thailand during five years of extensive use of artesunate-mefloquine. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **94**(5): 537-544
- Bull PC, Lowe BS, Kortok M, Molyneux CS, Newbold CI e Marsh K (1998). Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. Nat Med. **4**(3):358-60
- Butcher GA, Garland T, Ajdukiewicz AB e Clark IA (1990). Serum tumor necrosis factor associated with malaria in patients in the Solomon Islands Trans R Soc Trop Med Hyg. **84**(5):658-61
- Carraz M, Jossang A, Franetich JF, Siau A, Ciceron L, Hannoun L, Sauerwein R, Frappier F, Rasoanaivo P, Snounou G, Mazier D. (2006). A Plant-Derived Morphinan as a novel lead compound against Malaria liver stages. Plos Medicine. **3**(12):e513
- Carrolo M, Giordano S, Cabrita-Santos L, Corso S, Vigario A.M, Silva S, Leirião P, Carapau D, Armas-Portela R, Comoglio PM, Rodriguez A e Mota MM (2003) Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection. Nat Med **9**(11):1363-1369
- Cavacini LA, Long CA e Weidanz WP (1986). T-cell immunity in murine malaria: adoptive transfer of resistance to *Plasmodium chabaudi adami* in nude mice with splenic T cells. Infect Immun. **52**(3):637-643
- Chen PQ, Li GQ, Guo XB, He KR, Fu YX, Fu LC e Song YZ (1994). The infectivity of gametocytes of *Plasmodium falciparum* from patients treated with artemisinin. Chin. Med. J. (Engl). **107**(9):709-711
- Clark IA e Rockett KA (1994). The cytokine theory of human cerebral malaria. Parasitol. Today **10**(10):410-412
- Clark IA, Awburn MM, Whitten RO, Harper CG, Liomba NG, Molyneux ME, Taylor TE. (2003) Tissue distribution of migration inhibitory factor and inducible nitric oxide synthase in falciparum malaria and sepsis in African children. Malar J. **2**:6. Epub.
- Clark IA, Budd AC, Alleva LM e Cowden WB (2006). Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. Malaria Journal. **5**:85
- Clark IA, Cowden WB e Rockett KA (1994). The pathogenesis of human cerebral malaria. Parasitol. Today. **10**(11):417-418
- Cowman AF e Kappe SHI (2006). Microbiology. Malaria's stealth shuttle. Science. **313**(5791):1245 - 1246
- Cunha-Rodrigues M, Prudêncio M, Mota MM e Haas W (2006). Antimalarial drugs - host targets (re)visited. Biotechnol. J. **1**(3):321-332
- Curfs JHAJ, Schetters TPM, Hermsen CC, Jerusalem CR, Van Zon AAJC e Eling WMC (1989). Immunological aspects of cerebral lesions in murine malaria Clin. Exp. Immunol. **75**(1):136-140
- Dieckmann A e Jung A (1986). The mechanism of pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*. Parasitology. **93**(Pt 2):275-278
- Djeu JY, Serbousek D e Blanchard DK (1990). Release of tumor necrosis factor by human polymorphonuclear neutrophils. Blood. **76**(7):1405-1409
- Doolan DL e Hoffman SL (2000). The complexity of protective immunity against liver-stage malaria. J Immunol. **165**(3):1453-1462

- Dvorak JA, Miller LH, Whitehouse WC e Shiroishi T (1975). Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. *Science*. **187**(4178):748-750
- Edington GM (1967). Pathology of malaria in West Africa. *Br. Med. J.* **1**(5542):715-718
- Eling WM e Kremsner PG (1994). Cytokines in malaria, pathology and protection. *Biotherapy* **7**(3-4): 211-221
- Eling WM e Sauerwein RW (1995). Severe and cerebral malaria: common or distinct pathophysiology? *Rev. Med. Microbiol.* **6**:17-25
- Ellis DS, Li ZL, Gu HM, Peters W, Robinson BL, Tovey G e Warhurst DC (1985). The chemotherapy of rodent malaria, XXXIX. Ultrastructural changes following treatment with artemisinin of *Plasmodium berghei* infection in mice, with observations of the localization of [3H]-dihydroartemisinin in *P. falciparum* *in vitro*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **79**(4):367-374
- Esparza I, Mannel D, Ruppel A, Falk W e Krammer PH (1987). Interferon γ and lymphotoxin or tumor necrosis factor act synergistically to induce macrophage killing of tumor cells and *schistosomula* or *Schistosoma mansoni*. *J Exp Med*; **166**(2): 589-594
- Esposito F, Lombardi S, Modiano D, Zavala F, Reeme J, Lamizana L, Coluzzi M e Nussenzweig RS (1988). Prevalence and levels of antibodies to the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* in an endemic area and their relationship to resistance against malaria infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **82**(6):827-832
- Fitch CD (2004). Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. *Life Sci.* **74**(16):1957-1972
- Foley M e Tilley L (1998). Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. *Pharmacol. Ther.* **79**(1):55-87
- Ford AL, Goodsall AL, Hickey WF e Sedgwick JD (1995). Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4+ T cells compared. *J. Immunol.* **154**(9):4309-4321
- Franke-Fayard B, Trueman H, Ramesar J, Mendoza J, van der Keur M, van der Linden R, Sinden RE, Waters AP e Janse CJ. (2004). A *Plasmodium berghei* reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle. *Mol Biochem Parasitol.* **137**(1):23-33
- Frevert U, Engelmann S, Zougbedé S, Stange J, Ng B, Matuschewski K, Liebes L e Yee H (2005). Intravital observation of *Plasmodium berghei* sporozoite infection of the liver. *PLoS Biol* **3**(6):e192
- Frevert U, Sinnis P, Cerami C, Shreffler W, Takacs B e Nussenzweig V (1993). Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. *Journal of Experimental Medicine* **177**(5):1287-1298
- Fry M e Beesley JE (1991). Mitochondria of mammalian *Plasmodium* spp. *Parasitology.* **102**(Pt1):17-26
- Gilbert SC, Plebanski M, Gupta S, Morris J, Cox M, Aidoo M, Kwiatkowski D, Greenwood BM, Whittle HC e Hill AV (1998). Association of malaria parasite population structure, HLA, and immunological antagonism. *Science.* **279**(5354):1173-1177
- Good MF, Berzofsky JA e Miller LH (1988). The T cell response to the malaria circumsporozoite protein: an immunological approach to vaccine development. *Annu Rev Immunol.* **6**:663-688
- Good MF, Xu H, Wykes M e Engwerda C.R. (2005). Development and regulation of cell-mediated immune responses to blood stages of malaria. *Annu. Rev. Immunol.* **23**:69- 99
- Grau GE e Wassmer S (1994). Cerebral malaria: mediators, mechanical obstruction or more? *Parasitol. Today* **10**(10):408-409

- Grau GE, Fajardo LF, Piguet PF, Allet B, Lambert P- H e Vassalli P (1987). Tumour necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science*. **237**(4819):1210–1212
- Grau GE, Heremans H, Piguet PF, Pointaire P, Lambert PH, Billiau A e Vassalli P (1989). Monoclonal antibody against interferon-gamma can prevent experimental cerebral malaria and its associated overproduction of tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**(14):5572-5574
- Grau GE, Piguet PF, Engers HD, Louis JA, Vassalli P e Lambert PH (1986). L3T4+ lymphocytes play a major role in the pathogenesis of murine cerebral malaria. *J. Immunol.* **137**(7):2348–2354
- Gu HM, Warhurst DC e Peters W (1984). Uptake of [3H]dihydroartemisinin by erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **78**(2):265–270
- Guerra CA, Snow RW e Hay SI (2006). Mapping the global extent of malaria in 2005. *Trends in Parasitology*. **22**(8):353-358
- Haldar K, Murphy SC, Milner Jr DA e Taylor TE (2007). Malaria: Mechanisms of Erythrocytic Infection and Pathological Correlates of Severe Disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2**:217–249
- Hamer PW, McGeachie JM, Davies MJ e Grounds MD (2002). Evans Blue Dye as an *in vivo* marker of myofibre damage: optimising parameters for detecting initial myofibre membrane permeability. *J. Anat.* **200**(Pt1):69–79.
- Haque A, Echchannaoui H, Seguin R, Schwartzman J, Kasper LH e Haque S (2001). Cerebral malaria in mice: interleukin-2 treatment induces accumulation of gammadelta T cells in the brain and alters resistant mice to susceptible-like phenotype. *Am. J. Pathol.* **158**(1):163–172
- Harrison T, Samuel BU, Akompong T, Hamm H, Mohandas N, Lomasney JW e Haldar K (2003). Erythrocyte G protein-coupled receptor signaling in malarial infection. *Science* **301**(5640):1734–1736
- Hearn J, Rayment N, Landon DN, Katz DR e de Souza JB (2000). Immunopathology of cerebral malaria: Morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature. *Infect. Immun.* **68**(9):5364–5376
- Hermesen CC, Crommert JVD, Fredrix H, Sayerwein RW e Eling WMC (1997). Circulating tumour necrosis factor α is not involved in the development of cerebral malaria in *Plasmodium berghei*-infected C57Bl mice. *Parasit. Immunol.* **19**(12):571–577
- Hoffman SL, Franke ED, Hollingdale MR e Druilhe P (1996). Attacking the infected hepatocyte. In *Malaria Vaccine Development: A Multiimmune Response Approach*. Edited by Hoffman SL. Washington, DC: American Society for Microbiology Press:35-76
- Hoffman SL, Goh LM, Luke TC, Schneider I, Le TP, Doolan DL, Sacchi J, de la Vega P, Dowler M, Paul C, Gordon DM, Stoute JA, Church LW, Sedegah M, Heppner DG, Ballou WR e Richie TL (2002). Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Infect Dis.* **185**(8): 1155–1164
- Hoppe HC, van Schalkwyk DA, Wiehart UI, Meredith SA, Egan J e Weber BW (2004). Antimalarial Quinolines and Artemisinin Inhibit Endocytosis in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**(7):2370–2378
- Huleatt JW e Lefrancois L (1995). Antigen-driven induction of CD11c on intestinal intraepithelial lymphocytes and CD8+ T cells *in vivo*. *J. Immunol.* **154**(11):5684-5693
- Hunt NH e Grau GE. (2003) Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol.* **24**(9):491-9.
- Hunt NH, Golenser J, Chan-Ling T, Parekh S, Rae C, Potter S, Medana IM, Miu J e Ball HJ (2006). Immunopathogenesis of cerebral malaria. *Int J Parasitol.* **36**(5):569-582
- James E (2005). Apoptosis: key to the attenuated malaria vaccine? *J Infect Dis.* **191**(10):1573–1575

- Kappe SHI, Buscaglia CA e Nussenzweig V (2004). *Plasmodium* Sporozoite Molecular Cell Biology. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **20**:29-59
- Kaul DK, Nagel RL, Llena JF e Shear HL (1994). Cerebral malaria in mice: demonstration of cytoadherence of infected red blood cells and microrheologic correlates. Am. J. Trop. Med. Hyg. **50**(4):512-521
- Klonowski KD, Williams KJ, Marzo AL, Lingenheld EG, Lefrançois L. (2004) Dynamics of blood-borne CD8 memory T cell migration in vivo. Immunity. **20**(5):551-62.
- Kossodo S e Grau GE (1993). Profiles of cytokine production in relation with susceptibility to cerebral malaria. J. Immunol. **151**(9):4811-4820
- Kumar S e Miller LH (1990). Cellular mechanisms in immunity to blood stage infection. Immunol Lett. **25**(1-3):109-114
- Kuschnaroff LM, Overbergh L, Sefriouni H, Sobis H, Vandeputte M e Waer M (1999). Effect of staphylococcal enterotoxin B injection on the development of experimental autoimmune encephalomyelitis: influence of cytokine and inducible nitric oxide synthase production. J. Neuroimmunol. **99**(2):157-168
- Lackner P, Beer R, Helbok R, Broessner G, Engelhardt K, Brenneis C, Schmutzhard E e Pfaller K (2006). Scanning electron microscopy of the neuropathology of murine cerebral malaria. Malaria Journal. **5**:116
- Lauer S, VanWye J, Harrison T, McManus H, Samuel BU, Hiller NL, Mohandas N e Haldar K (2000). Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection. EMBO J. **19**(14):3556-3564
- Leiriao P, Mota MM e Rodriguez A (2005). Apoptotic *Plasmodium* - infected hepatocytes provide antigens to liver dendritic cells. J Infect Dis. **191**(10):1576-1581
- Luty AJ, Perkins DJ, Lell B, Schmidt-Ott R, Lehman LG, Luckner D, Greve B, Matousek P, Herbich K, Schmid D, Weinberg JB e Kreamsner PG (2000). Low interleukin-12 activity in severe *Plasmodium falciparum* malaria. Infect Immun. **68**(7):3909-3015
- Mackenzie CD, Grau GE, Carr RA, Liomba NG, Molyneux ME, Taylor TE. (1999). Intravascular leukocytes in the brain in Malawian children with fatal malaria. Am. J. Trop. Med Hyg. **61**: 476.
- McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM e Kwiatkowski D (1994). Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. Nature. **371**(6497):508-510
- Meis JF, Verhave JP, Brouwer A e Meuwissen JH (1985). Electron microscopic studies on the interaction of rat Kupffer cells and *Plasmodium berghei* sporozoites. Z Parasitenkd **71**(4): 473-483
- Meshnick SR (2002). Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. Int. J. Parasitol. **32**(13):1655-1660
- Miller LH, Baruch DI, Marsh K e Doumbo OK (2002). The pathogenic basis of malaria. Nature. **415**(6872):673-679
- Milner DAJ, Liomba NG, Molyneux ME e Taylor TE (2005). Sampling of supraorbital brain tissue after death: improving on the clinical diagnosis of cerebral malaria. J. Infect. Dis. **191**(5):805-808
- Mota MM, Hafalla JC e Rodriguez A (2002). Migration through host cells activates *Plasmodium* sporozoites for infection. Nat. Med. **8**(11):1318-1322
- Mota MM, Jarra W, Hirst E, Patnaik PK e Holder AA (2000). *Plasmodium chabaudi*-infected erythrocytes adhere to CD36 and bind to microvascular endothelial cells in an organspecific way. Infect. Immun. **68**(7):4135-4144
- Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, Nussenzweig V e Rodríguez A (2001). Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. Science. **291**(5501):141-144

- Murphy SC, Samuel BU, Harrison T, Speicher KD, Speicher DW, Reid ME, Prohaska R, Low PS, Tanner MJ, Mohandas N e Haldar K (2004). Erythrocyte detergent-resistant membrane proteins: their characterization and selective uptake during malarial infection. *Blood*. **103**(5):1920–1928
- Nagao E, Seydel KB e Dvorak JA (2002). Detergent-resistant erythrocyte membrane rafts are modified by a *Plasmodium falciparum* infection. *Exp. Parasitol.* **102**(1):57–59
- Nardin E, Zavala F, Nussenzweig V, Nussenzweig RS (1999). Pre-erythrocytic malaria vaccine: mechanisms of protective immunity and human vaccine trials. *Parasitologia* **41**(1-3):397–402
- Neill AL e Hunt NH (1992). Pathology of fatal and resolving *Plasmodium berghei* cerebral malaria in mice. *Parasitology* **105**(Pt2):165–175
- Newbold CI, Craig AG, Kyes S, Berendt AR, Snow RW, Peshu N e Marsh K (1997). PfEMP1, polymorphism and pathogenesis. *Ann Trop Med Parasitol.* **91**(5):551–557
- Newton CR, Krishna S. (1998) Severe falciparum malaria in children: current understanding of pathophysiology and supportive treatment. *Pharmacol Ther.* **79**(1):1–53.
- Nitcheu J, Bonduelle O, Combadiere C, Tefit M, Seilhean D, Mazier D e Combadiere B (2003). Perforin-dependent brain-infiltrating cytotoxic CD8+ T lymphocytes mediate experimental cerebral malaria pathogenesis. *J. Immunol.* **170**(4):2221–2228
- Nussenzweig V e Nussenzweig RS (1989). Rationale for the development of an engineered sporozoite malaria vaccine. *Adv Immunol.* **45**:283–334
- Ono T, Tadakuma T e Rodriguez A (2007). *Plasmodium yoelii yoelii* 17XNL constitutively expressing GFP throughout the life cycle. *Experimental Parasitology.* **115**(3):310–313
- Østensen ME, Thiele DL, Lipsky PE (1987). Tumor necrosis factor- α enhances cytolytic activity of human natural killer cells. *J Immunol.* **138**(12):4185–91
- Pamplona A, Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Epiphanyo S, Chora A, Rodrigues CD, Gregoire IP, Cunha-Rodrigues M, Portugal S, Soares MP e Mota MM (2007). Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nat. Med.* **13**(6):703–710
- Pasquetto V, Fidock DA, Gras H, Badell E, Eling W, Ballou WR, Belghiti J, Tartar A e Druilhe P (1997). *Plasmodium falciparum* sporozoite invasion is inhibited by naturally acquired or experimentally induced polyclonal antibodies to the STARP antigen. *Eur J Immunol.* **27**(10):2502–2513
- Patnaik JK, Das BS, Mishra SK, Mohanty S, Satpathy SK e Mohanty D (1994). Vascular clogging, mononuclear cell margination, and enhanced vascular permeability in the pathogenesis of human cerebral malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **51**(5):642–647
- Perlmann P e Troye-Blomberg M (2002). Malaria and the Immune System in Humans. *Chem Immunol.* **80**:229–242
- Plebanski M, Flanagan KL, Lee EA, Reece WH, Hart K, Gelder C, Gillespie G, Pinder M e Hill AV (1999). Interleukin 10-mediated immunosuppression by a variant CD4 T cell epitope of *Plasmodium falciparum*. *Immunity.* **10**:651–660
- Plebanski M, Lee EA e Hill AV (1997). Immune evasion in malaria: altered peptide ligands of the circumsporozoite protein. *Parasitology.* **115**:S55–S66
- Podoba JE e Stevenson MM (1991). CD4+ and CD8+ T lymphocytes both contribute to acquired immunity to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS. *Infect Immun.* **59**(1):51–58
- Pongponratn E, Riganti M, Punpoowaong B e Aikawa M (1991). Microvascular sequestration of parasitized erythrocytes in human *falciparum* malaria: a pathology study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **44**(2):168–175

- Potter S, Chan-Ling T, Ball HJ, Mansour H, Mitchell A, Maluish L e Hunt NH (2006). Perforin mediated apoptosis of cerebral microvascular endothelial cells during experimental cerebral malaria. *Int. J. Parasitol.* **36**(4):485-496
- Pradel G e Frevert U (2001). *Plasmodium* sporozoites actively enter and pass through Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. *Hepatology* **33**(5):1154-1165
- Pradel G, Garapaty S e Frevert U (2002). Proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver. *Mol Microbiol* **45**(3):637-651
- Pradel G, Garapaty S e Frevert U (2004). Kupffer and stellate cell proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver. *Comp Hepatol.* **3**(Suppl1):S47
- Price RN e Nosten F (2001). Drug resistant *falciparum* malaria: clinical consequences and strategies for prevention. *Drug Resist. Updat.* **4**(3):187-196
- Renggli J, Hahne M, Matile H, Betschart B, Tschopp J e Corradin G (1997). Elimination of *P. berghei* liver stages is independent of Fas (CD95/Apo-1) or perforin-mediated cytotoxicity. *Parasite Immunol.* **19**(3):145-148
- Rénia L, Potter S, Mauduit M, Rosa DS, Kayibanda M, Deschemin JC, Snounou G e Gruner AC (2006). Pathogenic T cells in cerebral malaria. *Int. J. Parasitol.* **36**(5):547
- Rest JR (1982). Cerebral malaria in inbred mice. I. A new model and its pathology. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **76**(3):410-415
- Roetynck S, Baratin M, Johansson S, Lemmers C, Vivier E e Ugolini S (2006). Natural killer cells and malaria. *Immunological Reviews.* **214**:251-263
- Samuel BU, Mohandas N, Harrison T, McManus H, Rosse W, Reid M e Haldar K (2001). The role of cholesterol and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins of erythrocyte rafts in regulating raft protein content and malarial infection. *J. Biol. Chem.* **276**(31):29319-29329
- Saul A (1999). The role of variant surface antigens on malaria-infected red blood cells. *Parasitol Today.* **15**(11):455-457
- Scheller LF e Azad AF (1995). Maintenance of protective immunity against malaria by persistent hepatic parasites derived from irradiated sporozoites. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**(9):4066-4068
- Schlitzer M (2007). Malaria Chemotherapeutics Part I: History of Antimalarial Drug Development, Currently Used Therapeutics and Drugs in Clinical Development. *Chem Med Chem.* **2**(7):944-986
- Schmieg J, Gonzalez-Aseguinolaza G e Tsuji M (2003). The role of natural killer T cells and other T cell subsets against infection by the pre-erythrocytic stages of malaria parasites. *Microbes Infect.* **5**(6):499-506
- Schmutzhard E e Gerstenbrand F (1984). Cerebral malaria in Tanzania. Its epidemiology, clinical symptoms and neurological long term sequelae in the light of 66 cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **78**(3):351-353
- Seydel KB, Milner DA, Kamiza S, Molyneux ME e Taylor TE (2006). The distribution and intensity of parasite sequestration in comatose Malawian children. *J. Infect. Dis.* **194**(2):208-215
- Sidjanski S e Vanderberg JP (1997). Delayed migration of *Plasmodium* sporozoites from the mosquito bite site to the blood. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **57**(4):426-429
- Silamut K, Phu NH, Whitty C, Turner GD, Louwrier K, Mai NT, Simpson JA, Hien TT, White NJ. (1999) A quantitative analysis of the microvascular sequestration of malaria parasites in the human brain. *Am J Pathol.* **155**(2):395-410.

- Silvie O, Franetich JF, Charrin S, Mueller MS, Siau A, Bodescot M, Rubinstein E, Hannoun L, Charoenvit Y, Kocken CH, Thomas AW, Van Gemert GJ, Sauerwein RW, Blackman MJ, Anders RF, Pluschke G e Mazier D (2004). A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Biol Chem.* **279**(10):9490–9496
- Sinden RE e Smith JE (1982). The role of the Kupffer cell in the infection of rodents by sporozoites of *Plasmodium*: Uptake of sporozoites by perfused liver and the establishment of infection in vivo. *Acta Trop* **39**(1):11–27
- Skinner TS, Manning LS, Johnston WA e Davis TM (1996). *In vitro* stage-specific sensitivity of *Plasmodium falciparum* to quinine and artemisinin drugs. *Int. J. Parasitol.* **26**(5):519–525
- Smith JD, Chitnis CE, Craig AG, Roberts DJ, Hudson-Taylor DE, Peterson DS, Pinches R, Newbold CI e Miller LH (1995). Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell.* **82**(1):101–110
- Srivastava IK, Rottenberg H e Vaidya AB (1997). Atovaquone, a broad spectrum antiparasitic drug, collapses mitochondrial membrane potential in a malarial parasite. *J Biol. Chem.* **272**(7):3961–3966
- Su XZ, Heatwole VM, Wertheimer SP, Guinet F, Herrfeldt JA, Peterson DS, Ravetch JA e Wellems TE (1995). The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell.* **82**(1):89–100
- Suhrbier A, Winger LA, Castellano E e Sinden RE (1990). Survival and antigenic profile of irradiated malarial sporozoites in infected liver cells. *Infect Immun.* **58**(9):2834–2839
- Terzakis J A, Vanderberg JP, Foley D e Shustak S (1979). Exoerythrocytic Merozoites of *Plasmodium berghei* in Rat Hepatic Kupffer Cells. *The Journal of Eukaryotic Microbiology.* **26**(3):385–389
- Toro G, Román G (1978) Cerebral malaria. A disseminated vasculomyelinopathy. *Arch Neurol.* **35**(5):271-5
- Torre D, Speranza F, Giola M, Matteelli A, Tambini R e Biondi G (2002). Role of Th1 and Th2 cytokines in immune response to uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**(2):348-351
- Trowell HC, Davies JN e Dean RFA (1954). Kwashiorkor. Edward Arnold, London.
- Troye-Blomberg M, Berzins K e Perlmann P (1994). T-cell control of immunity to the asexual blood stages of the malaria parasite. *Crit Rev Immunol.* **14**(2):131–155
- Tsuji M e Zavala F (2003). T cells as mediators of protective immunity against liver stages of *Plasmodium*. *Trends Parasitol.* **19**(2):88–93
- van der Heyde HC, Manning DD, Weidanz WP (1993). Role of CD4⁺ T Cells in the Expansion of the CD4⁺, CD8⁺ $\gamma\delta$ T Cell Subset in the Spleens of Mice during Blood-Stage Malaria. *Journal of Immunology.* **151**(11):6311-6317
- Vanderberg JP (1977). *Plasmodium berghei*: Quantitation of sporozoites injected by mosquitoes feeding on a rodent host. *Exp Parasitol* **42**:169–181
- Vanderberg JP e Frevert U (2004). Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immobilization of *Plasmodium berghei* sporozoites injected into skin by mosquitoes. *Int J Parasitol.* **34**(9):991–996
- Vangapandu S, Jain M, Kaur K, Patil P, Patel SR e Jain R (2007). Recent Advances in Antimalarial Drug Development. *Medicinal Research Reviews.* **27**(1):65-107
- Vinetz JM, Kumar S, Good MF, Fowlkes BJ, Berzofsky JA e Miller LH (1990). Adoptive transfer of CD8⁺ T cells from immune animals does not transfer immunity to blood stage *Plasmodium yoelii* malaria. *J Immunol.* **144**(3):1069–1074

- Vlachou D, Schlegelmilch T, Runn E, Mendes A e Kafatos FC (2006). The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. *Current Opinion in Genetics & Development*. **16**(4):384–391
- Vlachou D, Zimmermann T, Cantera R, Janse CJ, Waters AP e Kafatos FC (2004). Real-time, *in vivo* analysis of malaria ookinete locomotion and mosquito midgut invasion. *Cell Microbiol*. **6**(7):671–685
- Warrell DA, Veal N, Chanthavanich P, Karbwang J, White NJ, Looareesuwan S, Philips RE e Pondpaew P (1988). Cerebral anaerobic glycolysis and reduced cerebral oxygen transport in human cerebral malaria. *Lancet*. **2**(8610):534–537
- Weiss WR, Sedegah M, Beaudoin RL, Miller LH e Good MF (1988). CD8⁺ T cells (cytotoxic/suppressors) are required for protection in mice immunized with malaria sporozoites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**(2):573–576
- Wellems TE e Miller LH (2003). Two worlds of malaria. *N. Engl. J. Med.* **349**(16):1496–1498
- White KL, Snyder HL e Krzych U (1996). MHC class I-dependent presentation of exoerythrocytic antigens to CD8⁺ T lymphocytes is required for protective immunity against *Plasmodium berghei*. *J Immunol*. **156**(9):3374–3381
- White NJ (1994). Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of artemisinin and derivatives. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **88**(Suppl1):S41–43
- White NJ (1997). Assessment of the pharmacodynamic properties of antimalarial drugs *in vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**(7):1413–1422
- White NJ, Olliaro P (1998). Artemisinin and derivatives in the treatment uncomplicated malaria. *Med. Trop.* **58**(Supl3):54–56
- White VA, Lewallen S, Beare N, Kayira K, Carr RA e Taylor TE (2001). Correlation of retinal hemorrhages with brain hemorrhages in children dying of cerebral malaria in Malawi. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **95**(6):618–621
- Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH e Meshnick SR (2002). Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect. Dis.* **2**(4):209–218
- World Health Organization. (2005) World Malaria Report 2005. www.who.int
- Wright DH, Masembe RM e Bazira ER (1971). The effect of antithymocyte serum on golden hamsters and rats infected I. *Br. J. Exp. Pathol.* **52**(5):465–477
- Yañez DM, Manning DD, Cooley AJ, Weidanz WP e van der Heyde HC (1996). Participation of Lymphocyte Subpopulations in the Pathogenesis of Experimental Murine Cerebral Malaria. *J. Immunol.* **157**(4):1620–1624
- Ying P, Shakibaei M, Patankar MS, Clavijo P, Beavis RC, Clark GF e Frevert U (1997). The malaria circumsporozoite protein: Interaction of the conserved regions I and II-plus with heparin-like oligosaccharides in heparan sulfate. *Exp Parasitol* **85**(2):168–182
- Yokota S, Geppert TD e Lipsky PE (1988). Enhancement of antigen- and mitogen-induced human T lymphocyte proliferation by tumor necrosis factor alpha. *J Immunol*. **140**(2):531–36