

**OSCAR JAVIER MURILLO GÓMEZ**

**A CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS NO  
RECRUDESCIMENTO DA MALÁRIA NA GESTAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Biologia de Relação Patógeno-Hospedeiro) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo  
2018

**OSCAR JAVIER MURILLO GÓMEZ**

**A CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS NO  
RECRUDESCIMENTO DA MALÁRIA NA GESTAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Biologia de Relação Patógeno-Hospedeiro) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia de Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Romero Farias Marinho

São Paulo  
2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Murillo Gomez, Oscar Javier

A caracterização do papel das células dendríticas no recrudescimento da malária na gestação / Oscar Javier Murillo Gomez; orientador Claudio Romero Farias Marinho; coorientador Sabrina Epiphanyo. -- São Paulo, 2018.

153 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Malária. 2. Plasmodium berghei ANKA. 3. Gravidez. 4. Placenta. 5. Célula dendrítica. I. Farias Marinho, Claudio Romero, orientador. II. Epiphanyo, Sabrina, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato: **Oscar Javier Murillo Gómez**

Titulo da Tese: **A caracterização do papel das Células Dendríticas no recrudescimento da malária na gestação**

Orientador: **Cláudio Romero Farias Marinho**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

(    ) **Aprovado(a)**            (    ) **Reprovado(a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Este trabalho foi realizado sob a orientação do Prof. Dr. Cláudio Romero Farias Marinho, no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas, com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

## AGRADECIMENTOS

À FAPESP pelo suporte financeiro e aprovação da minha bolsa, o que permitiu a realização deste trabalho.

À Universidade de São Paulo, ao Instituto de Ciências Biomédicas e ao Departamento de Parasitologia pela oportunidade de fazer parte desta grandiosa instituição, bem como pelo conhecimento gerado e adquirido em cada aula, disciplina, palestra e corredores.

Ao Professor Cláudio Marinho, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, pela orientação e supervisão durante esses anos de doutorado, por todas suas sugestões e correções. Pela sua exigência, conhecimento, confiança, paciência e ajuda, que foram para mim um forte estímulo e base importante para meu crescimento científico e pessoal.

À Professora Sabrina Epiphany, pela orientação, sugestões e as múltiplas ajudas no percurso do meu projeto, além disso, pela confiança e também por me permitir colaborar em muitos de seus trabalhos.

Aos Professores Regina Lima, José Alvarez Mosig, Silvia Boscardin, Daniel Bargieri, Katia Regina Perez, Iolanda Midea Cuccovia e Victor Arana Chavez pelas colaborações, ajudas e ensinamentos.

À Dra. Lígia Antunes Gonçalves por toda a ajuda acadêmica, científica e os múltiplos ensinamentos.

À Dra. Sandra Muxel pela ajuda com os experimentos, às longas conversas científicas enquanto as amostras iam passando pelo citômetro; a confiança e os variados ensinamentos.

A todos meus colegas que estão ou estiveram no laboratório: Jamille, André, Natércia, Douglas, Rodrigo, Ricardo e Renato. Obrigado pelo tempo compartilhado, ensinamentos e sugestões.

Aos funcionários do departamento, em especial aos técnicos do Biotério da Parasitologia que, de muitas formas, contribuíram para a realização desse trabalho.

Agradeço de todo coração aos meus amigos Flávia, Erika, Aramys e Carla pela ajuda na execução desse trabalho; pela disponibilidade; pela troca de conhecimento; pelas sugestões científicas, incluindo as correções gramaticais. Eles são o exemplo que a amizade não tem fronteiras, nem distância. Vocês são e serão sempre parte deste trabalho, e o aprendizado científico e pessoal a mim proporcionado nunca será esquecido.

Aos meus amigos, que não fizeram parte do meu trabalho acadêmico, mas que contribuíram para meu crescimento pessoal. Sem eles não teria sido fácil lidar com as diferentes dificuldades que a vida oferece. Muito obrigado Alejandra, Eliana, Brian, Carolina, Yony, Cesar, Dairo e muitos outros que fizeram parte do meu dia a dia.

À minha mãe e minha irmã que estão sempre presentes em minha vida. Sem elas não teria chegado até aqui. Elas são exemplo de coragem que me faz acreditar que é possível alcançar os objetivos e força para nunca desistir da caminhada. Meu obrigado por todo o carinho e amor incondicional.

Ao meu Pai, meu irmão e minha Avó Leonor que foram parte importante no curto tempo que estiveram na minha vida e uma forte motivação para continuar.

À minha filha que é o motor para nunca retroceder ou desistir. A ela dedico todo meu esforço. Agradeço a compreensão e paciência por esses anos que ficou sem um pai, tempo que não terei como devolver ou pagar. Não teria suficientes paginas nesta tese para poder dedicar ou descrever todo meu agradecimento por sua existência. Igualmente, agradeço a Clara por cuidar tão bem da minha filha e pelo tempo que compartilhamos e aprendemos a difícil tarefa de ser pai.

À minha noiva e companheira Karen por todo o tempo de convivência e cuidado, pela paciência e dedicação, por todo o aprendizado e reflexões, por me abrir os olhos e mostrar o mundo de uma forma diferente. Obrigado por me fazer sentir vivo novamente e com desejo de seguir em frente. Você chegou na hora certa na medida justa, a brindar-me amor e reflexão.

Finalmente, a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na realização desse trabalho e formação científica. Muito obrigado mesmo.

*“Rompe o silêncio de um grito, deixe o mundo te ouvir, não tenha medo de agir, Não seja o sonho derrotado que teme e derrota a quem tem medo de sonhar..., seja um, seja você mesmo e nada mais, Seja livre ao agir com razão..., Não viva para ser por medo, a presa de outros sonhos, Só se vive uma vez para ser eternamente livre!”*

Elkin Ramírez - Kraken.





Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000  
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.058.2017

São Paulo, 14 de junho de 2017.

Prezado(a) Professor(a),

Informo que o projeto intitulado "**Caracterização do papel das células dendríticas no recrudescimento da malária na gestação**", registrado sob o protocolo nº **073/2013** e aprovado em 18/06/2013 que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, foi **prorrogado até 18/06/2021**.

Diante desta prorrogação e da declaração de que não houve alteração da metodologia e das técnicas descritas na licença inicial para o uso de animais, autorizo a inclusão das espécies e quantidades descritas abaixo para continuidade ao referido projeto:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade/Peso	Quantidade por ano
Camundongo	Balb/c	Ambos	6-8 semanas	1º: 60 2º: 40
Camundongo	C57BL/6J	Ambos	6-8 semanas	1º: 60 2º: 60

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA-ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**  
Coordenador - CEUA-ICB/USP

Prof.(a) Dr.(a) **Cláudio Romero Farias Marinho**  
Departamento de **Parasitologia**  
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

## RESUMO

A malária é um dos mais importantes problemas de saúde pública da atualidade. Está presente em mais de 91 países e cerca de 40% da população mundial vive em regiões onde o risco de infecção é potencialmente alto. Anualmente, estima-se que a doença atinge mais de 28 milhões de mulheres grávidas contribuindo para altas taxas de morbidade e mortalidade materna e neonatal. Dados recentes indicam que em zonas endêmicas apenas 43% das gestantes são tratadas contra essa enfermidade. A maioria dos tratamentos realizados durante a gravidez tem um resultado subcurativo, aumentando o risco de recrudescimento da infecção. Nestes casos não se sabe aonde o parasito se mantém oculto, nem qual é a célula responsável por protegê-lo da ação do sistema imune. Embora a principal papel das células dendríticas (DCs) seja de apresentação de antígenos e eliminação de microrganismos, já foi mostrado em ensaios *in vitro* que estas têm a capacidade de manter o plasmódio no seu interior e, posteriormente, gerar uma nova infecção. Por outro lado, sabe-se que as alterações hormonais resultantes da gestação têm a capacidade de modular o sistema imune, afetando a capacidade de fagocitose e a função das DCs, podendo gerar condições favoráveis para a sobrevivência e manutenção do plasmódio. Utilizando um modelo murino experimental identificamos o acúmulo de eritrócitos parasitados por *P. berghei* no baço e nos pulmões de camundongos Balb/c crônicos. Também demonstramos que as DCs estão envolvidas na manutenção dos parasitas e que também são responsáveis pelo recrudescimento da infecção durante a gravidez. Por, último identificamos que a gestação reduz significativamente a capacidade de maturação e fagocitose das DCs e de macrófagos, e este fenômeno é responsável pelo altos níveis de parasitemia observados neste período. Juntos, nossos resultados mostram o papel das células dendríticas (DCs) na regulação da resposta imune na malária e o seu direto envolvimento no recrudescimento da infecção durante a gravidez.

Palavras-chave: malária, *Plasmodium berghei* ANKA, gravidez, placenta, célula dendríticas.

## ABSTRACT

Malaria is one of the most important public health problems today. It is present in more than 91 countries and about 40% of the world population lives in regions where the risk of infection is potentially high. Annually, it is estimated that the disease reaches more than 28 million pregnant women contributing to high rates of maternal and neonatal morbidity and mortality. Recent data indicate that in endemic areas only 43% of pregnant women are treated for this disease. Most treatments performed during pregnancy have a sub-curative result, increasing the risk of infection. In these cases, it is not known where the parasite remains hidden, nor which cell is responsible for protecting it from the action of the immune system. Although the main role of dendritic cells (DCs) is the presentation of antigens and elimination of microorganisms, it has already been shown in *in vitro* tests that they have the ability to keep the plasmodium inside and generate a new infection. On the other hand, it is known that the hormonal changes resulting from gestation have the capability to modulate the immune system, affecting the phagocytosis capacity and the function of the DCs. So that they are able to generate favorable conditions for the survival and maintenance of the plasmodium. Using an experimental murine model, we identified the accumulation of erythrocytes parasitized by *P. berghei* in the spleen and lungs of chronic BALB/c mice. We have also demonstrated that DCs are involved in the maintenance of parasites and are also responsible for the resurgence of infection during pregnancy. Finally, we identified that gestation significantly reduces the maturation and phagocytosis capacity of DCs and macrophages, and this phenomenon is responsible for the high levels of parasitemia observed in this period. Therefore, our results show the role of dendritic cells (DCs) in regulating the immune response in malaria and their direct involvement in the onset of infection during pregnancy.

Key words: malaria, *Plasmodium berghei* ANKA, pregnancy, placenta, dendritic cell.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica da transmissão da malária em nível mundial. ....	26
Figura 2 - Mapa de risco da malária no Brasil, 2013. ....	27
Figura 3 - Ciclo de vida do parasito. ....	29
Figura 4 - Receptores do endotélio da microvasculatura associados ao sequestro dos eritrócitos infectados com <i>P. falciparum</i> . ....	31
Figura 5 - Perfil de hormônios nos diferentes estágios da gravidez. ....	46
Figura 6 - Protocolo experimental com uso de parasitos GFP ....	56
Figura 7 - Curva de qRT-PCR para quantificação de <i>P. berghei</i> ( <i>Pb</i> ) ANKA <sup>GFP</sup> ....	58
Figura 8 - Curva de qRT-PCR para expressão do gene controle GAPDH. ....	59
Figura 9 - Estratégia para a análise das subpopulações celulares do baço e dos pulmões .....	63
Figura 10 - Estratégia para a análise das subpopulações celulares do baço e do pulmão .....	65
Figura 11 - Estratégia de <i>gates</i> para a identificação dos marcadores de ativação e fagocitose nas DCs .....	67
Figura 12 - Estratégia de <i>gates</i> para a análise das subpopulações de macrófagos M1 e M2 do baço de camundongos. ....	69
Figura 13 - Estratégia de <i>gate</i> para a análise da capacidade das DCs e macrófagos de camundongos BALB/c para fagocitar eritrócitos parasitados expressando GFP .....	71
Figura 14 - Sistema de plotagem para <i>sorter</i> de células dendríticas com sinal positivo para <i>P. berghei</i> (GFP positivo) .....	74
Figura 15 - Sistema de análise das células dendríticas por citometria de imagem ImageStream <sup>®X</sup> .....	75
Figura 16 – Níveis de parasitemia e peso corporal. ....	79
Figura 17 – Efeito da recrudescência da malária associada à gravidez. ....	81
Figura 18 - Redução do espaço vascular placentário na recrudescência. ....	83
Figura 19 - Quantificação de citocinas séricas .....	84
Figura 20 - Ensaio de bioluminescência com <i>P. berghei</i> <sup>luciferase</sup> .....	86
Figura 21 - Quantificação da carga parasitária por qRT PCR. ....	87
Figura 22 - Análise por citometria de fluxo da frequência de células esplênicas e pulmonares ..	88
Figura 23 - Identificação de <i>P. berghei</i> em células dendríticas do baço e pulmões de BALB/c não prenhes crônicos .....	90

Figura 24 - Microscopia eletrônica de DCs contendo um eritrócito infectado com <i>P. berghei</i> ...	91
Figura 25 - Frequência de diferentes populações leucocitárias que sofreram depleção com o tratamento com clodronato .....	92
Figura 26 - Efeito da depleção de fagócitos no recrudescimento da infecção durante a prenhez .....	94
Figura 27 - Transferência de células dendríticas positivas para <i>P. berghei</i> para camundongos prenhes .....	95
Figura 28 - Análise de marcadores de ativação de células dendríticas por citometria de fluxo...	97
Figura 29 - Perfil de ativação de células dendríticas plasmocitoides (CD11c+CD11b-B220+) e convencionais CD8 (CD11c+CD11b-B220-CD8+).....	99
Figura 30 - Perfil de ativação de células dendríticas convencionais CD4 (CD11c+CD11b-B220-CD8+) e CD4/CD8 duplo negativa do baço.....	100
Figura 31 - Peso e número de células do baço de camundongos BALB/c na fase aguda e crônica da infecção .....	102
Figura 32 - Subpopulações de DCs do baço de camundongos BALB/c na fase aguda e crônica da infecção .....	103
Figura 33 - Perfis de ativação das pDCs de baço de camundongos BALB/C na fase aguda e crônica da infecção .....	105
Figura 34 - Perfis de ativação das cDCs CD8 do baço de camundongos BALB/C na fase aguda e crônica da infecção.....	106
Figura 35 - Perfis de ativação das cDCs CD4 do baço de camundongos BALB/C na fase aguda e crônica da infecção.....	107
Figura 36 - Perfis de ativação das cDCs CD4/CD8 duplo negativas do baço de camundongos BALB/C na fase aguda e crônica da infecção .....	108
Figura 37 - Peso e número de células de baço de camundongos BALB/c prenhes na ausência de infecção .....	109
Figura 38 - Subpopulações de DCs de baço de camundongos BALB/c prenhes na ausência de infecção .....	110
Figura 39 - Perfis de ativação das pDCs do baço de camundongos BALB/c prenhes na ausência de infecção. ....	111
Figura 40 - Perfis de ativação das cDCs CD8 do baço de camundongos BALB/c prenhes na ausência de infecção .....	112

Figura 41 - Perfis de ativação das cDCs CD4 do baço de camundongos BALB/c prenhes na ausência de infecção .....	113
Figura 42 - Perfis de ativação das cDCs CD4/CD8 duplo negativa do baço de camundongos BALB/c prenhes na ausência de infecção .....	114
Figura 43 - Efeito da malária por <i>P. berghei</i> nos camundongos prenhes e seus fetos. ....	116
Figura 44 - Perfil de citocinas no soro dos camundongos BALB/c prenhes durante a infecção.. .....	117
Figura 45 - Efeito da prenhez sobre a capacidade de fagocitose das DCs e dos macrófagos.	119
Figura 46 - Marcadores de ativação e de fagocitose nas DCs nos camundongos prenhes com malária. ....	121
Figura 47 - Subpopulações de macrófagos na malária durante a prenhez. ....	123

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Hormônios na gestação e seu efeito nas células imunológicas. ....	47
Tabela 2 - Painel de anticorpos utilizado para a fenotipagem das células dendríticas plasmocitóides (pDCs).....	61
Tabela 3 - Painel de anticorpos utilizado para a fenotipagem das células dendríticas convencionais (cDCs).....	61
Tabela 4 - Painel de anticorpos utilizado para a fenotipagem das células dendríticas plasmocitoides (pDCs).....	66
Tabela 5 - Painel de anticorpos utilizado para a fenotipagem de macrófagos M1 e M2 do baço .....	68
Tabela 6 - Painel de anticorpos utilizado para a caracterização da fagocitose de DCs e macrófagos .....	70
Tabela 7 - Painel de anticorpos e canais a utilizar para a análise de fagocitose das DCs .....	75
Tabela 8 - Resultado da gestação em camundongos recrudescentes e não recrudescentes infectados com <i>P. berghei</i> . ....	82
Tabela 9 - Transferência de células dendríticas positivas para <i>P. berghei</i> em camundongos prenhes .....	96

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag	Antígeno
Ang-1	Fator de crescimento placentário angiopoetina-1
Ang-2	Fator de crescimento placentário angiopoetina-1
APCs	<i>Antigen-presenting cells</i> (Células apresentadoras de antígenos)
B220 (CD45RO)	Marcador de células B ( <i>Cluster of differentiation 45memory marker</i> )
B7-H1	<i>B7 homolog 1</i> (B7 homólogo 1)
B7-H4	<i>B7 homolog 4</i> (B7 homólogo 4)
BDCA-2	<i>Blood dendritic cell antigen 2</i> (Antígeno 2 de célula dendrítica do sangue)
bp	<i>Base pair</i> (Pares de base)
BSCA-4	<i>Blood dendritic cell antigen 4</i> (Antígeno 4 de célula dendrítica do sangue)
BST2	<i>Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2</i> (antígeno 2 de célula estromal de medula óssea)
C5a	Componente do complemento 5a
C5AR1	<i>Complement component 5a receptor 1</i> (Receptor 1 do componente do complemento 5a)
CBA	<i>Cytometric beads array</i> (Conjunto de pérolas de citometria)
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (grupo de diferenciação)
CD3	<i>Cluster of differentiation 3</i>
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i>
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i>
CD11b	<i>Cluster of differentiation 11b</i>
CD11c	<i>Cluster of differentiation 11c</i>
CD14	<i>Cluster of differentiation 14</i>
CD16	<i>Cluster of differentiation 16</i>
CD19	<i>Cluster of differentiation 19</i>
CD24	<i>Cluster of differentiation 24</i>
CD32	<i>Cluster of differentiation 32</i>



CD36	<i>Cluster of differentiation 36</i>
CD40	<i>Cluster of differentiation 40</i>
CD45RO	<i>Cluster of differentiation 45RO</i>
CD56	<i>Cluster of differentiation 56</i>
CD64	<i>Cluster of differentiation 64</i>
CD80	<i>Cluster of differentiation 80</i>
CD86	<i>Cluster of differentiation 86</i>
CD88	<i>Cluster of differentiation 88</i>
CD103	<i>Cluster of differentiation 103</i>
CD303	<i>Cluster of differentiation 303</i>
cDCs	<i>Conventional dendritic cells</i> (Célula dendrítica convencional)
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico complementar)
CLip	Lipossomas contendo Clodronato
CpG	<i>Cytidine-phosphateguanosine</i> (Citidina-fosfato-guanina)
CR3	<i>Complement receptor 3</i> (Receptor do complemento 3)
CR4	<i>Complement receptor 4</i> (Receptor do complemento 4)
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CS	Somatomamotropina coriônica humana
CSA	<i>Chondroitin sulfate A</i>
CX3C	<i>Chemokine 3C</i> (Quimiocina3C)
CX3CR1	<i>Chemokine receptor 1</i> (Receptor de quimiocina1)
d7	Dia 7 pós-infecção
d16	Dia 16 pós-infecção
d22	Dia 22 pós-infecção
d50	Dia 50 pós-infecção
DBL	Domínio gama 3 de duffy binding-like
DCs	<i>Dendritic cells</i> (Células dendríticas)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
DT	<i>Diphtheria toxin</i> (Toxina diftérica)

DTR	<i>Diphtheria toxin receptor</i> (Receptor da toxina diftérica)
EnP	Eritrócitos não parasitados
EP	Eritrócitos parasitados
EPCR	Receptor da proteína C endotelial
ESAM	<i>Endothelial cell-selective adhesion molecule</i> (Molécula de adesão célula seletiva endotelial)
FSC	<i>Forward-scattered light</i> (Luz dispersa de frente)
Flt3	<i>FMS-like tyrosina kinase 3</i> (tirosina quinase tipo FMS)
Flt3L	<i>FMS-like tyrosine kinase 3 ligand</i> (ligante da tirosina quinase tipo FMS)
G1	Dia 1 da gestação
G10	Dia 10 da gestação
G13	Dia 13 da gestação
G19	Dia 19 da gestação
GAPDH	<i>Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> (Proteína verde fluorescente)
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> (Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos)
hCG	Gonadotropina coriônica humana
HDL-C	Lipoproteínas de alta densidade-C
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da imunodeficiência humana)
HLA-DR	<i>Human leukocyte antigen DR</i> (Antígeno de leucócito humano DR)
HMS	Esplenomegalia hiper-reativa da malária
HSP-70	<i>Heat shock protein 70</i> (Proteína de choque térmico)
IA-d	Glicoproteína da região IA-d
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> (Molécula de adesão intracelular 1)
ICAM-3	<i>Intercellular Adhesion Molecule 3</i> (Molécula de adesão intracelular 3)
IGF-1	Fator de crescimento insulínico tipo 1
IgG1	Imunoglobulina G 1
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-3R $\alpha$	Receptor de interleucina 3 alfa

IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
ILT7	<i>Immunoglobulin-like transcript 7</i> (Transcrito 7 tipo Imunoglobulina)
INF- $\alpha$	Interferon alfa
INF- $\gamma$	Interferon gama
i.p.	Intraperitoneal
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i> (Média de intensidade de fluoresceína)
MHC-I	<i>Major histocompatibility complex I</i> (complexo maior de histocompatibilidade I)
MHC-II	<i>Major histocompatibility complex II</i> (complexo maior de histocompatibilidade II)
MiP	<i>Malaria in pregnancy</i> (Malária na gestação)
MIP-1 $\alpha$	<i>Macrophage inflammatory protein 1alfa</i> (Proteína 1 $\alpha$ inflamatória de macrófagos)
MIP-1 $\beta$	<i>Macrophage inflammatory protein 1beta</i> (Proteína 1 $\beta$ inflamatória de macrófagos)
moDCs	<i>Monocyte-derived Dendritic Cells</i> (Células dendríticas derivadas de monócitos)
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico mensageiro)
NOS	Óxido nítrico sintase
NK	<i>Natural killer</i> (Assassinas naturais)
NLM	Linfonodo mediastinal
P4	Progesterona
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> (padrões moleculares associados a patógenos)
Pb	<i>Plasmodium berghei</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampão fosfato-salino)

PBSLip	Lipossoma contole contendo PBS
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
pDCs	<i>Plasmacytoid dendritic cells</i> (Células dendríticas plasmocitoides)
PECAM 1	Molécula de adesão celular plaqueta/endotélio 1
PfEMP	<i>Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1</i> (Proteína de membrana do eritrócito 1 de <i>P. falciparum</i> )
PI	Iodeto de propídio
PIBF	<i>Progesterone induced blocking factor</i>
PRRs	<i>Pathogen Recognition Receptors</i> (Receptores de Reconhecimento de Patógenos)
qRT-PCR	<i>Quantitative real time PCR</i> (PCR em tempo real quantitativa)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
S/P	Sulfadoxina-pirimetamina
SFB	Soro fetal bovino
sFlt-1	Receptor do fator de crescimento vascular e endotelial 1 solúvel
SiglecH	<i>Sialic acid binding Ig-like lectin H</i> (Ácido siálico de união a lectina H tipo Ig) <i>Specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-related 1</i> (receptor específico de células dendríticas ligante da molécula de adesão intracelular 3 (ICAM-3) não integrina)
SIGN (CD209b)	células dendríticas ligante da molécula de adesão intracelular 3 (ICAM-3) não integrina
SIRP $\alpha$	<i>Signal regulatory protein <math>\alpha</math></i> (Proteína $\alpha$ reguladora de sinais)
SSC	<i>Side-scattered light</i> (Luz espalhada pelos lados)
Ter119	<i>Erythroid lineage 119</i> (Linhagem eritrocíticas 119)
TGF $\beta$	<i>Transforming growth factors <math>\beta</math></i> (fator de crescimento transformante $\beta$ )
Th1	<i>T helper 1</i> (T auxiliar 1)
Th2	<i>T helper 2</i> (T auxiliar 2)
TLR	<i>Toll-like receptor</i> (Receptores tipo Toll)
TLR-7	<i>Toll-like receptor 7</i> (Receptores tipo Toll 7)

TLR-9	<i>Toll-like receptor 9</i> (Receptores tipo Toll 7)
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> (fator de necrose tumoral $\alpha$ )
Treg	T reguladoras
VAR2CSA	Conhecida também como DC2
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (Fator de crescimento endotelial vascular)

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
μL	Microlitro
μm	Micrômetros
mg	Miligrama
mg/g	Miligrama por grama
mg/Kg	Miligrama por quilograma
mL	Mililitro
pg/mL	Picograma por mililitro
pH	Potencial de hidrogênio
rpm	Revoluções por minuto
%	Porcentagem
s	Segundos
g	Gramas
p/sec/cm <sup>2</sup> /sr	<i>photons/ second/cm<sup>2</sup>/steradian</i> (foton/segundo/centimetro <sup>2</sup> /esterradiano)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	25
1.1	Epidemiologia e distribuição geográfica da malária .....	26
1.2	Ciclo de vida do parasito .....	27
1.3	Malária grave .....	29
1.4	A Malária gestacional .....	32
1.5	Recaída e recrudescência na malária gestacional .....	34
1.6	Imunologia da malária na gravidez .....	36
1.7	Papel das células dendríticas no sistema imune .....	38
1.8	Células dendríticas plasmocitóides .....	40
1.9	Células dendríticas convencionais .....	40
1.10	Células dendríticas derivadas dos monócitos .....	42
1.11	Células de Langerhans .....	42
1.12	Células dendríticas e gravidez .....	43
1.13	Células dendríticas e malária na gravidez .....	44
1.14	Hormônios e gravidez .....	46
1.15	Hormônios e malária na gravidez .....	48
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	51
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	53
3.1	Animais e parasitos .....	54
3.2	Níveis de parasitemia .....	54
3.3	Análise da recrudescência e monitoramento da prole .....	55
3.4	Localização de sítios de sequestro do parasito mediante a quantificação da atividade da luciferase .....	57
3.5	Quantificação da carga parasitária por qRT-PCR .....	57
3.6	Padronização da quantificação de <i>P. berghei</i> ANKA <sup>GFP</sup> por qRT-PCR .....	57
3.7	Clonagem do GAPGH de camundongos e construção da curva padrão para a sua quantificação .....	58
3.8	Análise histológica e morfométrica da placenta .....	59
3.9	Isolamento de esplenócitos .....	60
3.10	Isolamento de células de pulmão .....	60
3.11	Caracterização das diferentes subpopulações de células dendríticas (DCs) .....	61

3.12	Caracterização dos perfis de ativação e fagocitose das células dendríticas (DCs) do baço .....	66
3.13	Caracterização das subpopulações de Macrófagos M1 e M2 do baço.....	68
3.14	Purificação de eritrócitos parasitados (EP) .....	69
3.15	Efeito da gravidez na capacidade fagocítica das DCs e Macrófagos.....	70
3.16	Quantificação de citocinas no soro por CBA.....	72
3.17	Purificação das células dendríticas do baço .....	73
3.18	Identificação da presença do parasito nas DCs por citometria de imagem ImageStream® <sup>X</sup> .....	74
3.19	Fixação das DCs GFP positivas para microscopia eletrônica de varredura.....	76
3.20	Tratamento com lipossomas contendo Clodronato (CLip).....	76
3.21	Análise estatística.....	76
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>77</b>
4.1	Efeito da infecção com diferentes cepas de <i>P. berghei</i> sobre a recrudescência em camundongos BALB/c prenhes .....	78
4.2	Efeito da recrudescência na prenhez sobre o desenvolvimento do feto.....	80
4.3	Efeito da presença do <i>P. berghei</i> na redução do espaço placentário e no processo inflamatório .....	82
4.4	Identificação do acúmulo do parasito mediante a atividade da luciferase e qRT PCR... 85	
4.5	As DCs são capazes de abrigar o <i>P. berghei</i> em camundongos não prenhes crônicos... 87	
4.6	Efeito da depleção de células dendríticas na recrudescência da infecção.....	91
4.7	Análise de marcadores de ativação de células dendríticas por citometria de fluxo .....	96
4.8	Perfis de ativação das diferentes subpopulações de células dendríticas .....	98
4.9	Análise das subpopulações de DCs do baço na fase aguda e crônica da infecção.....	100
4.10	Perfil de ativação das diferentes subpopulações de DCs na fase aguda e crônica da infecção .....	103
4.11	Análise das subpopulações de DCs do baço durante a gestação.....	108
4.12	Perfil de ativação das diferentes subpopulações de DCs no baço das prenhes.....	110
4.13	A malária na gravidez favorece o aumento da parasitemia, o dano placentário e a redução do peso do feto .....	114
4.14	A prenhez modula a capacidade da fagocitose das DCs e dos macrófagos.....	117
4.15	Aumento da parasitemia modula os marcadores de ativação e fagocitose das DCs nos prenhes durante a malária.....	120



4.16 O aumento da parasitemia modula os perfis de macrófagos M1 e M2 nos camundongos prenhes durante a malária.....	122
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>124</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>135</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>137</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>151</b>

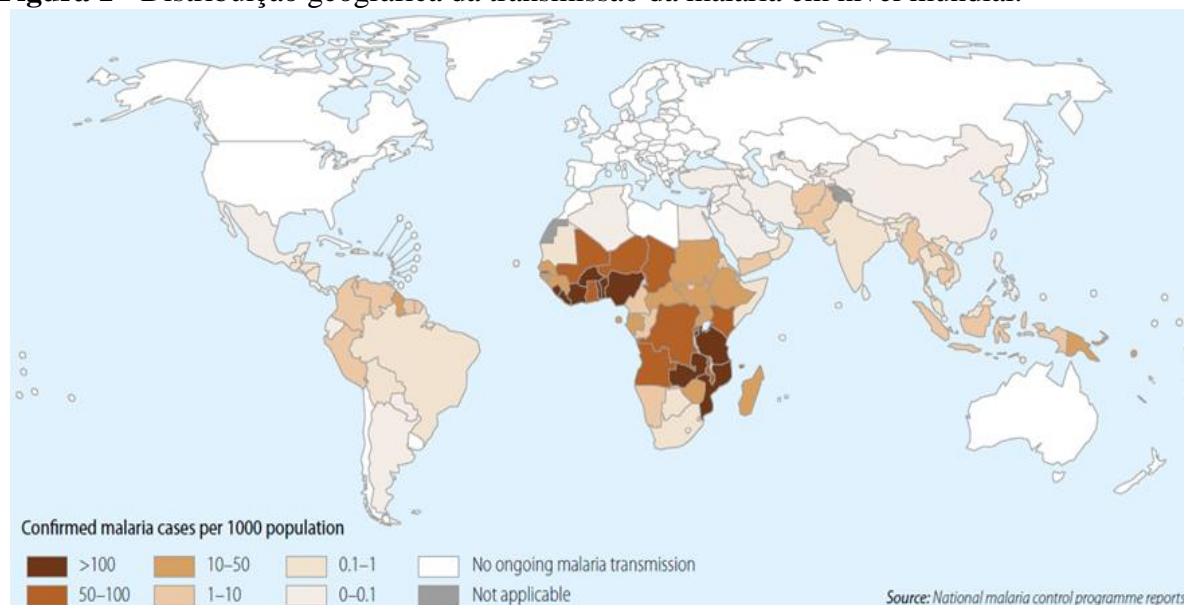
# **1 INTRODUÇÃO**

## 1.1 Epidemiologia e distribuição geográfica da malária

A Malária corresponde à doença parasitária mais importante do mundo, sendo causada pelos parasitos do gênero *Plasmodium* e transmitida eficientemente por, pelo menos, 34 espécies do mosquito do gênero *Anopheles* das quatrocentas espécies conhecidas (1). São cinco os parasitos conhecidos que causam malária em humanos: *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), *Plasmodium vivax* (*P. vivax*), *Plasmodium malariae* (*P. malariae*), *Plasmodium ovale* (*P. ovale*) e *Plasmodium knowlesi* (*P. knowlesi*); este último foi reportado nos últimos trinta anos por alguns trabalhos que mostraram a transmissão zoonótica da infecção de macacos aos humanos (2).

Dados recentes estimaram que cerca de 3,2 bilhões de pessoas ao redor do globo estão em risco de contrair malária, com uma ocorrência média de 214 milhões de novos casos em 2015. A doença produz em torno de 438.000 mortes por ano, sendo quinze países, especialmente da África, responsáveis por 80% destas mortes (2). As crianças menores de 5 anos de idade são as mais afetadas pela doença, representando aproximadamente 306.000 mortes por ano, especialmente na África subsaariana (67% das mortes), o que significa dizer que morre uma criança a cada dois minutos de malária no mundo (**Figura 1**) (3).

**Figura 1** - Distribuição geográfica da transmissão da malária em nível mundial.

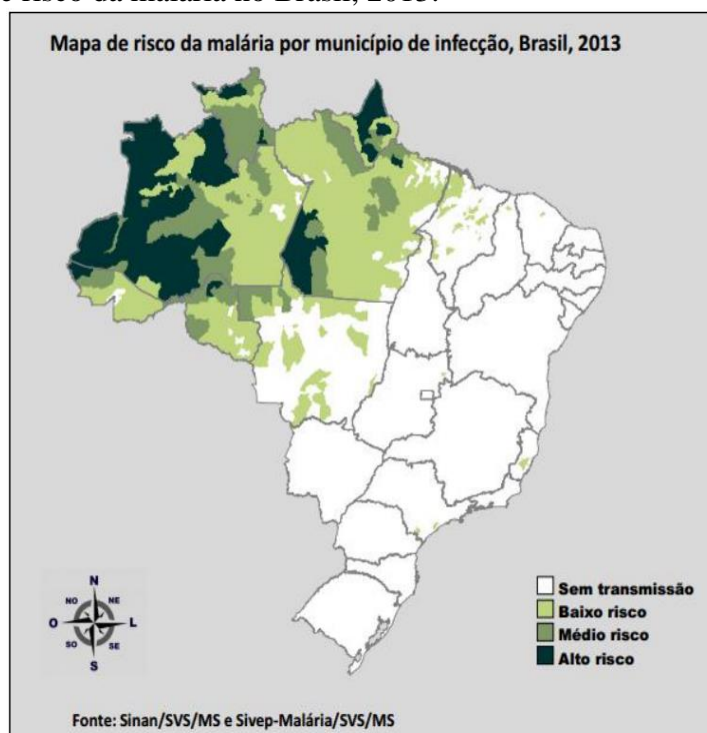


Fonte: WHO, 2014.

Apesar destes números, foi estimada uma diminuição de 1,2 bilhões de casos de malária, com uma redução de 6,2 milhões de mortes por malária no mundo entre os anos 2001

e 2015. Isso ocorreu devido aos investimentos em controle, tratamento e erradicação da doença, que, só em 2014, representaram aproximadamente US\$1,9 bilhões. Esses investimentos geraram uma redução de gastos ao sistema de saúde de mais de US\$900 milhões entre os anos 2001 e 2014 (2). No Brasil, até a atualidade, foram reportadas três espécies que geram malária em humanos: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* (5), sendo as duas primeiras as espécies que produzem o maior número de casos de malária no país. Só no ano de 2013 foram reportados 143.415 casos de malária, dos quais 16% são atribuídos ao *P. falciparum* e 84% ao *P. vivax*, com uma estimativa de 36 mortes no respectivo ano (2). Em relação aos vetores, o país abriga três espécies de mosquitos associados à transmissão do parasito: *An. darlingi*, *An. Albitarsis* e *An. Aquasalis* (**Figura 2**) (2).

**Figura 2** - Mapa de risco da malária no Brasil, 2013.



Fonte: SVS/MS, 2015.

## 1.2 Ciclo de vida do parasito

O ciclo de vida do parasito inicia-se quando as fêmeas infectadas do mosquito do gênero *Anopheles* inoculam um pequeno número de esporozoítos (10 a 100, aproximadamente) presentes em suas glândulas salivares; isto acontece no momento do repasto sanguíneo, quando o mosquito, ao alimentar-se, também injeta no hospedeiro a saliva onde estão os parasitos. Em poucos minutos, os esporozoítos entram no sistema circulatório e

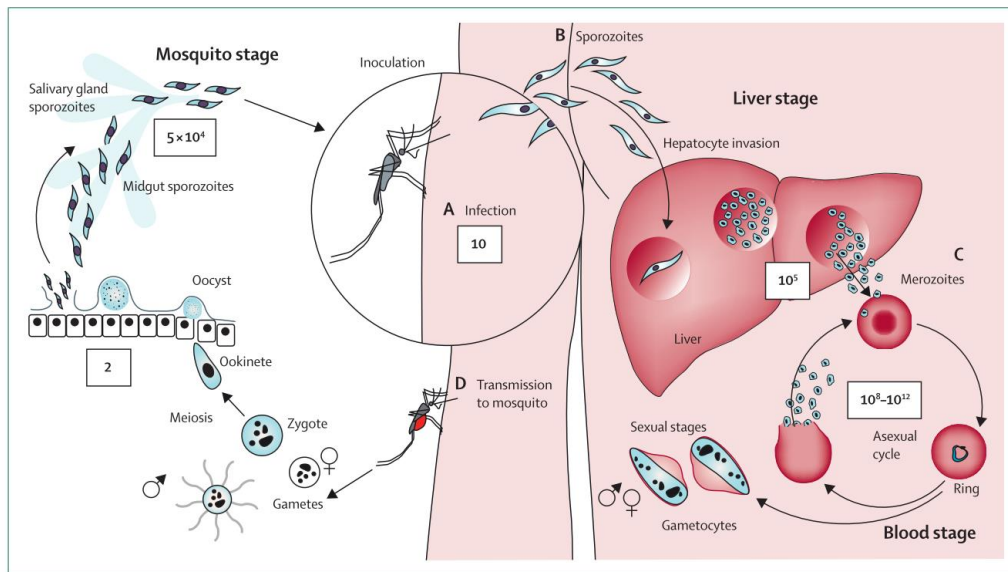
chegam até o fígado, onde invadem os hepatócitos. Esta fase hepática é conhecida como a fase assintomática. Desta maneira, por um período de 5 a 15 dias dentro do hepatócito, os esporozoítos podem produzir de 10.000 até mais de 30.000 merozoítos, que serão liberados em seguida, iniciando a invasão dos eritrócitos e a fase sintomática da doença (**Figura 3**) (6).

Na fase sintomática, também conhecida como fase eritrocitária, é desenvolvido o ciclo assexual do parasito, que leva aproximadamente 48 horas para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*, 72 horas para *P. malariae* e até 24 horas para *P. knowlesi* (7). Neste ciclo sanguíneo, os merozoítos procedentes do fígado podem produzir no interior das hemácias entre  $10^8$  a  $10^{12}$  parasitos, os quais passam por várias fases, tais como: anel, trofozoíto jovem, trofozoíto maduro e esquizonte; este último permite a ruptura dos eritrócitos e a liberação de novos merozoítos. Cada esquizonte dá origem a cerca de 30 merozoítos que irão infectar novos eritrócitos (8, 6). Neste ciclo, o crescimento intracelular do parasito muda a estrutura da membrana celular da hemácia, a fim de facilitar a troca de nutrientes e eliminação de produtos tóxicos (hemozoína) gerados pelo seu metabolismo e pelo consumo dos nutrientes (9).

Na fase sintomática, a doença é caracterizada por sinais e sintomas típicos, como anemia grave, febre em intervalos de dias, calafrios, dor de cabeça, vômitos, dor muscular, aumento do baço e fadiga. A malária não complicada, principalmente a produzida pelo *P. falciparum*, pode evoluir para complicações conhecidas como malária grave, tais como: anemia aguda, malária cerebral (responsável por cerca de 80% dos casos letais da doença), malária placentária, distúrbios renais e hepáticos (10).

No ciclo sanguíneo, alguns parasitos diferenciam-se nas formas sexuais, chamados de gametócitos. Estas formas circulantes podem ser ingeridas pelo mosquito na hora do repasto sanguíneo, ao picar uma pessoa infectada. Neste momento, inicia-se a fase sexual do ciclo, quando a fusão dos gametócitos no tubo digestório do mosquito gera um zigoto, o qual irá desenvolver-se em oocisto e, subsequentemente, em esporozoítos. Estes possuem a capacidade de migrar até as glândulas salivares do mosquito, tornando possível uma nova infecção a após a picada do inseto (**Figura 3**) (6).

**Figura 3 -** Ciclo de vida do parasito.



Fonte: WHITE et al., 2014.

### 1.3 Malária grave

A malária grave, forma severa e com altas taxas de mortalidade, é clinicamente definida pela manifestação de uma ou mais complicações ligadas à malária, associadas ao diagnóstico clínico da presença do parasito. Dentre as principais complicações, encontram-se o desconforto respiratório, edema pulmonar, convulsões, distúrbios neurológicos, coma, hemorragia, anemia grave, hipoglicemia, acidose metabólica, hiperlactatemia, insuficiência renal, hiperparasitemia e a malária gestacional. A manifestação desta forma mais severa da doença depende de fatores variados, que incluem a espécie do parasito envolvido na doença, idade da pessoa infectada, característica genética do hospedeiro, padrão de exposição ao parasito, acesso rápido ao tratamento, disposição de serviços de saúde, entre outros (11).

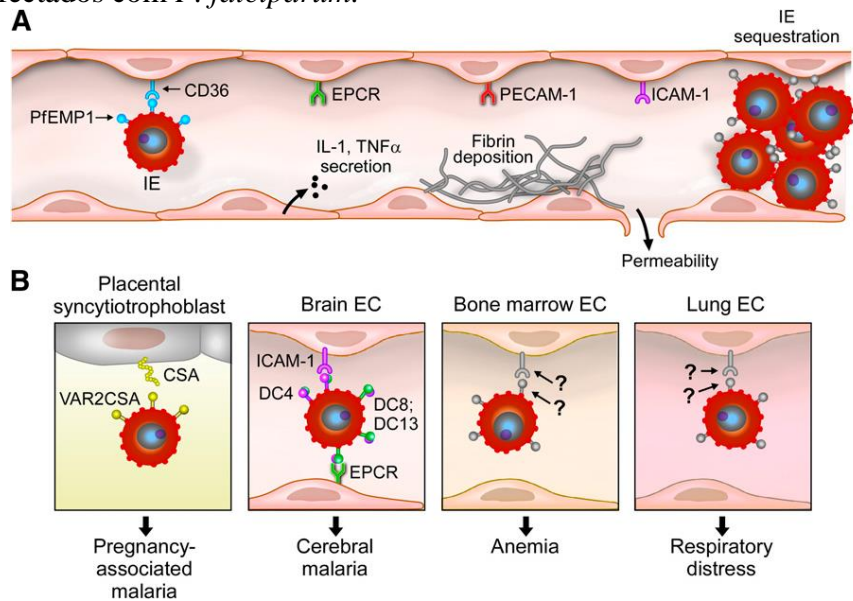
A severidade da malária grave é causada pela capacidade do eritrócito infectado em ser sequestrado pelo tecido, pois esse sequestro compromete e gera falhas no órgão comprometido. Conforme observado no *P. falciparum*, a origem deste fenômeno inicia-se com a obstrução da microvasculatura, e é similar para os diferentes tecidos afetados durante a malária grave (6). O nível de obstrução da microvasculatura e a presença de lactato no plasma estão associados não só com a severidade clínica e o prognóstico da malária, assim como a liberação local de hemoglobina, que esgota o óxido nítrico pela ação do grupo heme, gerando uma disfunção no endotélio do tecido afetado (12). Associado a isso, pode ainda ser observada uma diminuição de L-arginina precursora do óxido nítrico. Assim, inicia-se um processo de excitose dos corpos de Weibel-Palade produzidos pelo estímulo ao endotélio,

liberando ao exterior das células moléculas como angiopoetina-2 e o fator de von Willebrand. Este último fator tem a capacidade de interagir com um importante receptor para PfEMP1 que interage com a molécula CD36, presente nas plaquetas ativas e que consegue gerar parte da cito-aderência do eritrócito infectado (6).

Existem importantes moléculas que têm a capacidade de permitir a adesão do parasito e que também estão associadas a complicações específicas da malária, tais como: o receptor da proteína C endotelial (EPCR), a condroitina sulfatada A (CSA), a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), e a molécula de adesão celular plaqueta/endotélio 1 (PECAM-1) (13).

O receptor da proteína C endotelial (EPCR) interage com a proteína Mac-1 e PfEMP1 no domínio DC8-/DC13 do eritrócito infectado, e está associado à malária cerebral (13). Já a CSA interage com a proteína VAR2CSA, uma das variantes da PfEMP1, também conhecida como CD2, produzida pelo parasito e presente na superfície do eritrócito infectado, encontra-se diretamente relacionada ao sequestro do parasito na placenta durante a malária placentária (14,15). Adicionalmente, a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) interage com Mac-1 e PfEMP1 no domínio DC4, e está frequentemente associada às malárias cerebral e pulmonar (16). Por fim, a molécula de adesão celular plaqueta/endotélio 1 (PECAM-1) tem a capacidade de interagir com PfEMP1 no domínio DC5, e está associada à malária cerebral (17). Todas estas moléculas desempenham papéis importantes na adesão do *P. falciparum* (**Figura 4**).

**Figura 4** - Receptores do endotélio da microvasculatura associados ao sequestro dos eritrócitos infectados com *P. falciparum*.



(A) Na microvasculatura são expressos CD36, ICAM-1, EPCR, PECAM-1; estes receptores têm a capacidade de interagir com diferentes domínios de PfEMP1 expressos na superfície do eritrócito infectado circulante. A adesão gera um processo inflamatório com a produção de citocinas pró-inflamatórias, depósitos de fibrina e a perda da integridade da barreira endotelial, criando a obstrução da microvasculatura e, finalmente, a ruptura perivascular. (B) Cada tecido ou órgão tem uma gama de receptores que gera adesão e sequestro específico do parasito. Por exemplo, na placenta o CSA, que interage com VAR2CSA (DC2); na microvasculatura do cérebro e pulmão são encontrados alguns receptores como ICAM-1 (que interage com DC4), EPCR (que interage com DC8/DC13) e CD36 (bem conhecido pela sua interação com PfEMP1). Em outros tecidos, como a medula óssea, ainda não se tem certeza de qual é o receptor mais relevante na interação com os PfEMP1 do parasito. Fonte: Aird et al., 2014

A malária grave é comumente associada com a presença do *P. falciparum*, no entanto, o *P. vivax*, especialmente em regiões endêmicas, apresenta complicações e alguns casos de malária grave. Estimando-se que, no ano 2015, morreram entre 1.400 a 14.900 pessoas por malária grave decorrente de *P. vivax* em tudo o mundo. Convém ressaltar que são poucos os dados sobre as complicações atribuídas ao *P. vivax*, sendo necessárias mais pesquisas envolvendo os casos de malária grave resultantes da infecção por esta espécie (2).

Indiferente da gravidade da malária, toda infecção pelo *Plasmodium* gera uma forte liberação de citocinas pró-inflamatórias, posterior à adesão do parasito ao endotélio e seu acúmulo no tecido alvo. Assim, importantes células da imunidade inata, tais como: os macrófagos, neutrófilos, entre outras células presentes nos infiltrados leucocitários e células esplênicas, iniciam a lise dos eritrócitos infectados, com consequente liberação do glicosilfosfatidilinositol, hemozoína (pigmento malárico), DNA, e demais moléculas do parasito. Por sua vez, essas moléculas liberadas geram uma poderosa e rápida resposta inflamatória (18–20).



Diante disso, células como as T CD4+, as células T gama-delta e as células NK disparam uma cascata inflamatória com a produção de IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Ao mesmo tempo, os monócitos CD14+ produzem altos níveis de TNF e quimiocinas, junto com a produção de IL-10 procedente das células T CD4+. Contudo, o perfil de severidade da malária grave nos humanos está diretamente associado com o aumento de mediadores inflamatórios, como IL-6, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-2, e da citocina anti-inflamatória IL-10 (21).

Um dos sinais importantes na malária grave é a anemia, a qual não é satisfatoriamente explicada apenas pelo fenômeno de remoção de eritrócitos infectados pelo baço. Neste sentido, a cascata inflamatória desencadeada pela presença do parasito poderia estar envolvida nesse fenômeno, uma vez que se acredita que a ação das citocinas pró-inflamatórias possa interferir no processo da eritropoiese (18). A anemia compreende uma condição impactante na gestação, visto que a redução no número de eritrócitos pode afetar as trocas gasosas e de nutrientes entre a mãe e o feto; essa disrupção, frequentemente, acarreta as reduções de peso e o do crescimento intrauterino do feto; somado a tudo isso, é evidente o impacto do processo inflamatório o qual está associado com a infecção e sequestro do parasito na placenta (22).

#### 1.4 A Malária gestacional

Nesse contexto, a cada ano, mais de 125 milhões de mulheres grávidas localizam-se em zonas de transmissão de malária expostas ao risco de infecção pelo parasito, com o agravante de serem o grupo mais suscetível à doença (23). Estima-se que destas, aproximadamente, 28 milhões de mulheres residam em zonas endêmicas, das quais 15 milhões não recebem nenhum tipo de tratamento, aumentando o risco de sofrerem as complicações associadas à malária (2, 24–26). Tal suscetibilidade tem merecido atenção de intenso debate nos últimos anos e, a princípio, foi proposto que seria devido à imunomodulação materna, a qual, por um lado protege o feto contra a ação do sistema imunológico e, por outro, deixá-lo-ia menos resistente às infecções (22). Em contrapartida, atualmente há um consenso de que o ambiente placentário pode oferecer condições para o desenvolvimento de subpopulações dos parasitos, os quais se acumulariam na placenta, favorecendo a infecção graças ao escape do *clearance* imunológico (14, 15). De fato, esse fenômeno é bem caracterizado em infecções de gestantes pelo *P. falciparum*, em que, frequentemente, há desfechos negativos associados à malária placentária, sendo uma importante causa de mortalidade materno-infantil, e tendo como

consequências o aumento no número de abortos, nascimentos prematuros, anemia severa e retardo nos desenvolvimentos fetal e infantil (2, 27).

Como citado, a malária placentária é mais comum em infecções pelo *P. falciparum*, devido ao fenômeno do sequestro de eritrócitos infectados na placenta, fato já bem demonstrado. Em gestantes infectadas, uma subpopulação do parasito que expressa a proteína PfEMP1 é selecionada, visto que esta proteína se liga à CSA presente na placenta. A CSA placentária tem a particularidade de ser expressa na membrana do sinciciotrofoblasto que recobre as vilosidades, estando em contato direto com o sangue materno circulante nas lacunas placentárias. Dessa forma, a adesão dos eritrócitos infectados com *P. falciparum* na placenta gera uma condição inflamatória semelhante àquela ocorrida na pré-eclâmpsia, uma vez que o espaço interviloso abriga leucócitos responsivos à presença do parasito (14,28).

No estabelecimento da malária gestacional, a presença do parasito ou produtos derivados deste, como a hemozoína, faz com que as células mononucleares maternas e do sinciciotrofoblasto liberem quimiocinas, como MIP-1 $\alpha$  (*Macrophage-Inflammatory Protein 1*), CBA1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*) e IL-8, que favorecem o recrutamento de monócitos (29, 30). Um intenso infiltrado inflamatório, constituído predominantemente por macrófagos/monócitos, desenvolve-se nessa região, com conseqüente produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como: TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio. Estas últimas auxiliam na eliminação do parasito por aumentarem a atividade fagocítica de macrófagos e estimular a proliferação de linfócitos T, mas, por outro lado, levam à deterioração da função placentária (31).

Uma vez comprometidas a função, a integridade tissular e a homeostase placentária, inclusive pela indução de modificações estruturais no órgão, as trocas gasosas, o aporte nutricional, a produção de hormônios e fatores vasoativos, assim como o transporte de metabólitos fetais, sofrem disrupção. Diante desse cenário, o desfecho frequentemente são abortos, nascimentos prematuros, anemia severa, retardo nos desenvolvimentos fetal e infantil e hemorragia pós-parto (32, 33).

Contudo, após sucessivas gestações, adquire-se uma imunidade específica contra as formas placentárias do parasito, podendo prevenir o sequestro dos eritrócitos infectados na placenta e, dessa maneira, evitar a cascata de eventos inflamatórios que conduz ao agravamento da doença (32). Paradoxalmente, mulheres residentes em áreas com alta endemicidade, muitas vezes, apresentam poucos sintomas da doença, ou seja, tornam-se oligossintomáticas e, em particular, os efeitos mais severos da malária são observados na primeira e na segunda gravidez, sugerindo a existência de um forte mecanismo de proteção

associado à imunidade específica, o que poderia ser reforçado pelo tratamento farmacológico (34).

### 1.5 Recaída e recrudescência na malária gestacional

A recaída e a recrudescência são dois fenômenos bastante comuns na gestação. Nas infecções por *P. vivax*, podem ocorrer recaídas de 8 a 10 meses depois dos primeiros episódios de infecção. Estas recaídas correspondem a ciclos pré-eritrocíticos e eritrocíticos tardios, devido aos esporozoítos, que são chamados de hipnozoítos, formas que permaneceram quiescentes no fígado durante esse período (35). Estudos feitos com gestantes demonstram que 65% das mulheres apresentaram recaída para *P. vivax* (36, 37) comparado a 21% de recaídas nas crianças, além disso, identificaram um aumento dos episódios de recaída no decorrer da gestação nestas mulheres gestantes (37).

A recrudescência representa um fenômeno de relevo na malária, principalmente na gravidez. Esse evento é definido como uma recaída precoce, quando o paciente apresenta “cura clínica”, porém, após um ou dois meses, volta a apresentar os sintomas maláricos. Este fenômeno está relacionado especificamente a infecções por *P. falciparum* durante a gestação e tem uma alta frequência em primigrávidas (38), diabetes mellitus e condições de imunossupressão ou imunomodulação, que refletem uma redução da imunidade do hospedeiro as quais são necessárias para gerar uma nova infecção anos depois. Isto demonstra a grande capacidade de *P. falciparum* de permanecer vivo por longos períodos de tempo em uma possível dormência em níveis submicroscópicos, especialmente no espaço vascular do baço ou da placenta (39).

No baço pode ser observada uma condição chamada síndrome da esplenomegalia hiperreativa da malária (HMS), gerada pelas repetidas infecções do parasito ao hospedeiro. Esse fenômeno é frequente nas áreas endêmicas de malária e está associada à infecção persistente ou recrudescência do parasito (39), tendo sido verificada em duas pessoas africanas que passaram muitos anos morando na França e foram submetidas à esplenectomia após entrarem no hospital com um diagnóstico de distúrbio linfoproliferativo maligno. Passadas algumas semanas, estes pacientes apresentaram um surto de malária por *P. falciparum*, indicando que a esplenomegalia havia sido produto da presença do parasito no baço que, ao ser removido, fez com que o sistema imunológico não conseguisse controlar o crescimento do parasito, além de demonstrar a importância do baço e sua função imunológica no controle do parasito (40). Outro caso similar foi reportado na Austrália, onde uma mulher de 28 anos residia havia nove

anos naquele país, e procedente do Sudão, teve um episódio de malária por *P. falciparum* após esplenectomia (41).

Há vários os casos relacionados a episódios de recrudescência decorrentes de infecções por *P. falciparum*, meses ou anos após a exposição inicial (de 7 meses até 15 anos). A título de exemplo, foram registradas recaídas em associação a determinadas comorbidades, tais como: diabetes mellitus (um caso registrado), pós-traumatismo cranioencefálico (um caso registrado), anemia falciforme (um caso registrado), o HIV (dois casos registrados), sugerindo que, no momento da redução na imunidade do hospedeiro, o parasito que estava em estado de latência, possivelmente, tenha gerado uma nova infecção. Ademais, foram reportados treze casos de recrudescência, apresentando episódios sintomáticos no momento da gestação (39).

A maioria dos casos de recrudescência na gestação é atribuída a falhas no tratamento ou à não conclusão do esquema terapêutico, além da resistência do parasito aos antimaláricos. Entretanto, das 28 milhões de gestantes que moram em zonas endêmicas estima-se que 57% recebem, ao menos, uma dose de tratamento preventivo de sulfadoxina-pirimetamina (S/P) na gravidez; deste grupo, 40% receberam duas ou mais doses e 17% recebem três ou mais doses do tratamento. Contudo, ainda é bastante elevado o número de mulheres expostas à infecção pelo *Plasmodium*, associado ao fato de muitas não terem acesso ao tratamento (2).

Apesar destes esforços, já foram demonstrados 66% de casos de recrudescência pela técnica de PCR após a segunda dose de S/P (42). Como observado em estudo realizado na Tailândia, em uma coorte de setecentas gestantes tratadas contra o *P. falciparum*, 76% dessas gestantes apresentaram um episódio de recrudescência, 18% dos casos tiveram dois episódios de recrudescência e 6% dos casos apresentaram três ou mais casos ao longo da gestação (43). Estimando-se que mais das 76% das infecções recorrentes corresponderam a um verdadeiro recrudescimento, fenômeno de difícil identificação, pois a maioria dessas infecções é submicroscópica, o que poderia também demonstrar que a S/P diminui a circulação do parasito, embora não o elimine de forma completa (42).

Nesse contexto, foi observado em uma gestante nos Estados Unidos da América complicações durante a 29ª semana de gestação por malária, logo após ter apresentado um episódio de malária por *P. falciparum* três anos antes da gravidez, infecção adquirida decorrente de uma visita à África (44). Outro caso similar verificou-se na França, onde uma mulher com 24 semanas de gestação apresentou malária por *P. falciparum*, tendo sido reportado um episódio de infecção por *P. falciparum* dois anos antes, durante uma viagem ao referido continente (45).

De forma similar, foi demonstrado em modelo murino de recrudescência induzida pela gravidez, que a infecção por *P. berghei* apresentou, apresentou um forte impacto sobre o resultado da prenhez, porém, este diminuiu, gradualmente, a partir da primeira para a terceira prenhez. Quanto às lesões placentárias e a má-formação fetal foram observadas em baixa frequência nos animais não recrudescentes comparados com os animais que apresentaram recrudescência na prenhez (46).

## 1.6 Imunologia da malária na gravidez

As mudanças do sistema imunológico e a manutenção do perfil Th2 na gravidez, junto com o aumento de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, TGF- $\beta$  e hormônios como progesterona no útero, estão associadas com a suscetibilidade a malária. Ao mesmo tempo, a presença do parasito estimula a produção de citocinas pro-inflamatórias como INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , o que gera uma mudança do perfil imunológico passando de Th2 (resposta T *helper* tipo 2) a Th1 (resposta T *helper* tipo 1), perfil associado com aborto espontâneo, insucesso da gravidez e danos no desenvolvimento do feto (22).

Como já foi mencionado, na placenta se encontra o glicosaminoglicano CSA, uma molécula bastante frequente e fundamental para o sequestro do eritrócito parasitado no espaço intervilloso. Especialmente durante o segundo e terceiro trimestres de gestação, quando a placenta já está formada e o perfil imunológico torna a gestante mais suscetível a infecções, quando, ao que tudo indica, a infecção apresenta os maiores efeitos nocivos ao feto (14).

O CSA é reconhecida pelo domínio ligante é o domínio gama 3 de duffy binding-like (DBL) o qual faz parte do PfEMP1 do *P. falciparum*, e se caracteriza pelos múltiplos alelos e sua reorganização em *clusters* que codificam mais de cinquenta variantes de proteínas de adesão expressas na superfície do eritrócito (47), interessante, o gama DBL é expresso só na fase eritrocítica do parasito (22).

O sequestro do parasito por citoaderência na placenta está associado à patogênese e às características fenotípicas do receptor ao qual o parasito se liga, gerando obstrução do fluxo sanguíneo, produção de citocinas pró-inflamatórias e mudanças no endotélio do tecido pelo bloqueio dos sinais de tradução (48). Após o sequestro do eritrócito infectado, a gestante desenvolve uma resposta humoral específica que permite proteção contra diferentes subpopulações do parasito que se acumulam na placenta. Assim uma imunidade específica contra as formas placentárias do parasito é adquirida após sucessivas gestações, podendo

prevenir o sequestro e, dessa maneira, evitar a cascata de eventos inflamatórios que conduzem ao agravamento da doença (32,49).

Além da resposta humoral na placenta pode ser evidenciado um processo inflamatório direcionado por algumas células do sistema imune, apresentando uma alta produção de citocinas pró-inflamatórias e desenvolvendo uma resposta Th1 neste tecido, contribuindo com a inflamação crônica da placenta. Este desbalanço entre Th1/Th2 está diretamente associado aos danos e problemas adversos da malária na gravidez e à elevada produção de citocinas como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 (50), INF- $\gamma$ , IL-2 (22); sinais de destaque para a identificação de um processo inflamatório na placenta, conduzido pelo acúmulo de monócitos, macrófagos e células T citotóxicas no espaço interviloso de placentas na presença de infecção ativa da malária. Assim, o aumento do número de monócitos e macrófagos poderia estar associado com o baixo peso ao nascimento e a necessidade do tecido de eliminar o parasito (51).

O tecido estromal das placentas infectadas pode produzir baixos níveis da proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa (MIP-1 $\alpha$ ), o que, por sua vez, induz o início dos infiltrados de monócitos na placenta, resultando em um aumento nos níveis da MIP-1 $\alpha$  e da IL-8 permitindo, posteriormente, o acúmulo adicional de monócitos e macrófagos (52). Ao mesmo tempo, os monócitos e macrófagos iniciam a produção de IL-1 $\beta$ , citocina que pode parar o transporte de nutrientes pelo sinciciotrofoblasto (53). Além disso, este acúmulo de monócitos na malária placentária está associado com a diminuição do fator de crescimento insulínico tipo 1 (IGF-1), uma proteína importante no controle do crescimento fetal e que poderia explicar o mecanismo para o fenômeno de restrição do crescimento intrauterino na malária gestacional (54).

Outra molécula relevante na resposta imunológica contra o *Plasmodium* é a proteína do sistema complemento C5a produzida em resposta contra o parasito e que pode ativar monócitos e macrófagos pela interação com o receptor C5a (CD88 ou C5AR1). A ação desta molécula aumenta o receptor do fator de crescimento vascular e endotelial 1 solúvel (sFlt-1), o qual interage diretamente com o VEGF, o fator de crescimento placentário, e angiopoetina-1 (Ang-1), diminuindo a disponibilidade destas moléculas importantes na angiogênese e vasculogênese da placenta. Simultaneamente, o aumento de C5a está associado ao aumento de angiopoetina-2 (Ang-2) e endogлина solúvel. Estas mudanças condicionadas pela C5a produzem a restrição do crescimento fetal por meio da desregulação de fatores angiogênicos, essenciais para o remodelamento vascular placentário e, deste modo, gerando uma insuficiência vascular placentária classicamente característica da malária placentária (55).

As citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e TNF- $\alpha$  são expressas pelas células dendríticas (DCs) quando estimuladas com eritrócitos parasitados (EP) por *P. falciparum*, fato que pode ser evidenciado em condições naturais na malária (56), adicionado à diminuição das DCs no sangue periférico, no sangue do cordão e na placenta (57). O aumento das DCs imaturas, com a respectiva diminuição da expressão de moléculas de MHC-II em células dendríticas plasmocitoides (pDCs) e convencionais DCs (cDCs), é seguido de um aumento de IL-10 durante a malária gestacional. Este fato poderia explicar o desequilíbrio dos perfis Th1/Th2 na placenta, bem como o perfil inflamatório e, por fim, os posteriores danos no tecido placentário e no desenvolvimento do feto (58).

### 1.7 Papel das células dendríticas no sistema imune

As DCs são células apresentadoras de antígeno (APCs) fundamentais para a homeostasia do sistema imune, as quais têm a capacidade de induzir a resposta imune primária, favorecendo o estabelecimento da memória imunológica, sendo, portanto, o principal elo entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa (59). As DCs são originadas na medula óssea e, posteriormente, são direcionadas a todos os órgãos, tecidos, vasos linfáticos e órgãos linfoides, onde permanecem imaturas até fagocitarem algum antígeno (Ag), iniciando assim sua maturação e sua função como APC (60). Em seguida, estas liberam grande quantidade de citocinas, tal como INF- $\alpha$ , permitindo o rápido controle da infecção (59). Durante o processo de maturação, ocorre um aumento na expressão de moléculas de ativação e a migração aos órgãos linfoides, possibilitando a apresentação dos Ags aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e/ou T CD8<sup>+</sup> e, por consequência, a ativação de linfócitos B, macrófagos, eosinófilos e células *Natural Killer* (NK) (61).

O sistema imunológico evoluiu permitindo a maior diferenciação e especialização de diferentes subpopulações de DCs específicas para os distintos tecidos existentes, contribuindo para a homeostasia do sistema. Logo, a perda seletiva de qualquer uma destas subpopulações de DCs pode ser associada a certas doenças autoimunes em humanos (62). A grande diversidade de subpopulações de DCs tem levado à necessidade de que estas sejam agrupadas em diferentes categorias, baseadas, sobretudo, em seus diferentes marcadores de superfície celular. As quatro principais categorias de DCs são DCs convencionais (cDCs); DCs plasmocitoides (pDCs); células de Langerhans (LC); e DCs derivadas de monócitos (moDCs) (63).

As DCs apresentam uma função essencial na captura de patógenos, células infectadas, mortas e uma ampla gama de antígenos. Desde sua descrição por Ralph Steinman (60), a importância das DCs na iniciação da resposta imune adaptativa tem sido reconhecida. Esta função de APC tem início com o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) pelos diferentes receptores de reconhecimento de padrões (PRR), presentes na superfície e citoplasma das DCs, e posterior migração destas células para os órgãos linfoides, onde apresentam antígenos nas áreas de células T (64).

Outros receptores são expressos pelas DCs, tais como CR3 e CR4 (receptores para moléculas do complemento), os quais desempenham uma função importante na captação e no processamento de antígenos (65). As moléculas de CD64 (Fc $\gamma$ -RI), CD32 (Fc $\gamma$ -RII) e CD16 (Fc $\gamma$ -RIII), encontrados principalmente nas DCs imaturas, estão associadas à migração destas células para os órgãos linfoides (66). O receptor CD16 é altamente expresso nas DCs e pode estar sobre-expresso na presença de um antígeno, como demonstrado em infecções por *P. falciparum* (67). Por outro lado, o CD16, após ser estimulado, gera um perfil migratório nas DCs (68), cujo passo seguinte reside no processo de fagocitose e na apresentação de antígeno. Similarmente, o CD32, expresso em DCs do sangue, pode desempenhar um papel crucial na absorção de partículas estranhas e macromoléculas através de um mecanismo fagocítico, com posterior maturação destas células antes da apresentação de Ags para as células T (70, 71).

Outro receptor amplamente estudado é o CD36, também conhecido como receptor *Scavenger*, importante para o reconhecimento e a fagocitose nas DCs. Esta molécula é uma glicoproteína com capacidade de interagir com lipoproteínas de baixa densidade e está associada à resposta a vários antígenos, tais como: partículas de lipoproteínas, placa  $\beta$ -amiloide, bactérias e células apoptóticas (71), bem como à internalização de patógenos, como acontece em *Plasmodium* spp. (72). Em humanos foi descrito que o CD36 induz imunossupressão de DCs derivadas de monócitos e estimuladas com EP (eritrócitos parasitados) com *P. falciparum* ou com posterior estímulo com LPS (Lipopolissacarídeo, antígeno de bactéria e ligante do receptor TLR4), com pouca ou nenhuma produção de TNF- $\alpha$  e IL-12. (74, 75). Além da resposta a estímulos em contato direto com PAMPs, as DCs respondem a estímulos indiretos, como alguns componentes químicos (NiCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub> ou SnCl<sub>2</sub>), citocinas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias (74).

A ativação e posterior maturação das DCs levam à migração aos órgãos linfoides secundários, onde fragmentos de antígenos são apresentados carregados em moléculas do complexo de histocompatibilidade classe I e classe II (MHC-I e MHC-II) para linfócitos T



CD8 e CD4, respectivamente, sendo todos os peptídeos específicos capazes de direcionar uma resposta antígeno-específica (59).

### 1.8 Células dendríticas plasmocitóides

As pDCs desenvolvem-se na medula óssea e residem principalmente nos órgãos linfoides, compreendendo de 0,3 a 0,5% do total das células presentes no sangue humano ou nos órgãos linfoides de camundongos. As pDCs apresentam uma forma arredondada e são similares aos linfócitos B ativos. Além disto, as pDCs expressam baixos níveis de MHC-II e moléculas coestimuladoras (75). Em humanos, as pDCs são CD11c-, e em camundongos possuem uma baixa expressão dessa molécula (CD11c<sup>low</sup>). Entretanto, todas as pDCs são positivas para B220 (CD45RA), assim como os linfócitos B. Outros marcadores de superfície de pDCs são BSCA-2, ILT7 (*immunoglobulin-like transcript 7*), SiglecH murino, BST2, IL-3R $\alpha$  (CD123), BDCA-4, Ly6C murino e Ly49Q. As pDCs expressam moléculas de tipo TLR (*Toll like receptor*) 7 e 9, que respondem eficientemente a RNA de fita simples e CpG, respectivamente (76).

Estas células têm uma elevada capacidade de secreção rápida e abundante de interferon do tipo I, evidenciada *in vivo* após estímulo com CpG, e rápida produção de IFN- $\alpha$  e IL-12, além da apresentação de Ags (75). Esta resposta é exclusiva das pDCs e mediada por TLR, permitindo uma potente capacidade de recrutar e ativar outras células, tais como: NK e plasmócitos (75). Devido a este reconhecimento, as pDCs exercem uma atribuição crucial na resposta antiviral do sistema imune via TLR-7 e TLR-9, com posterior estimulação de células T (79, 80).

### 1.9 Células dendríticas convencionais

A subpopulação de células dendríticas convencionais (cDCs) está dividida em pequenos subconjuntos de células provenientes de tecido hematopoiético e é encontrada em tecidos linfoides e não linfoides. Elas são muito especializadas na detecção de lesões de tecidos, captura de antígenos associados a células, e processamento e apresentação de antígenos fagocitados para os linfócitos T CD4+ e CD8+. As cDCs são divididas em duas categorias: na primeira estão as chamadas cDCs migratórias, as quais estão geralmente nos tecidos periféricos, onde protegem contra múltiplos antígenos; a segunda categoria é compreendida

pelas cDCs residentes de tecido linfóide, as quais são encontradas nos principais órgãos linfóides como gânglios linfáticos, baço e timo.

As cDCs migratórias fagocitam o antígeno nos tecidos periféricos e direcionam-se aos tecidos linfóides secundários, como gânglios linfáticos ou linfonodos. Estas células podem ser divididas em cDCs CD11b<sup>+</sup> (DCs dérmica ou intersticial) e cDCs CD11b-CD103<sup>+</sup> (integrina  $\alpha$ E) (79). As cDCs CD103<sup>+</sup> nos pulmões são semelhantes às cDCs CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> residentes, com similar capacidade de captação antígenos, bem como apresentação destes (80).

As cDCs residentes podem ser classificadas pela expressão de marcadores de superfície, tais como CD4 e CD8 $\alpha$ . A presença ou a ausência destes marcadores gera uma série de categorias, dentre as quais se encontram as cDCs CD4<sup>+</sup>, as cDCs CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> e as cDCs CD4-CD8 $\alpha$ - (denominadas cDCs dupla negativa) (81).

As cDCs CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> são caracterizadas pela sua capacidade de apresentação de antígenos aos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e seu papel importante para a produção de citocinas com capacidade de induzir uma resposta citotóxica (79). Esta subpopulação de cDCs CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> é normalmente residente em órgãos linfóides, entretanto, foi observado nos pulmões que, na ausência de infecção, há uma subpopulação de DCs CD8 $\alpha$  que expressam CD103<sup>+</sup>, a qual é restrita à zona marginal do linfonodo mediastino drenante (NLM) no pulmão, mas não no tecido pulmonar (82). Assim, a subpopulação de cDCs CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> pode ser o resultado da migração das cDCs CD8 $\alpha$ -CD103<sup>+</sup> do pulmão, ativada pela fagocitose de antígenos e posterior maturação no NLM, após uma infecção (83). Assim, as cDCs CD103<sup>+</sup> residentes nos pulmões podem expressar CD8 $\alpha$  em resposta a uma infecção em associação com mudanças do ambiente pulmonar ainda desconhecidas no momento da migração aos NLM, o que pode explicar o processo de maturação, migração e aquisição de CD8 $\alpha$  em cDCs CD103<sup>+</sup> (84).

As cDCs CD4<sup>+</sup> e as cDCs CD4-CD8 $\alpha$ - têm capacidade de apresentação de Ags pelas moléculas MHC-I, mas são muito mais eficientes na apresentação de Ags mediante MHC-II, o que associa estas subpopulações à apresentação aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Quando estas subpopulações estão em estado imaturo apresentam uma alta capacidade endocítica e baixa expressão de moléculas de MHC-II (85). Todas as cDCs caracterizam-se pela sua permanência e sua localização estratégica nos tecidos linfóides e na região marginal do baço, onde podem ser mais eficientes na fagocitose de Ags, e posteriormente migrarem para a região dos linfócitos T nos linfonodos, para a rápida interação com os linfócitos T *naive* (63).

### 1.10 Células dendríticas derivadas dos monócitos

Como já demonstrado em humanos e em camundongos *in vivo*, as células dendríticas derivadas dos monócitos (moDCs) podem originar as cDCs. Assim, monócitos de tecidos infectados ou inflamados diferenciaram-se em cDCs, sendo esta subpopulação de DCs caracterizada como inflamatória (86). Além disto, mostrou-se que os monócitos são imprescindíveis na formação de DCs intestinais CD11b+CD103-(87), DCs esplênicas CD11b+ ESAMlo (88) e DCs musculares CD64+ (89). Quando os monócitos não são estimulados, expressam os receptores para o fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), Ly6c, CX3C e CX3CR1. Em condições *in vitro*, os monócitos suplementados com GM-CSF e estimulados com LPS rapidamente dão origem às cDCs totalmente diferenciadas (90).

Uma vez derivadas, as moDCs têm a capacidade de expressar moléculas tais como CD11c, MHC-II, CD24, SIRP $\alpha$  (CD172a), ICAM3, SIGN (CD209a) e perdem a expressão de receptores GM-CSF e Ly6c. Contudo, estas moDCs mantêm a expressão de alguns dos marcadores caraterísticos dos macrófagos, como MAC3 (CD107b ou LAMP2) (90). Assim, os monócitos são considerados uma fonte importante de DCs e recrutados na resposta imune contra alguns micro-organismos exerce uma função essencial na resposta inflamatória aguda (63). A eficiente taxa de captura de antígenos, processamento e capacidade de apresentação de antígenos demonstram que as moDCs são tão eficientes como as cDCs CD8 $\alpha$ + na apresentação cruzada de antígenos (apresentação de antígenos exógenos por parte de MHC-I) para as células T. Portanto, estas células representam um reservatório de emergência para uma resposta rápida contra antígenos que inicia a maquinaria da resposta imune (90).

### 1.11 Células de Langerhans

As células de Langerhans (CLs) são encontradas na periferia e apresentam a capacidade de migrarem para os gânglios linfáticos drenantes. Estas células, normalmente, são encontradas na epiderme humana e dos camundongos e sempre estão circulantes no tecido. As CLs têm a capacidade de divisão em qualquer momento, sem requerer um estímulo prévio. A taxa de mortalidade e seu tempo de vida não são conhecidos, entretanto, em princípio, estas células vivem cerca de sete dias, como acontece com as outras subpopulações de DCs. Em camundongos CD11c-DTR, depois da administração de toxina diftérica (DT), observou-se

que as CLs levaram mais tempo para recuperarem a quantidade original do que as populações de DCs presentes no baço, as quais demoraram apenas poucos dias (91).

Além disso, o sinal de proliferação nas CLs não é dependente de Flt3 ou de seu receptor. Até o momento, os mecanismos envolvidos na proliferação e diferenciação das CLs não estão esclarecidos e, provavelmente, estas células precisam migrar ao gânglio linfóide drenante para iniciarem a sua proliferação (92). No ensaio realizado em camundongos *knockout* para Flt3 ou Flt3L ou GM-CSF, os animais apresentam números normais de CLs *in vivo*, com uma diminuição muito grande das DCs nos órgãos linfóides. Entretanto, camundongos *knockout* para TGF $\beta$ -1 apresentaram deficiência de CLs. Apesar destes dados, os mecanismos de proliferação e diferenciação permanecem desconhecidos (92).

### 1.12 Células dendríticas e gravidez

As mudanças requeridas na fisiologia do corpo e o equilíbrio na relação dos perfis Th1 e Th2 é um paradigma do fenômeno de tolerância materno-fetal, vital no efetivo sucesso da gravidez (93). Durante a gestação ocorrem drásticas mudanças hormonais e aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e M-CSF. Este fato acarreta grandes mudanças no número, perfil de ativação e maturação das DCs (94). Possivelmente, a tolerância presente na gravidez está associada, entre muitas outras coisas, ao estado de imunossupressão induzido pela elevada liberação de IL-10 que acompanha a gestação, e que, de certa forma, protege os fetos contra ação do sistema imune materno mediante a tolerância imunológica (95). Outro fator que poderia estar envolvido na tolerância durante a gravidez é a ausência de expressão de IL-12 pelas DCs. Em camundongos *knockout* para esta citocina foi demonstrado que não ocorre a indução de Th1 por parte destas cDCs CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> (96). Este fato pode estar relacionado com a diminuição dos níveis de IL-12 produzida no útero acompanhada de um aumento dos níveis de IL-10 na maior parte da gestação, bem como uma diminuição das cDCs CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> no segundo trimestre da gestação (95). Por este motivo, as DCs poderiam desempenhar um papel crucial na mediação da imunidade e do equilíbrio entre a tolerância e a resposta imune contra o feto, o que foi demonstrado em DCs mielóides durante a gravidez, especialmente no terceiro trimestre, em que ocorre uma resposta à Th2 e às cDCs circulantes, que expressam CD86 e HLA-DR, e estão significativamente reduzidas, quando comparadas com mulheres não grávidas (97).

Por outro lado, pode-se identificar o recrutamento de subpopulações celulares da periferia para o baço durante a gravidez, sugerindo um aumento de determinadas populações

leucocitárias neste órgão, como as células T, em especial as reguladoras (Treg) (98). De forma semelhante, algumas subpopulações de células dendríticas do sangue periférico podem migrar para o baço, ou outros órgãos linfoides, evidenciando o papel importante desta célula na manutenção da tolerância à presença do embrião (58).

Tem sido mostrado que, durante o primeiro trimestre de gravidez, as cDCs e pDCs CD303+ periféricas apresentam altos níveis de B7-H1 e B7-H4, com posterior diminuição no terceiro trimestre, demonstrando a função dessas DCs na imunomodulação da tolerância durante a gravidez (99). Isto sugere que algumas destas subpopulações de DCs (cDCs CD8+ ou pDCs) produzem citocinas que permitem uma polarização para resposta Th1 no início da gestação, as quais podem gerar condições inflamatórias necessárias para a implantação do embrião. Em seguida, ocorre a mudança do perfil Th1 para o Th2, presumivelmente, devido à produção de IL-10 e diminuição de IL-12.

### 1.13 Células dendríticas e malária na gravidez

As células dendríticas têm uma alta capacidade para fagocitar, processar e apresentar antígenos de *Plasmodium* (102, 103). Diferentes grupos têm demonstrado inibição da ativação e da maturação das DCs durante a infecção por *Plasmodium* spp. (102). Isso, provavelmente, pode explicar as diferenças nos perfis das subpopulações de dendríticas nos diferentes momentos analisados. Já foi reportado que, em presença de eritrócitos parasitados, as DCs são afetadas pela hemozoína, interferindo diretamente no funcionamento destas células. A hemozoína não só inibe a expressão de moléculas de MHC-II, bem como das moléculas coestimuladoras CD80 e CD40 (104, 105).

As DCs são responsáveis pela apresentação de antígenos e desempenham uma função central, promovendo a ligação entre a imunidade inata e a adaptativa. No decorrer da gestação, estas células são responsáveis por mediar o balanço entre a imunidade e a tolerância, determinando o tipo de resposta (Th1/Th2) (97). Durante a malária gestacional, há uma redução das pDCs na circulação sanguínea, alterando o equilíbrio imunológico e gerando este desbalanço Th1/Th2. Esta diminuição pode ser devido à migração destas células para o baço ou outros órgãos linfoides, os quais evidenciam um papel primordial na manutenção da tolerância à presença do embrião (106, 100). Durante gestação também se observa uma modulação na expressão de CD36 em resposta ao parasito, que conseqüentemente interfere na capacidade fagocítica por parte das DCs (105). Convém lembrar que o CD36 medeia o sequestro do *Plasmodium* nos pulmões e nos tecidos adiposos de camundongos (72). Além

disto, o CD36 pode interagir com uma grande variedade de ligantes, tais como partículas de lipoproteínas, placa  $\beta$ -amiloide, bactérias e células apoptóticas (71). Também foi descrita a função do CD36 como um dos principais receptores de aderência de EP e sequestro de parasitos nos endotélios microvasculares (105,106), que sugere um mecanismo de tolerância, permitindo a sobrevivência do parasito no interior das diferentes subpopulações de DCs.

Além disso, as mutações de CD36 em populações endêmicas têm sido relacionadas à proteção da malária grave ou da susceptibilidade a doença (109, 110), possivelmente, pelas características imunológicas ou genéticas do hospedeiro e na dinâmica da infecção. Em humanos, o CD36 de DCs estimuladas com EP com *P. falciparum* mostraram uma redução na resposta imune, com pouca ou nenhuma de produção de TNF- $\alpha$  e IL-12 em resposta à estimulação dos EP ou posterior estímulo com LPS (111, 56).

As mulheres gestantes apresentam uma diminuição no numero absoluto e na maturação das DCs no sangue periférico, no sangue do cordão e no sangue de placenta, com uma diminuição das cDCs nestes órgãos (57, 58). Quando estas são expostas à malária, pode ser evidenciada uma diminuição das DCs na placenta, especialmente as pDCs as quais mantêm-se diminuídas nestes três compartimentos, além de um aumento das DCs imaturas. Ao mesmo tempo, na presença de infecção nestas gestantes, há um decréscimo de MHC-II em pDCs e cDCs. Estas mudanças na ativação das subpopulações de DCs são seguidas de um aumento de IL-10 durante a malária na gravidez, o que poderia explicar os efeitos na perda do equilíbrio Th1/Th2 (58).

As mudanças nas frequências de DCs e no perfil de ativação são acompanhadas de mudanças em algumas populações celulares durante a infecção por plasmódio na gravidez. Assim, evidenciou-se que as células CD45RO *memory-like* e as células T CD4+ foram mais frequentes no sangue periférico do que na placenta, enquanto as células NK CD56+/CD3- apresentaram um aumento na placenta e uma diminuição na periferia, sendo que a expressão de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) foi dramaticamente aumentada na placenta de mulheres grávidas infectadas por plasmódio (110).

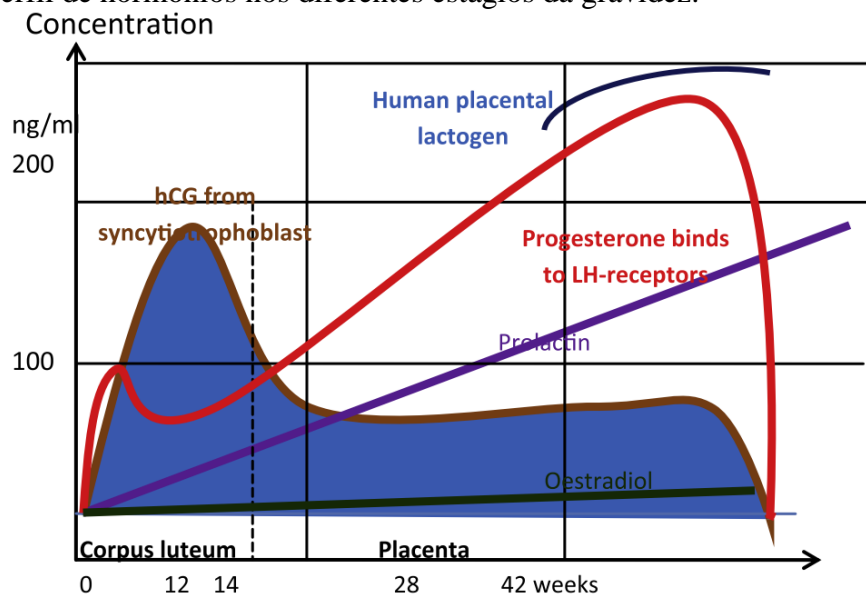
O aumento da produção de IL-10, IFN-  $\gamma$  e a diminuição de IL-12 na placenta, além, das mudanças na frequência das DCs, células T CD4+, NK e células CD45RO, podem induzir a maior migração das DCs ou outras células apresentadoras de antígenos para os órgãos linfoides. Assim, o microambiente destes compartimentos e a apresentação dos antígenos de plasmódio circulantes podem desencadear uma resposta específica contra o parasito na gravidez.

### 1.14 Hormônios e gravidez

Alguns hormônios como progesterona (P4) e estrógeno são importantes não só no controle do ciclo menstrual, como também na manutenção da gravidez. Os hormônios como P4 e estrógeno (estrone; E1, estradiol; E2, estriol; E3) são produzidos durante a gravidez em diferentes níveis. A gravidez inicia com o aumento de progesterona e estrógeno, preparando o endométrio para permitir a implantação do embrião (111), além de regular as células imunológicas da mãe para gerarem tolerância ao feto (112).

Uma vez fecundado o óvulo, inicia-se o processo de implantação do embrião, seguido da formação do *corpus luteum* com a produção de somatomamotropina coriônica humana (CS) e gonadotropina coriônica humana (hCG), e aumento de ocitocina, renina e prostaglandina no plasma. O hCG vai se reduzir depois da 14<sup>a</sup> semana de gestação e até o final desta mantém baixos níveis. Assim, o citotrofoblasto e o sincitiotrofoblasto iniciam com o processo de infiltração e invasão do endométrio e geram as células trofoblásticas das vilosidades coriônicas. Após 14 semanas, estas células terminam gerando a placenta, a qual se caracteriza pela alta capacidade de produzir uma variedade de hormônios esteroides, peptídicos e proteicos. Neste órgão, as células sincitiotrofoblásticas mantêm o contato direto com o sangue materno e expressam hCG, CS, pró-opiomelanocortina coriônica e progesterona. A produção de progesterona aumenta com a formação da placenta até o fim da gestação e a diminuição da progesterona está associada com o início do parto (**Figura 5**) (113).

**Figura 5** - Perfil de hormônios nos diferentes estágios da gravidez.



Fonte: Nair et al., 2017.

Alguns destes hormônios estão associados com seu efeito em algumas células do sistema imunológico e seu papel nas mudanças do balanço Th1/Th2, característicos na gravidez. Assim, as citocinas presentes no percurso da gestação são secretadas por células imunológicas presentes ou ausentes na decídua da placenta e, ao mesmo tempo, estas células imunológicas são reguladas e imunomoduladas pela progesterona e pelo estrógeno. Após a incubação de células dendríticas maduras e imaturas com progesterona e estradiol foi demonstrado um aumento da expressão de IL-10. Por outro lado, diversas combinações destes hormônios provocam a diminuição da produção de IL-18 pelas DCs maduras (114). Este fenômeno é visto em diversas células do sistema imunológico, como mostrado na **Tabela 1**, modulando a resposta imune inata e adaptativa.

**Tabela 1** - Hormônios na gestação e seu efeito nas células imunológicas.

Células imunológicas	Citocinas ou fatores secretados	Regulação hormonal	Referências
Macrófago M1(CD14+CD68+)	IL-12, IL-6, TNF- $\alpha$	Estrógeno	(115, 116)
Macrófago M2 (CD14+CD163+)	IL-4, IL-10. Redução IL-1, ON Angiotensina II	Progesterona hCG-beta	(115, 116) (117)
Macrófagos da interface materno-fetal	Redução NO, iNOS VEGF	Estrógeno/Progesterona Estrógeno/hCG/LH	(118) (118)
Célula supressora mieloide CD11b+CD33b+HLA-DRlow/neg	IL-10, TGF $\beta$	PGE2	(119, 120)
Célula uterina NK CD56bright/CD16low	IL-10, TGF $\beta$	Estrógeno, progesterona	(121, 122)
DCs maduras CD45+HLA-DR+CD80/86	IL-10, TGF $\beta$	Progesterona	(123)
DCs da interface materno-fetal (CD11c+)	IL-10, redução IL-12 e IL-18	Progesterona, hCG	(118, 124, 114)
DCs CD11c+ CD11b+	IL-12, IL-1. IL-6 Redução IL-12, IL-1. IL-6	Estrógeno Progesterona	(125)
pDCs	Diminuição CD54, CD86 e TNF- $\alpha$	Progesterona	(126)
DCs maduras	IL-10 com diminuição MHC-II, CD80, CD86 e IL-2	Progesterona	(124)
Células mastócitos uterinas (uMC)	iNOS, TNF- $\alpha$	Estrógeno Progesterona	(118)
Treg CD4+CD25+FOXP3+	IL-10, TGF $\beta$ Supressão INF- $\gamma$ e TNF- $\alpha$	hCG, LH hCG	(127) (128)
Linfócitos B	Não definida Anticorpos assimétricos	hCG Progesterona	(129) (113)
Th1/Th2	Balanço multiplex citocinas	Estrógeno/progesterona	(130)
Linfócitos T	IL-2, IL-4	Progesterona/PHA	(128)
Linfócitos T efetores	Fator inibidor de leucemia (LIF)	Progesterona/Glycodelina A	(131)
Linfócitos T CD8+ CD122+	Hmox1 placentária	Progesterona	(132)



### 1.15 Hormônios e malária na gravidez

Uma característica bem descrita na gestação refere-se às mudanças fisiológicas do sistema imunológico geradas pela produção de diversos hormônios, cujo propósito é gerar certas condições necessárias para tolerar e proteger o feto deste arsenal de defesa tão eficiente e sensível que é o sistema imune. Tais mudanças geram, por sua vez, uma aguda susceptibilidade das gestantes a múltiplas doenças, conforme observado em *Plasmodium*, em que a supressão da resposta imunológica encontra-se associada às trocas hormonais na gestação (133).

Essas alterações nos níveis de alguns hormônios na gestação podem modular a função de algumas destas células, como verificado nos esplenócitos de camundongos infectados com *P. berghei*, os quais, na presença de corticosterona, mostraram uma redução na sua capacidade da resposta e de proliferação (134). De forma similar nas mulheres gestantes, os níveis de cortisol mostram um aumento no segundo trimestre de gestação e são ainda mais elevados em gestantes infectadas com *P. falciparum* como foi mostrado em um grupo de gestantes no Quênia (135). De forma similar, confirmou-se, na hora do parto, uma correlação positiva da concentração de cortisol com a carga parasitária, e uma correlação negativa entre a capacidade citolítica das NK com relação aos níveis de cortisol, sendo uma forte evidência de que o cortisol poderia favorecer a susceptibilidade da malária na gestação (136). Esses dados foram confirmados em um grupo de 59 mulheres gabonesas infectadas com *P. falciparum*, nas quais foi identificada uma associação nos altos níveis de cortisol em primigrávidas com o aumento da parasitemia e maiores complicações patológicas pela falta de uma resposta imunológica eficiente (137).

O contrário acontece com a prolactina, onde a presença da infecção foi associada com níveis significativamente mais baixos deste hormônio e de INF- $\gamma$  no soro de um grupo de gestantes com malária por *P. falciparum*, não complicada, no Sudão (138). Outros estudos mostram que, à medida que a gestação avança, pode-se evidenciar níveis mais elevados de prolactina, sendo associada a um efeito imunomodulador. No entanto, até o momento não é clara a relação entre os níveis de prolactina e a infecção com *P. falciparum* (140).

Além disso, notou-se que a infecção por *P. falciparum* reduz as concentrações de estrógeno no final da gravidez (139). São múltiplos os estudos que mostram o efeito deste hormônio na resposta de células do sistema imunológico (140) e como os elevados níveis podem estar associados com a ativação da resposta contra infecções. Neste sentido foi demonstrada a redução de *P. chabaudi* em camundongos C57BL/6 os foram tratados com

estrógeno subdermico por 21 dias, o tratamento induz o um aumento da atividade do óxido nítrico sintase (NOS) (141). Estes dados foram corroborados em camundongos CBA infectados com *P. berghei* ANKA, sendo observado o aumento de NOS na medida em que foi administrado estrógeno (142). Oportuno dizer que o estrógeno induz um aumento das respostas de imunoglobulina G (IgG1) anti-*P. chabaudi* em modelo usando C57BL/6, sendo uma evidência de que este hormônio intensifica a resposta imunológica e protege as mulheres durante a infecção por plamódio (141).

Outro hormônio importante é a progesterona, considerado o hormônio da gravidez por ser essencial para o sucesso reprodutivo devido a seus efeitos regulatórios na ovulação, fertilização e implantação (143). Ensaios feitos em camundongos mostraram que, quando submetidos a estresse, induz-se um processo abortivo pelo aumento dos níveis de citocinas Th1 e diminuição da progesterona. Entretanto, quando esses animais são suplementados com progesterona e, mantêm-se os níveis normais deste hormônio durante a gestação, gera-se uma resposta antiabortiva mediada pela sinalização dos receptores de progesterona. Desta maneira, induz-se a liberação do fator de bloqueio mediada pela progesterona (PIBF) nos linfócitos, favorecendo a produção de citocinas do tipo Th2, e assim conferindo proteção ao feto (144).

Outros estudos realizados em mulheres gestantes mostram que no caso de malária por *P. falciparum* foi evidenciada uma diminuição de progesterona no plasma do sangue periférico e da placenta das mulheres infectadas com relação às não infectadas, acompanhado de um aumento de IL-1 $\beta$  na placenta, bem como um aumento de INF- $\gamma$  (145) e IL-17 no plasma do sangue periférico. A diminuição dos níveis de progesterona plasmática e o aumento destas citocinas provocam a diminuição da hemoglobina materna, bem como os níveis de HDL-C. Este resultado pode estar associado há um dos desfechos negativos da malária gestacional que é o retardo de crescimento uterino e o consequente baixo peso dos bebês ao nascerem (145).

Muitos estudos têm definido as manifestações clínicas da malária gestacional nos últimos anos, no entanto, os mecanismos celulares que conduzem à patologia ainda permanecem obscuros. Uma possível explicação para isto é que estudos em humanos, embora sejam muito importantes, não são suficientes, devido às limitações óbvias intrínsecas aos sistemas experimentais humanos e à acessibilidade ao material biológico nos diferentes estágios da gestação. Assim, os modelos murinos oferecem a possibilidade de estudo dos tipos celulares potencialmente envolvidos na recrudescência da malária experimental durante a gravidez, em condições experimentais, definidas e controladas.

Modelos experimentais murinos de infecção por plasmódio vem sendo utilizados pelo nosso grupo de pesquisa no estudo das populações e mediadores imunológicos que participam no controle do parasito, bem como na análise dos fatores que propiciam o estabelecimento de lesões nos diferentes tecidos (46, 146). Estes modelos permitem conhecer os elementos envolvidos na recrudescência associada à malária gestacional em um sistema experimental que represente um bom modelo animal da enfermidade humana.

Assim, face ao quase completo desconhecimento dos elementos determinantes da recrudescência da malária, o presente projeto teve como objetivo final a compreensão do papel das células dendríticas no recrudescimento da infecção durante o período gestacional.

## **2 OBJETIVOS**

## 2.1. Objetivo Geral

Este estudo tem como objetivo investigar a relação das células dendríticas com o processo de recrudescência da malária durante a gestação.

## 2.2. Objetivos específicos

i) Determinar o local de sequestro do parasito quando o camundongo está em estado crônico da infecção;

ii) Avaliar as subpopulações de DCs mais frequentes nos órgãos que sequestram o parasito em diferentes grupos experimentais;

iii) Identificar os diferentes marcadores de ativação das DCs nos órgãos que sequestram o parasito em diferentes grupos experimentais;

iv) Comparar a capacidade fagocítica das DCs provenientes de camundongos prenhes e não prenhes.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### 3.1 Animais e parasitos

Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas, com idade entre 6 e 8 semanas, fornecidos pelo Biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os camundongos são criados e mantidos em estantes ventiladas sob condições controladas de temperatura, umidade, iluminação e alimentados com dieta regular. Todos os procedimentos estão de acordo com o Regulamento Nacional de Bem-estar e Experimentação Animal, autorizados pelo Comitê de Bem-estar Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (n°. 47, fls. 07, Livro 03).

Com o propósito de padronizar um modelo de recrudescência e implementá-lo com diferentes parasitos, foram utilizados camundongos BALB/c e as cepas de *Plasmodium murino*: *P. berghei ANKA*<sup>GFP/Luciferase</sup> (expressa constitutivamente a proteína fluorescente verde-GFP e a enzima luciferase); *P. berghei ANKA*<sup>GFP</sup> (expressa somente GFP), que foram gentilmente cedido pelo Dr. Chris J. Janse (Leiden University Medical Center, Leiden, Holanda); e a cepa *P. berghei ANKA*<sup>GFP/HSP70</sup> (expressa GFP de forma constitutiva com a ajuda do promotor da proteína HSP-70), cedido pelo Dr. Rogério Amino (Instituto Pasteur, França).

Assim, para cada experimento, um camundongo BALB/c foi infectado via intraperitoneal (i.p.) com  $10^6$  eritrócitos parasitados (EP), obtidos de estoques congelados. Posteriormente, quando a parasitemia atingiu entre 5 e 10%, o sangue do animal foi utilizado para infectar os camundongos utilizados na experimentação. Todos os animais foram infectados com  $10^4$  eritrócitos parasitados, via i.p. A partir do dia 7 pós-infecção, cada animal foi tratado por via i.p. com 0,7mg de cloroquina por dia, durante três dias. Foram estabelecidos, para as análises, os dias 7 (primeiro pico de parasitemia), 16 (dia em que os camundongos controlaram o primeiro pico de parasitemia), 22 (segundo pico de parasitemia quando os animais apresentam a máxima parasitemia), 50 (dia em que os animais controlaram o segundo pico de parasitemia). Os animais crônicos foram analisados no dia 19 da prenhez (momento em que os embriões encontram-se na fase final de desenvolvimento) (**Figura 6A**).

### 3.2 Níveis de parasitemia

A parasitemia foi quantificada por citometria de fluxo utilizando como marcador o GFP expresso constitutivamente pelo parasito. Assim, para quantificá-la foram coletados 2

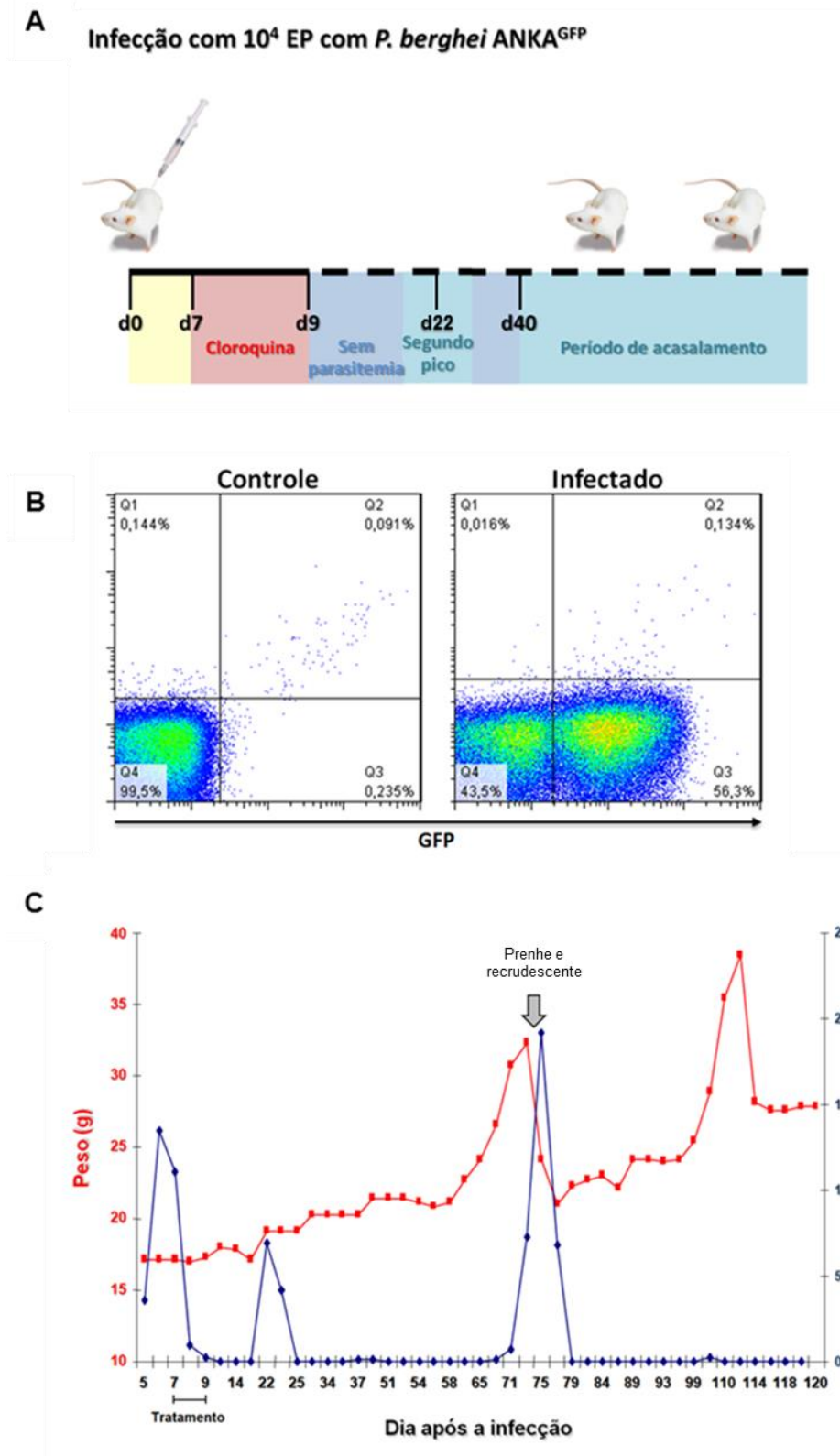
uL de sangue procedentes da cauda dos animais e adicionados em 400 uL de *staining buffer* (*Phosphate Buffered Saline*-PBS 1x, 2% de Soro Fetal Bovino - SFB e 0,05% de azida sódica). As amostras foram analisadas no citômetro utilizando o canal FL1 para mensurar a expressão de GFP e posteriormente analisadas com o *software* FlowJo versão X 10.0.7r2 (**Figura 6B**).

### 3.3 Análise da recrudescência e monitoramento da prole

Quarenta e quatro dias após a infecção, as fêmeas tratadas foram divididas em dois grupos: um grupo foi colocado com machos para acasalar; o segundo grupo, de fêmeas não acasaladas, foi utilizado como controle. A detecção de tampão vaginal e a medição do peso corporal foram utilizadas conjuntamente para monitorar o tempo de prenhez, como previamente descrito por Neres e colaboradores (146). O dia de detecção do tampão vaginal é considerado o primeiro dia gestacional (G1). A prenhez foi confirmada entre G10 e G13, quando os animais apresentam um aumento médio de peso de 3-4 g (**Figura 6C**). Assim, o ganho de peso é considerado como um sinal de prenhez e a perda súbita de peso é indicador de injúria ou interrupção da prenhez. No dia G19, as fêmeas foram sacrificadas e, em seguida, foram realizadas as necropsias para a coleta de amostras de diferentes órgãos (baço, fígado, rins, pulmões, cérebro, tecido adiposo, sangue periférico, medula e placentas dos camundongos prenhes), armazenados em RNALater (Ambion®) ou congelados em O.C.T. (Tissue Tek®), para posterior análise de expressão gênica por qRT-PCR e estudos da patologia, respectivamente. Tecidos provenientes de fêmeas prenhes não infectadas foram utilizados como controles.



**Figura 6** - Protocolo experimental com uso de parasitos GFP



(A) Os animais BALB/c foram infectados por via intraperitoneal com  $10^4$  E.P. por *P. berghei* GFP. O dia de infecção foi considerado d0. O tratamento com cloroquina (0,7mg/dia/animal) ocorreu durante três dias, a partir do d7 (7 dias após a infecção). O acasalamento ocorreu a partir do d50. (B) Quantificação da porcentagem de EP, positivos para GFP, foi realizada por citometria de fluxo. (C) Representação indicando a prenhez pelo peso (g) e a recrudescente pela porcentagem de parasitemia. Protocolo desenvolvido por este grupo de estudo (147).

### 3.4 Localização de sítios de sequestro do parasito mediante a quantificação da atividade da luciferase

As fêmeas BALB/c foram infectados com a cepa de *P. berghei* expressando proteína de fusão sob o controle do promotor-eef1a (GFP-Luciferase - 676m1c11 clone). Foi determinada a atividade da luciferase em animais crônicos, agudos e prenhez recrudescentes para o parasito, como previamente descrito (72). Utilizando-se o dispositivo IN VIVO Imaging System (IVIS 100, Xenogen), imagens da atividade da luciferase foram visualizadas em todo o corpo de camundongos íntegros ou órgãos dissecados. Cada fêmea recebeu uma injeção via i.p. com 100 mg/kg de peso corporal de d-luciferina (SYNCHEM, USA) diluídas em PBS 1x. Após 5 minutos, a fêmea foi submetida à eutanásia por narcose de CO<sub>2</sub> e a imagem de bioluminescência foi adquirida após uma exposição de 10-60 s. Idêntico procedimento foi utilizado para os órgãos analisados separadamente.

### 3.5 Quantificação da carga parasitária por qRT-PCR

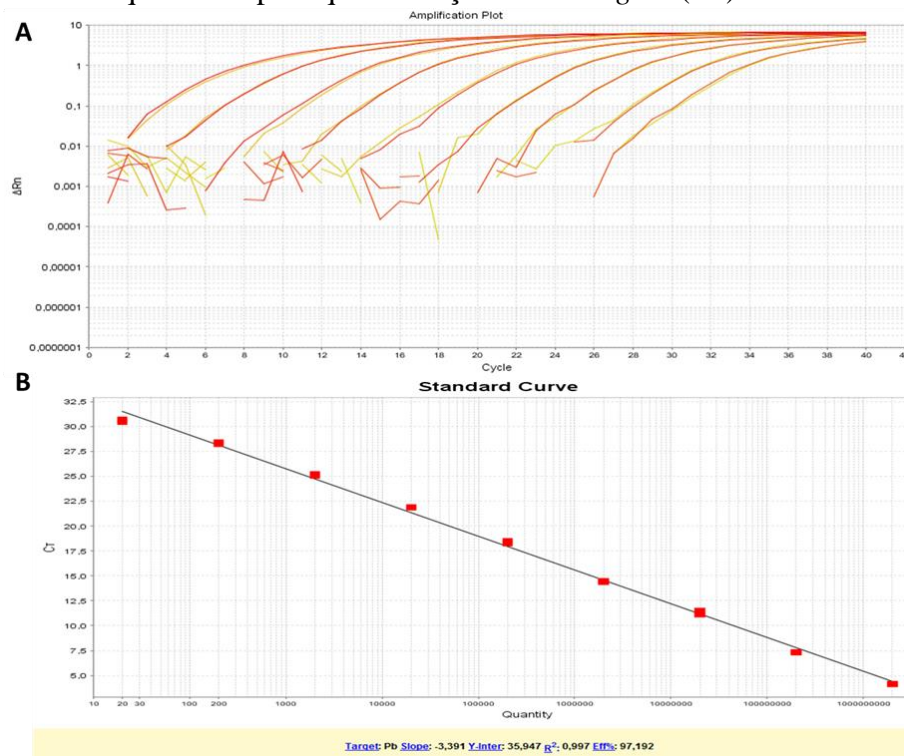
Amostras dos diferentes tecidos foram congeladas em nitrogênio líquido, maceradas e tratadas com Trizol a -80°C. O RNA total foi extraído utilizando-se o Kit RNeasy Micro® (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante para tecidos e células animais “Animal Cell 1”. Um micrograma de RNA total foi convertido em cDNA (TaqMan ® Reverse Transcription *Reagents, Applied Biosystems*) usando *primers* que amplificam a sequência 5’ – CCG ATA ACG AAC GAG ATC TTA ACC TGC TAA TTA GCG GCG AGT ACT CTA TAT CCT TTA TTG GGA GAT TGG TTT TGA CG – 3’. A qRT-PCR foi realizada utilizando-se o sistema Taqman© (Applied Biosystems) com sondas específicas para o *P. berghei* (AI 38261, PN 4332079). Como *housekeeping* foi utilizado o Mouse GAPDH do sistema Taqman© (*Applied Biosystems*), para quantificar a expressão do parasito e a qualidade do RNA foram desenvolvidas duas curvas, uma para *P. berghei ANKA<sup>GFP</sup>* e outra para GAPDH do camundongo, as curvas foram feitas num fator de diluição de 1:10 iniciando em 2x10<sup>9</sup> cópias/mg de tecido até 20 cópias/mg de tecido.

### 3.6 Padronização da quantificação de *P. berghei ANKA<sup>GFP</sup>* por qRT-PCR

Para fazer a curva para *P. berghei ANKA<sup>GFP</sup>* foram desenhados dos *primers* externos ICB-Pb1-5’-ATGGCCGTTTTTAGTTCGTG-3’ (*forward*) e ICB-Pb2 5’-

GGCATGTCGTAAACGAAAGA-3' (*reverse*), que amplificaram um fragmento de 197 bp. Esse fragmento foi purificado a partir do gel de agarose utilizando o *kit* de purificação de DNA de géis de agarose QIAEX® II (QIAGEN). Após a quantificação e a determinação do tamanho do fragmento e a informação da sequência, foi determinado o peso molecular do fragmento para a sua posterior quantificação e determinação do número de cópias contido na amostra. A curva foi feita utilizando-se um fator de diluição de 1:10 iniciando-se em  $2 \times 10^9$  cópias/mg de tecido até 20 cópias/mg de tecido. A qRT-PCR foi realizada utilizando-se o sistema Taqman® (*Applied Biosystems*) com sondas específicas para o *P. berghei* (AI 38261, PN 4332079) para o desenho da curva (**Figura 7**).

**Figura 7** - Curva de qRT-PCR para quantificação de *P. berghei* (*Pb*) ANKA<sup>GFP</sup>



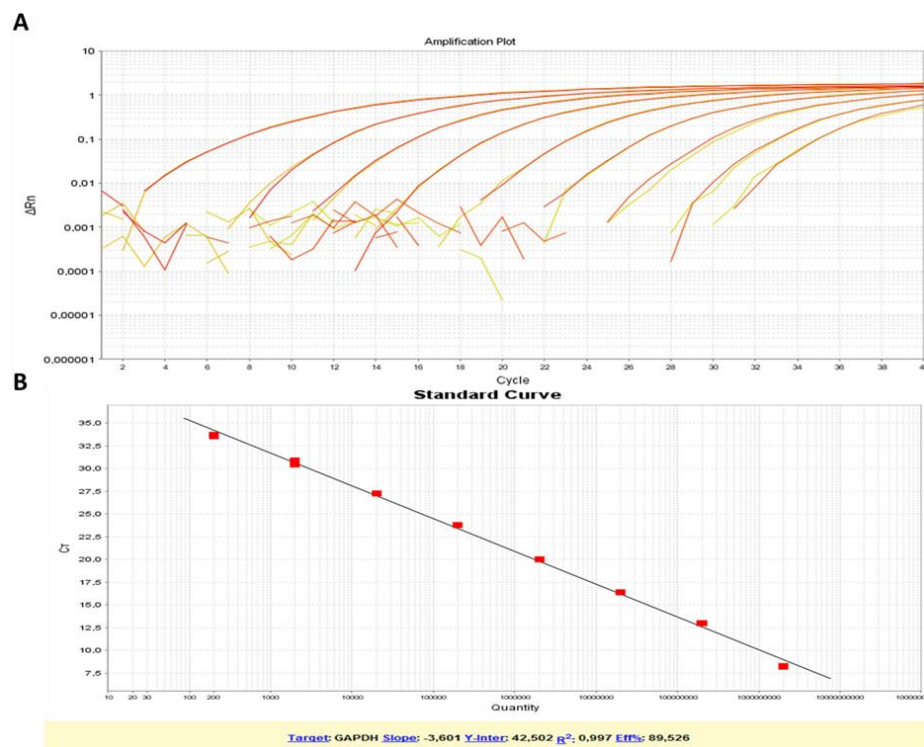
(A) Plot de qRT-PCR para as diluições seriadas (1:10) de  $2 \times 10^9$  até 20 cópias/uL. (B) Curva padrão: Slope: -3,391; Y-inter: 35,947;  $R^2$ :0,997; Eff%: 97,192.

### 3.7 Clonagem do GAPGH de camundongos e construção da curva padrão para a sua quantificação

Para o desenho desta curva, fez-se uma PCR convencional utilizando o *kit* Mouse GAPDH do sistema Taqman® (*Applied Biosystems*) de acordo com as condições recomendadas pelo *kit*. Posteriormente, foi feita uma extensão adicional de 72°C por 30 minutos para gerar extremos Poli-A no fragmento e, em seguida, o fragmento de GAPDH de tamanho conhecido foi clonado utilizando o *kit* TOPO® TA Cloning® (*Invitrogen*). O clone

foi selecionado e expandido em *E. coli* e o fragmento purificado utilizando o *kit* QIAprep® Spin Miniprep (QIAGEN). Em sequência foi amplificado com o Kit Mouse GAPDH do sistema Taqman© (*Applied Biosystems*), numa PCR convencional. Após quantificado e de posse do tamanho do fragmento e da informação da sequência, determinou-se o peso molecular do fragmento para a sua posterior quantificação e determinação do número de cópias contido na amostra. A curva foi feita utilizando-se um fator de diluição de 1:10 iniciando em  $2 \times 10^9$  cópias/mg de tecido até 20 cópias/mg de tecido (**Figura 8**).

**Figura 8** - Curva de qRT-PCR para expressão do gene controle GAPDH



(A) Plot de qRT-PCR para as diluições seriadas (1:10) de  $2 \times 10^9$  até 20 cópias/uL (B) Curva padrão: Slope: -3,601; Y-inter: 42,502; R<sup>2</sup>:0,997; Eff%: 89,526.

### 3.8 Análise histológica e morfométrica da placenta

As análises histológicas e morfométricas das placentas foram realizadas como descrito previamente por Neres e colaboradores (146). Em resumo, esta pesquisadora realizou a quantificação do espaço vascular de secções da placenta coradas com H&E. Em cada secção, três regiões dos espaços intervillares foram selecionadas randomicamente e imagens (com aumento de vinte vezes) foram obtidas, utilizando-se uma câmera colorida Zeiss (Axio Cam HRc) conectada a um microscópio de luz Zeiss (Axio imager. M2). Para a análise morfométrica, foi utilizado o programa Image J. Após a aquisição das imagens, estipulou-se um limite de cores para as imagens que cobrissem as áreas correspondentes ao espaço

vascular. A porcentagem das áreas cobertas foi calculada pela razão entre o número de pixels cobertos na área estipulada e o total de pixels da imagem. A área vascular de cada placenta foi estimada pela análise de dois cortes não consecutivos. Os resultados apresentados correspondem a fêmeas prenhes individuais e representam um resultado médio entre três e nove placentas por fêmea.

### 3.9 Isolamento de esplenócitos

Os baços dos diferentes grupos de animais foram coletados, pesados, lavados em solução de PBS 1x e, posteriormente, colocados em meio RPMI (Gibco) completo (0,5% de L-glutamina, 0,2% de bicarbonato, 0,596% de HEPES e 3% de FBS). Com o auxílio de um êmbolo de seringa e filtros *cell strainer* (70 µm), o baço foi macerado e os esplenócitos foram mantidos em gelo, sem a matriz tecidual. A suspensão celular foi centrifugada a 1.200 rpm (rotações por minuto) por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 1 mL de RPMI 1640 completo para quantificar o número de células e, para posterior análise por citometria de fluxo.

### 3.10 Isolamento de células de pulmão

Para a obtenção de células pulmonares, a princípio, utilizou-se o seguinte protocolo: os pulmões (incluindo os nódulos linfáticos mediastínicos, pois é importante comparar subpopulações celulares similares existentes em baço e órgãos linfoides) das fêmeas dos diferentes grupos de animais utilizados foram lavados em solução de PBS e mantidos em meio RPMI 1640 (Gibco). Com o auxílio de pinças curvas e tesouras, os pulmões foram cortados em pequenos fragmentos e mantidos em gelo. Logo após os fragmentos foram incubados em 4 mL de solução de digestão, composta por 0,2 mg/mL de colagenase 2 em RPMI completo, e incubados a 37°C em 5% CO<sub>2</sub>, por 40 minutos sob agitação. Em seguida foram macerados com auxílio de um êmbolo de seringa em *cell strainer*. O homogenato, agora sem a matriz tecidual, foi centrifugado a 1.200 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 1 mL de RPMI completo e centrifugado a 1.200 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspenso em meio RPMI completo para estimar o número total de células e para posteriores análises por citometria de fluxo.

### 3.11 Caracterização das diferentes subpopulações de células dendríticas (DCs)

Para caracterizar as DCs por citometria de fluxo foi utilizado o citômetro BD LSRFortessa, os dados foram adquiridos com o *software* DIVA versão 6.0 e analisados com o *software* FlowJo versão X 10.0.7r2. Para identificar as diferentes subpopulações de DCs presentes no baço e nos pulmões, bem como seus perfis de ativação, foram utilizados os seguintes painéis de anticorpos específicos (**Tabelas 2 e 3**):

**Tabela 2** - Painel de anticorpos utilizado para a fenotipagem das células dendríticas plasmocitóides (pDCs)

	FITC	PE	PreCP	APC	PECy7	APCCy7	Pacific blue	V500
1	GFP	CD3 (Hamster anti-mouse clone 500A2 BD) /CD19 (Rat anti-mouse clone 1D3 BD)	CD80 (Hamster anti-mouse clone 16-10A1 BD)	Ter119 (Rat anti-mouse clone TER-119 BD)	CD11c (Hamster anti-mouse clone HL3 BD)	B220 (Rat anti-mouse Clone RA3-6B2 BD)	CD4 (Rat anti-mouse clone RM4-5 BD)	IA-d (Mouse anti-mouse clone 39-1010-8 BD)
2	GFP	CD3 (Hamster anti-mouse clone 500A2 BD) /CD19 (Rat anti-mouse clone 1D3 BD)	CD80 (Hamster anti-mouse clone 16-10A1 BD)	CD86 (Rat anti-mouse clone GL1 BD)	CD11c (Hamster anti-mouse clone HL3 BD)	B220 (Rat anti-mouse Clone RA3-6B2 BD)	CD4 (Rat anti-mouse clone RM4-5 BD)	IA-d (Mouse anti-mouse clone 39-1010-8 BD)
3	GFP	CD3 (Hamster anti-mouse clone 500A2 BD) /CD19 (Rat anti-mouse clone 1D3 BD)		CD36 (Mouse anti-mouse clone CRF D-2712 BD)	CD11c (Hamster anti-mouse clone HL3 BD)	B220 (Rat anti-mouse Clone RA3-6B2 BD)	CD4 (Rat anti-mouse clone RM4-5 BD)	IA-d (Mouse anti-mouse clone 39-1010-8 BD)
4	GFP	CD3 (Hamster anti-mouse clone 500A2 BD) /CD19 (Rat anti-mouse clone 1D3 BD)		CD16/CD32 (Rat anti-mouse clone 2.4G2 BD)	CD11c (Hamster anti-mouse clone HL3 BD)	B220 (Rat anti-mouse Clone RA3-6B2 BD)	CD4 (Rat anti-mouse clone RM4-5 BD)	IA-d (Mouse anti-mouse clone 39-1010-8 BD)
5	GFP	CD3 (Hamster anti-mouse clone 500A2 BD) /CD19 (Rat anti-mouse clone 1D3 BD)		CD40 (Rat anti-mouse cat: 558695 BD)	CD11c (Hamster anti-mouse clone HL3 BD)	B220 (Rat anti-mouse Clone RA3-6B2 BD)	CD4 (Rat anti-mouse clone RM4-5 BD)	IA-d (Mouse anti-mouse clone 39-1010-8 BD)

**Tabela 3** - Painel de anticorpos utilizado para a fenotipagem das células dendríticas convencionais (cDCs)

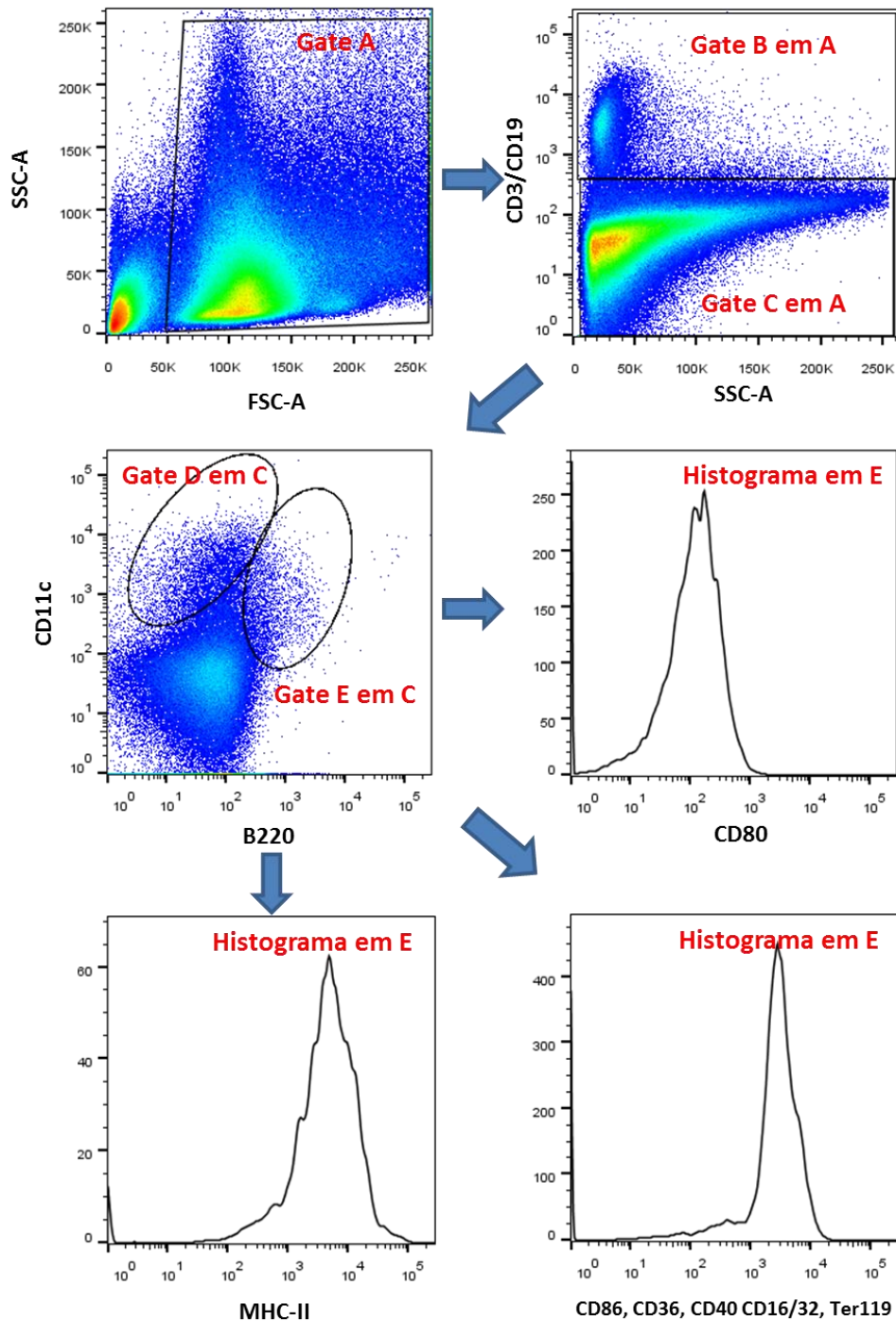
	FITC	PE	PreCP	APC	PECy7	APCCy7	Pacific blue	V500
1	GFP	CD3 (Hamster anti-mouse clone 500A2 BD) /CD19 (Rat anti-mouse clone 1D3 BD)	CD8 (Rat anti-mouse Clone 53-6.7 BD)	Ter119 (Rat anti-mouse clone TER-119 BD)	CD11c (Hamster anti-mouse clone HL3 BD)	CD11b (Rat anti-mouse clone M1/70 BD)	CD4 (Rat anti-mouse clone RM4-5 BD)	IA-d (Mouse anti-mouse clone 39-1010-8 BD)
2	GFP	CD3 (Hamster anti-mouse clone 500A2 BD) /CD19 (Rat anti-mouse clone 1D3 BD)	CD8 (Rat anti-mouse Clone 53-6.7 BD)	CD86 (Rat anti-mouse clone GL1 BD)	CD11c (Hamster anti-mouse clone HL3 BD)	CD11b (Rat anti-mouse clone M1/70 BD)	CD4 (Rat anti-mouse clone RM4-5 BD)	IA-d (Mouse anti-mouse clone 39-1010-8 BD)
3	GFP	CD3 (Hamster anti-mouse clone 500A2 BD) /CD19 (Rat anti-mouse clone 1D3 BD)	CD8 (Rat anti-mouse Clone 53-6.7 BD)	CD36 (Mouse anti-mouse clone CRF D-2712 BD)	CD11c (Hamster anti-mouse clone HL3 BD)	CD11b (Rat anti-mouse clone M1/70 BD)	CD4 (Rat anti-mouse clone RM4-5 BD)	IA-d (Mouse anti-mouse clone 39-1010-8 BD)
4	GFP	CD3 (Hamster anti-mouse clone 500A2 BD) /CD19 (Rat anti-mouse clone 1D3 BD)	CD8 (Rat anti-mouse Clone 53-6.7 BD)	CD16/CD32 (Rat anti-mouse clone 2.4G2 BD)	CD11c (Hamster anti-mouse clone HL3 BD)	CD11b (Rat anti-mouse clone M1/70 BD)	CD4 (Rat anti-mouse clone RM4-5 BD)	IA-d (Mouse anti-mouse clone 39-1010-8 BD)

		BD)				M1/70 BD)		
5	GFP	CD3 (Hamster anti-mouse clone 500A2 BD) /CD19 (Rat anti-mouse clone 1D3 BD)	CD8 (Rat anti-mouse Clone 53-6.7 BD)	CD40 (Rat anti-mouse cat: 558695 BD)	CD11c (Hamster anti-mouse clone HL3 BD)	CD11b (Rat anti-mouse clone M1/70 BD)	CD4 (Rat anti-mouse clone RM4-5 BD)	IA-d (Mouse anti-mouse clone 39-1010-8 BD)
6	GFP	CD3 (Hamster anti-mouse clone 500A2 BD) /CD19 (Rat anti-mouse clone 1D3 BD)	CD3 (Hamster anti-mouse clone 500A2 BD) /CD19 (Rat anti-mouse clone 1D3 BD)	CD80 (Hanster anti-mouse clone 16-10A1 BD)	CD11c (Hamster anti-mouse clone HL3 BD)	CD11b (Rat anti-mouse clone M1/70 BD)	CD4 (Rat anti-mouse clone RM4-5 BD)	IA-d (Mouse anti-mouse clone 39-1010-8 BD)

Para as marcações do baço e dos pulmões,  $2 \times 10^6$  células foram transferidas para placas de 96 poços de fundo redondo, lavadas com 200 uL de *staining buffer* e centrifugadas a 1.200 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* de células ressuspenso em 25 uL de cada mistura de anticorpos (ver Tabelas 2 e 3) e incubado por 30 minutos a 4°C ao abrigo da luz. Após esta incubação, as células foram lavadas com 200 uL de tampão, centrifugadas a 1.200 rpm por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Finalmente, o *pellet* foi lavado com 200 uL e ressuspenso em *staining buffer* para ser analisado por citometria de fluxo.

A **Figura 9** ilustra as estratégias de análise dos dados adquiridos por citometria de fluxo para a obtenção de subpopulações de células dendríticas desejadas e seus perfis de ativação. Para as pDCs, a análise foi feita a partir da primeira seleção dos leucócitos (*gate A*), seguida de separação de APCs negativas para Lin (CD3/CD19) (*gate C* em A). Foram selecionadas DCs plasmocitoides e convencionais utilizando-se os marcadores B220 e CD11c (*gates D* e E em C), e, posteriormente, foram selecionadas as DCs plasmocitoides (*gate E*) para determinar a expressão dos diferentes marcadores de ativação por MFI (média geométrica da intensidade de fluorescência), os quais foram selecionados dos diferentes histogramas para cada marcação (MHC-II, CD80, CD86, CD40, CD36, CD16/32).

**Figura 9** - Estratégia para a análise das subpopulações celulares do baço e dos pulmões



A estratégia para a análise foi realizada a partir da primeira seleção dos leucócitos (*gate A*), seguida de separação de APCs negativos para Lin (CD3/CD19) (*gate C em A*). Foram selecionadas DCs plasmocitoides e convencionais utilizando-se os marcadores B220 e CD11c (*gates D e E em C*) e, posteriormente, foram selecionadas as DCs plasmocitoides (*gate E*) para determinar, mediante a MFI, a expressão dos diferentes marcadores de ativação (MHC-II, CD80, CD86, CD40, CD36, CD16/32).

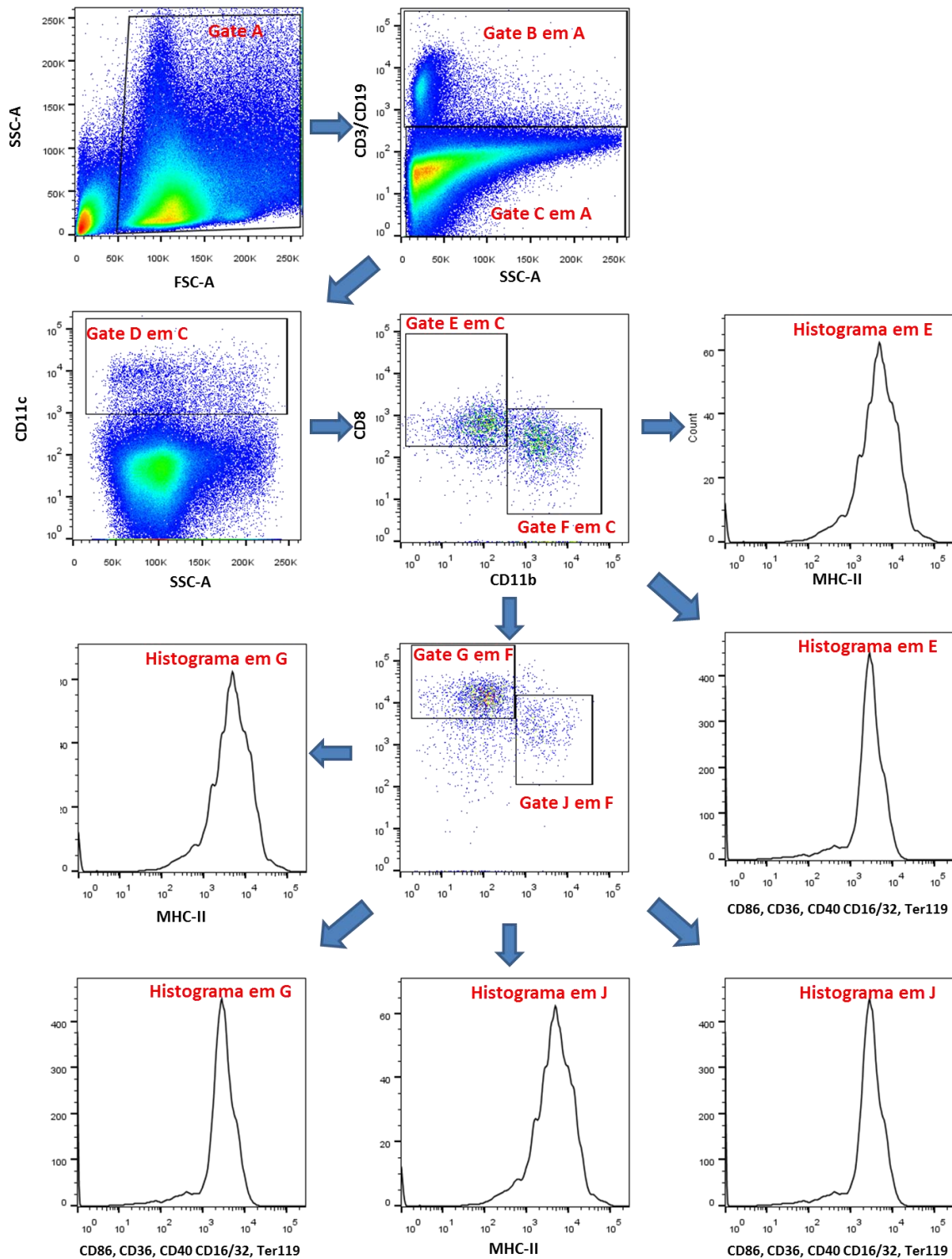
Para as cDCs, a análise foi feita como demonstra a **Figura 10**, após a seleção dos leucócitos (*gate A*) por tamanho e granulocidade. Em seguida, foram separados APCs e



linfócitos usando a marcação Lin (CD3/CD19) (*gate* B em A), sendo as APCs Lin<sup>-</sup>. Dentro da população de APCs, foi realizada a separação da população CD11c (*gate* D em C). Em seguida, foram separadas as populações utilizando o marcador CD8 (*gate* E em C) e CD11b (*gate* F em C). As DCs convencionais CD8<sup>+</sup> (*gate* E) foram analisadas quanto à MFI da expressão dos diferentes marcadores de ativação (MHC-II, CD80, CD86, CD40, CD36, CD16/32). As populações de DCs CD11b positivas foram separadas para CD4<sup>+</sup> (*gate* G em F) e CD4<sup>-</sup> (*gate* J em F). A expressão dos diferentes marcadores de ativação (MHC-II, CD80, CD86, CD40, CD36, CD16/32) foi determinada pela MFI.

Os *gates* foram acertados utilizando a técnica de FMO (fluorescência menos um) e *singles* (esplenócitos marcados individualmente para cada anticorpo). Realizou-se a compensação automática utilizando as BD<sup>TM</sup> CompBead para cada anticorpo, GFP foi compensado utilizando eritrócitos parasitados com o parasito *Pb* ANKA<sup>GFP</sup>.

**Figura 10** - Estratégia para a análise das subpopulações celulares do baço e do pulmão



As APCs e linfócitos foram separados usando-se a marcação Lin (CD3/CD19) (*gate B em A*), sendo as APCs Lin-. Dentro da população de APCs, foi realizada a separação da população CD11c positivas (*gate D em C*). Em seguida, foram separadas as populações utilizando o marcador CD8 (*gate E em C*) e CD11b (*gate F em C*). As populações de DCs CD11b+ foram separadas para CD4+ (*gate G em F*) e CD4- (*gate J em F*). A expressão dos diferentes marcadores de ativação (MHC-II, CD80, CD86, CD40, CD36, CD16/32) foi determinada pela MFI.

### 3.12 Caracterização dos perfis de ativação e fagocitose das células dendríticas (DCs) do baço

Para caracterizar as DCs por citometria de fluxo foi utilizado o citômetro BD LSRFortessa, os dados foram adquiridos com o *software* DIVA versão 6.0 e analisados com o *software* FlowJo versão X 10.0.7r2. Para identificar os marcadores de ativação e fagocitose das DCs presentes no baço, foram utilizados os seguintes painéis de anticorpos específicos (**Tabela 4**):

**Tabela 4** - Painel de anticorpos utilizado para a fenotipagem das células dendríticas plasmocitoides (pDCs)

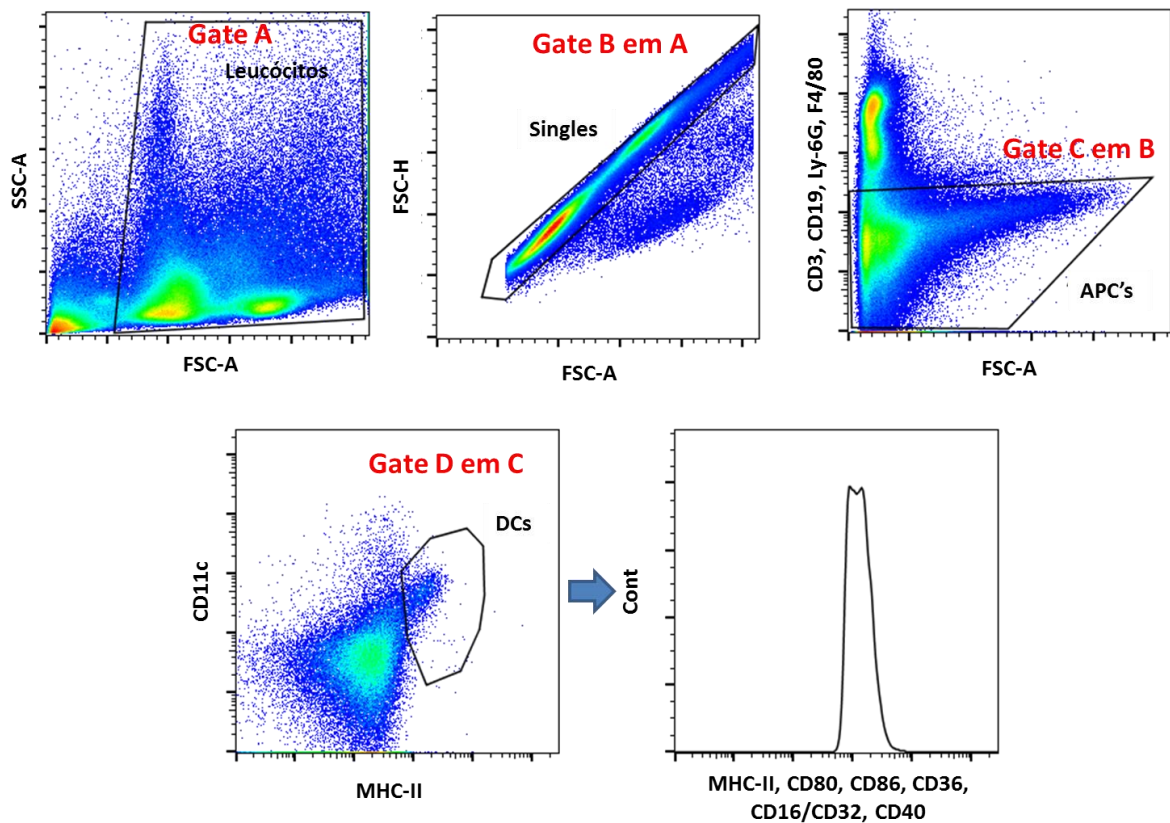
	FITC	PE	PreCP	APC	PECy7	APCCy7	V500
1	GFP	CD3 (Hamster anti-mouse clone 500A2 BD) /CD19 (Rat anti-mouse clone 1D3 BD)	CD80 (Hamster anti-mouse clone 16-10A1 BD)	Ter119 (Rat anti-mouse clone TER-119 BD)	CD11c (Hamster anti-mouse clone HL3 BD)	B220 (Rat anti-mouse Clone RA3-6B2 BD)	IA-d (Mouse anti-mouse clone 39-1010-8 BD)
2	GFP	CD3 (Hamster anti-mouse clone 500A2 BD) /CD19 (Rat anti-mouse clone 1D3 BD)	CD80 (Hamster anti-mouse clone 16-10A1 BD)	CD86 (Rat anti-mouse clone GL1 BD)	CD11c (Hamster anti-mouse clone HL3 BD)	B220 (Rat anti-mouse Clone RA3-6B2 BD)	IA-d (Mouse anti-mouse clone 39-1010-8 BD)
3	GFP	CD3 (Hamster anti-mouse clone 500A2 BD) /CD19 (Rat anti-mouse clone 1D3 BD)		CD36 (Mouse anti-mouse clone CRF D-2712 BD)	CD11c (Hamster anti-mouse clone HL3 BD)	B220 (Rat anti-mouse Clone RA3-6B2 BD)	IA-d (Mouse anti-mouse clone 39-1010-8 BD)
4	GFP	CD3 (Hamster anti-mouse clone 500A2 BD) /CD19 (Rat anti-mouse clone 1D3 BD)		CD16/CD32 (Rat anti-mouse clone 2.4G2 BD)	CD11c (Hamster anti-mouse clone HL3 BD)	B220 (Rat anti-mouse Clone RA3-6B2 BD)	IA-d (Mouse anti-mouse clone 39-1010-8 BD)
5	GFP	CD3 (Hamster anti-mouse clone 500A2 BD) /CD19 (Rat anti-mouse clone 1D3 BD)		CD40 (Rat anti-mouse cat: 558695 BD)	CD11c (Hamster anti-mouse clone HL3 BD)	B220 (Rat anti-mouse Clone RA3-6B2 BD)	IA-d (Mouse anti-mouse clone 39-1010-8 BD)

Para as marcações de baço, cerca de  $2 \times 10^6$  esplenócitos foram transferidos para placas de 96 poços de fundo redondo, lavados com 200 uL de *staining buffer* e centrifugados a 1.200 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* de células ressuspenso em 25 uL de cada mistura de anticorpos (ver **Tabela 4**) e incubado por 30 minutos a 4°C ao abrigo da luz. Após incubação, as células foram lavadas com 200 uL de tampão, centrifugadas a 1.200 rpm por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Finalmente, o *pellet* foi lavado com 200 uL e ressuspenso em *staining buffer* para ser analisado por citometria de fluxo.

A **Figura 11** ilustra as estratégias de análise dos dados adquiridos por citometria de fluxo para a obtenção de subpopulações de células dendríticas desejadas e seus perfis de ativação. Para as DCs, a análise foi realizada a partir da primeira seleção dos leucócitos (*gate*

A), seguida de uma limpeza de *debris* e *doublés* (*gate B* em A), após uma seleção negativa das APCs utilizando CD3/CD19 (*gate C* em A). Foram selecionadas DCs utilizando-se os marcadores CD11c MHC-II (*gates D* em C), e, em seguida, foram determinadas mediante a MFI (média geométrica de intensidade de fluorescência) a expressão dos diferentes marcadores de ativação e fagocitose, os quais foram selecionados dos diferentes histogramas para cada marcação (MHC-II, CD80, CD86, CD40, CD36, CD16/32). Os *gates* foram acertados empregando a técnica de FMO e *singles*. A compensação automática foi feita mediante utilização das BD™ CompBead para cada anticorpo. O GFP foi compensado usando EP por *Pb ANKA*<sup>GFP</sup>.

**Figura 11** - Estratégia de *gates* para a identificação dos marcadores de ativação e fagocitose nas DCs



Para avaliar os marcadores de ativação e de fagocitose nas DCs, foi feita a seleção dos leucócitos (*gate A*) por tamanho e granulosidade, e a seleção negativa excluindo CD3 e CD19 para obter as APCs (*gate B* em A). Após esta etapa, foi selecionada uma população CD11c e MHC-II positiva (*gate C* em B), na qual foi identificada a presença de GFP (*gate D* em C) nas DCs. A partir do *gate C*, foram analisadas as MFI dos diferentes marcadores de ativação (MHC-II, CD80, CD86, CD40) e de fagocitose (CD36, CD16/32).

### 3.13 Caracterização das subpopulações de Macrófagos M1 e M2 do baço

Para caracterizar, por citometria de fluxo, as subpopulações M1 e M2 presentes no baço foi utilizado o citômetro BD LSRFortessa e os dados foram adquiridos com o *software* DIVA versão 6.0 e analisados com o *software* FlowJo (versão X 10.0.7r2). Para este ensaio foi utilizado o seguinte painel de anticorpos específicos (**Tabela 5**):

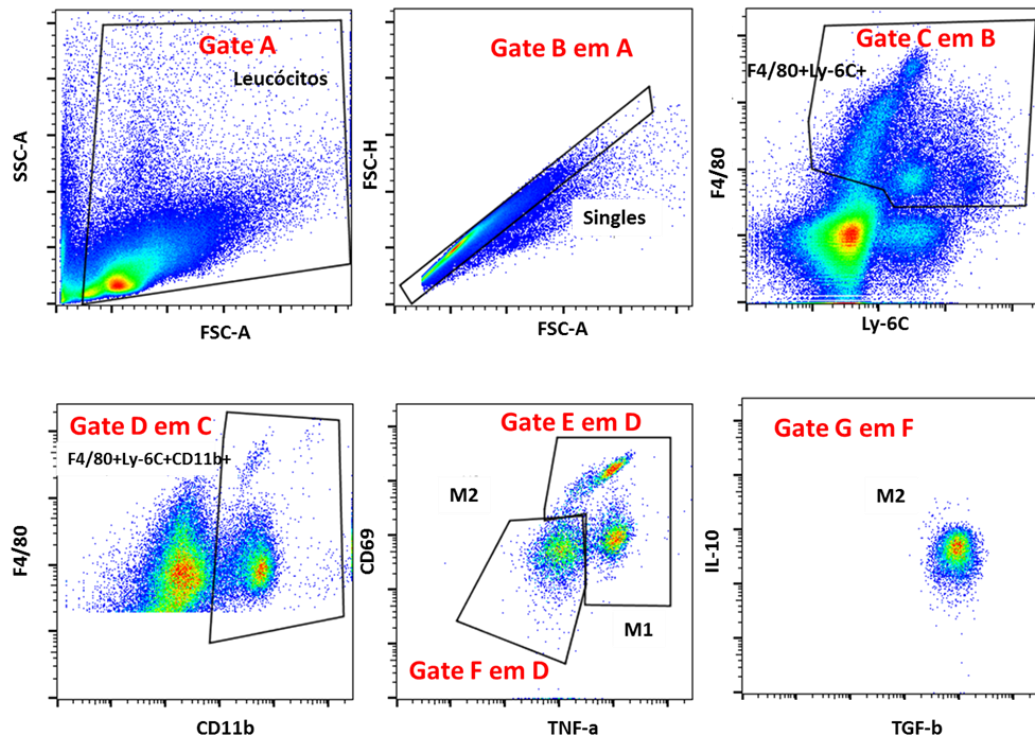
**Tabela 5** - Painel de anticorpos utilizado para a fenotipagem de macrófagos M1 e M2 do baço

FITC	PE	PreCP	APC	PECy7	APCCy7	BV421	AmCyam
GFP	F4/80	INF- $\gamma$ Anti-mouse clone XMG1.2 (BD)	IL-10 Rat anti-mouse cat: 554468 (BD)	TNF- $\alpha$ Anti-mouse clone MP6- XT22 (BD)	CD11b Rat anti-mouse clone M1/70 (BD)	Ly-6C (BD)	TGF-B biotina Rat anti- mouse/hum/pig cat: 555053 (BD)

Para as marcações de esplenócitos, cerca de  $2 \times 10^6$  células foram transferidas para placas de 96 poços de fundo redondo, lavadas com 200 uL de *staining buffer* e centrifugadas a 1.200 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* de células ressuspenso em 25 uL de cada mistura de anticorpos (ver **Tabela 2**) e incubado por 30 minutos a 4°C ao abrigo da luz. Após incubação, as células foram lavadas com 200 uL de tampão, centrifugadas a 1.200 rpm por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Finalmente, o *pellet* foi lavado com 200 uL e ressuspenso em *staining buffer* para ser analisado por citometria de fluxo.

A **Figura 12** mostra a estratégia de *gates* para a análise das subpopulações de macrófagos M1 e M2 do baço de camundongos. A fim de caracterizar as populações de M1 e M2, foi feita a seleção dos leucócitos (*gate A*), seguida da seleção de *singles* (*gate B* em A). Após esta etapa, foi selecionada uma população F4/80 e Ly6C positiva (*gate C* em B), na qual se realizou uma seleção de células CD11b positivas (*gate D* em C) nas F4/80+Ly-6C+. A partir do *gate C*, foram selecionadas duas populações: as CD69+TNF- $\alpha$ +, consideradas macrófagos M1 (*gate E* em D); e as duplas negativas para esses marcadores, consideradas macrófagos M2 (*gate F* em D). Na população de macrófagos M2 foi medida a expressão de IL-10 e TGF- $\beta$  (*gate G* em F) com o objetivo de confirmar sua identidade. Os *gates* foram acertados utilizando a técnica de FMO e *singles*. A compensação automática foi feita utilizando as BD™ CompBead para cada anticorpo. O GFP foi compensado utilizando eritrócitos parasitados com *Pb ANKA*<sup>GFP</sup>.

**Figura 12** - Estratégia de *gates* para a análise das subpopulações de macrófagos M1 e M2 do baço de camundongos



Para caracterizar as populações de M1 e M2 foi feita a seleção dos leucócitos (*gate* A) e de *singles* (*gate* B em A). Posteriormente, foi selecionada uma população F4/80 e Ly6C positiva (*gate* C em B). Na qual foi feita uma seleção de células CD11b positivas (*gate* D em C) nas F4/80+Ly-6C+. A partir do *gate* C foram selecionadas duas populações as CD69+TNF- $\alpha$ + consideradas macrófagos M1 (*gate* E em D) e as duplas negativas para esses marcadores consideradas macrófagos M2 (*gate* F em D). Na população de macrófagos M2 foi medida a expressão de IL-10 e TGF-b (*gate* G em F) com objetivo de confirmar a identidade dessa população.

### 3.14 Purificação de eritrócitos parasitados (EP)

Um camundongo BALB/c foi infectado com  $3 \times 10^6$  EP e, após dez dias, quando o animal atingiu uma parasitemia superior a 15%, o sangue total foi coletado por punção cardíaca ( $\pm 1$  mL). Para a sincronização do ciclo do parasito, o sangue foi adicionado a uma garrafa de cultura de  $75\text{cm}^2$ , sem filtro, contendo RPMI com 25% de Soro Fetal Bovino (12 mL de Meio RPMI sem antibiótico e 4 mL de SFB) e uma mistura gasosa contendo 85% de  $\text{N}_2$ ; 10% de  $\text{O}_2$  e 5% de  $\text{CO}_2$ , incubando-se por 14 horas a  $37^\circ\text{C}$ . A suspensão de eritrócitos, contendo parasitos na fase esquizonte, foi passada por uma coluna magnética, seguida de lavagem com 40 mL de RPMI incompleto para a remoção de eritrócitos não parasitados (EnP), ou seja, sem a presença de hemozoína, que faz com que os EP adiram à coluna magnética. Em seguida, a coluna foi retirada do ímã e os EP foram ressuspensos com 10 mL de RPMI incompleto. Após centrifugação a 1.200 rpm a  $4^\circ\text{C}$  por 10 minutos, o *pellet* foi

ressuspensão em 1 mL de RPMI e a parasitemia foi determinada por contagem na câmara de Neubauer. Além disto, foi feito um esfregaço em lâmina e a verificação por citometria de fluxo para determinar o valor relativo de EP recuperado após a purificação.

### 3.15 Efeito da gravidez na capacidade fagocítica das DCs e Macrófagos

Os baços de camundongos BALB/c de grupos de animais prenhas (infectados no dia 13 e eutanasiados no dia 19 de gestação) e não prenhas foram coletados, pesados, lavados em solução de PBS 1x e, posteriormente, colocados em meio RPMI (Gibco) completo. Com o auxílio de um êmbolo de seringa e filtros *cell strainer* (70 µm), o baço foi macerado e mantido em gelo, sem a matriz tecidual. A suspensão celular foi centrifugada a 1.200 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensão em 1 mL de tampão Tris-Cl NH Base (pH 7,4), por 3 minutos, para lise de eritrócitos. A suspensão foi lavada com RPMI 1640 SFB 3%, e centrifugado a 1.200 rpm por 10 minutos a 4°C. O *pellet* foi ressuspensão em 3 mL de RPMI completo para determinar o número de células. Em seguida,  $10^6$  esplenócitos foram cocultivados com  $2 \times 10^6$  ou  $1 \times 10^7$  EP com *Pb ANKA<sup>GFP</sup>* (sincronizados e purificados por coluna magnética) e  $1 \times 10^7$  EnP em placas de 48 poços por 2 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> (148).

A aquisição das amostras foi feita utilizando o citômetro BD LSRFortessa, os dados foram obtidos com o *software* DIVA versão 6.0 e analisados com o *software* FlowJo (versão X 10.0.7r2). Utilizando os anticorpos mostrados na **Tabela 6**, os *gates* foram delimitados com a técnica de FMO e *singles*. A compensação automática foi feita utilizando as BD™ CompBead para cada anticorpo. O GFP foi compensado utilizando EP por *Pb ANKA<sup>GFP</sup>*.

**Tabela 6** - Painel de anticorpos utilizado para a caracterização da fagocitose de DCs e macrófagos

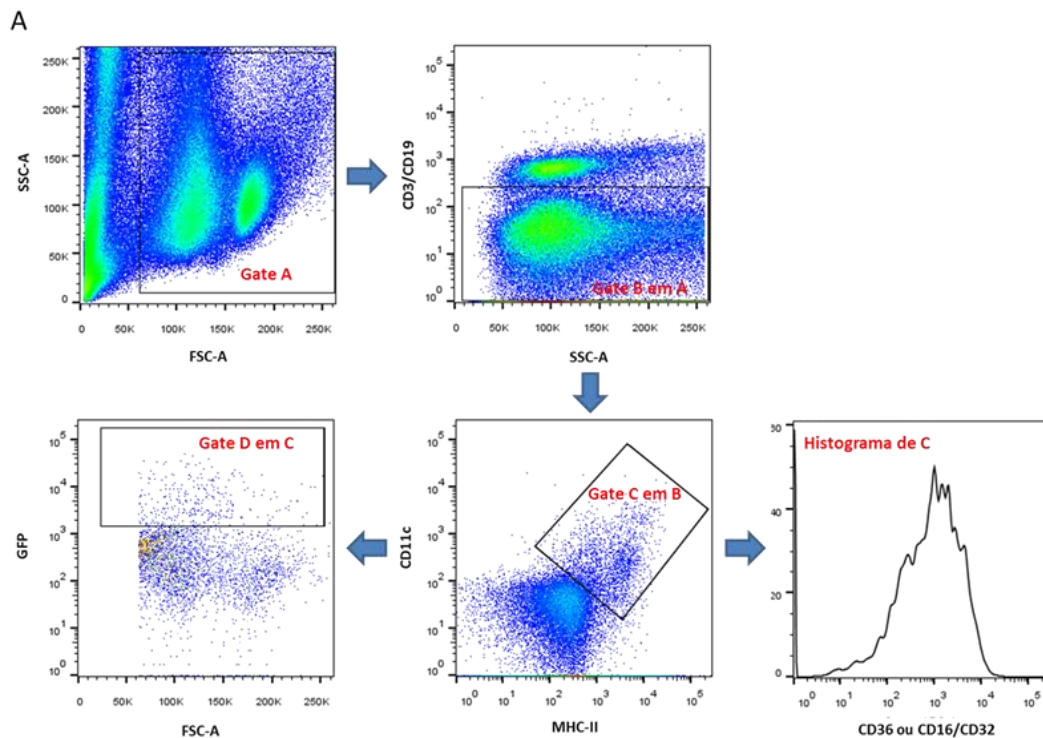
	FITC	PE	PreCP	PECy7	APCCy7	AmCyam
1	GFP	CD3 (Hamster anti-mouse clone 500A2 BD) /CD19 (Rat anti-mouse clone 1D3 BD)		CD11c (Hamster anti-mouse clone HL3 BD)		IA-d (Mouse anti-mouse clone 39-1010-8 BD)
2	GFP	F4/80 (BD)	CD3 (Hamster anti-mouse clone 500A2 BD)		CD19 (Rat anti-mouse clone 1D3)	IA-d (Mouse anti-mouse clone 39-1010-8 BD)

Como exibido na **Figura 13A**, a avaliação da capacidade da fagocitose nas DCs foi feita após da seleção dos leucócitos (*gate* A) por tamanho e granulocidade, com posterior separação das APCs utilizando uma seleção negativa para linfócitos usando a marcação Lin (CD3/CD19) (*gate* B em A), sendo as APCs CD3/CD19 negativas. Dentro da população de

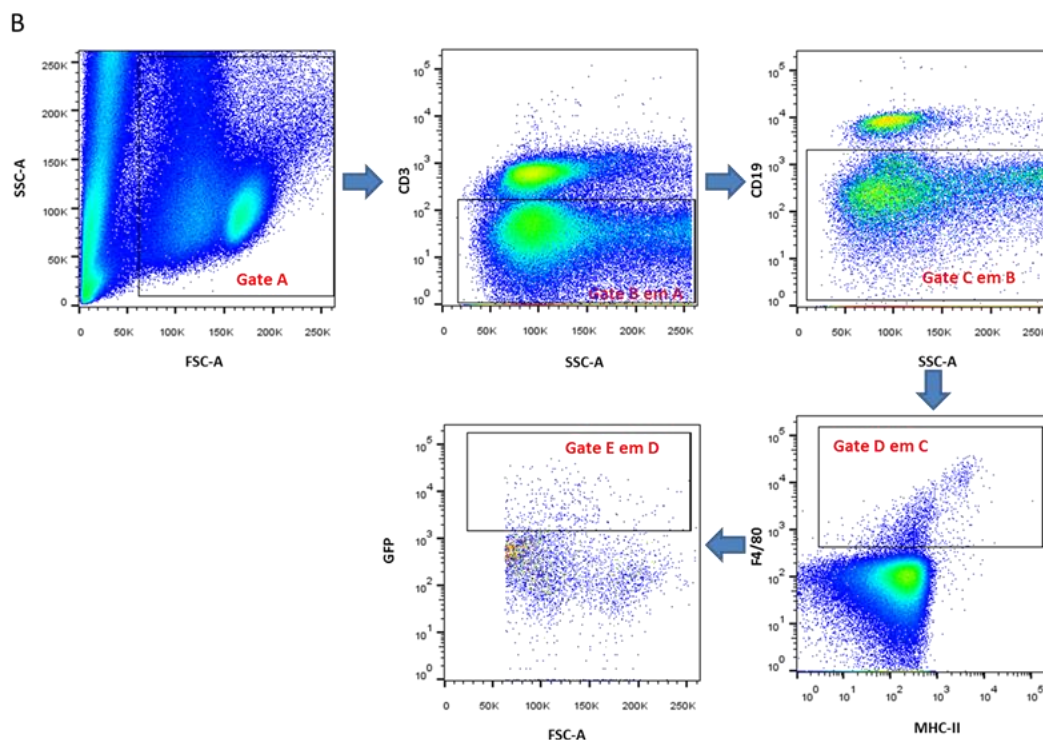
APCs, foi selecionada uma população CD11c<sup>+</sup> e MHC-II<sup>+</sup> (*gate C* em B). Nessa população foi identificada a presença de GFP (*gate D* em C), o qual determinou a fagocitose dos EP pelas DCs. A partir do *gate C*, foram analisadas as MFI dos diferentes marcadores de fagocitose (CD36, CD16/32).

No caso dos macrófagos, como exibido na **Figura 13B**, inicialmente foi realizada uma seleção dos linfócitos por tamanho e granulosidade (*gate A*). Após, foram feitas duas seleções negativas, uma excluindo os linfócitos T CD3<sup>+</sup> (*gate B* em A) e outra excluindo os linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) (*gate C* em B). Foram consideradas como APCs, as células negativas para CD3 e CD19. A dupla marcação positiva para F4/80 e MHC-II foi considerada para identificar macrófagos (*gate D* em C). Na população de macrófagos foi identificada a presença de GFP (*gate E* em D) como indicativo da fagocitose de EP pelos macrófagos.

**Figura 13** - Estratégia de *gate* para a análise da capacidade das DCs e macrófagos de camundongos BALB/c para fagocitar eritrócitos parasitados expressando GFP







Para avaliar a fagocitose nas DCs (A), foi feita a seleção dos leucócitos (*gate A*) por tamanho e granulosidade, e a seleção negativa excluindo CD3<sup>+</sup> e CD19<sup>+</sup> para obter as APCs (*gate B em A*). Após esta etapa, foi selecionada uma população CD11c<sup>+</sup> e MHC-II<sup>+</sup> (*gate C em B*). Na qual foi identificada a presença de GFP (*gate D em C*) nas DCs. A partir do *gate C*, foram analisadas as MFI dos diferentes marcadores de fagocitose (CD36, CD16/32). Para os macrófagos (B), a estratégia para a análise foi feita a partir da primeira seleção dos leucócitos (*gate A*) por tamanho e granulosidade, seguida da seleção negativa para CD3 (*gate B em A*) e CD19 (*gate C em B*). As APCs, posteriormente, foram selecionadas pela marcação F4/80<sup>+</sup> e MHC-II<sup>+</sup> (*gate D em C*). Foi selecionada a presença de GFP na população do *gate D* (*gate E em D*) como fagocitose de EP nos macrófagos.

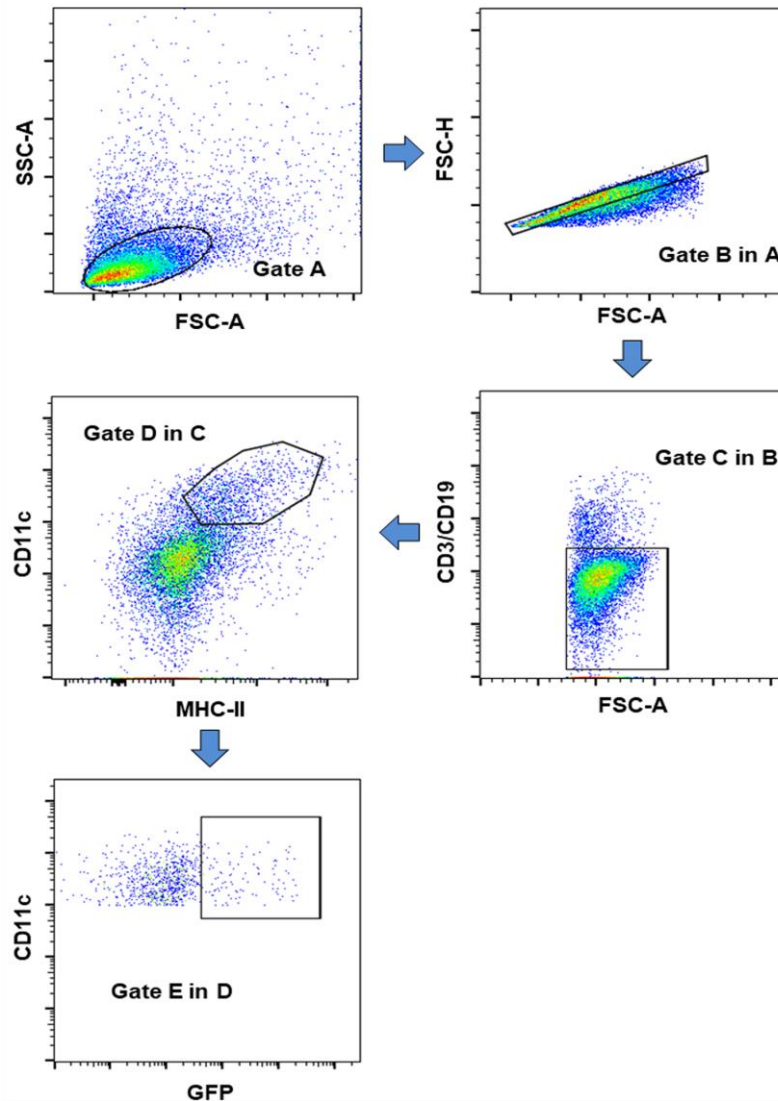
### 3.16 Quantificação de citocinas no soro por CBA

A quantificação das citocinas IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12 e MCP-1 presentes no soro foi realizada pelo método de CBA<sup>™</sup> (Cytometric Bead Array, BD Biosciences, USA) com o Kit Mouse Inflammation (número de catálogo 552364). O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Resumidamente, os anticorpos de captura específicos para as citocinas citadas (*beads*) foram incubados com amostra ou com os padrões (valores da curva padrão: 5.000 pg/mL a 20 pg/mL) juntamente com o reagente de detecção conjugado com PE. As amostras e os padrões foram, então, levados à incubação por duas horas à temperatura ambiente protegidos da luz. Em seguida, as amostras foram lavadas por centrifugação a 1.200 rpm durante 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo as *beads* ressuspenso em tampão de lavagem. A análise da fluorescência produzida pelas *beads* foi quantificada por citometria de fluxo (FACS Canto) e analisada com o *software* FCAP Array versão 3.0 (BD Biosciences, USA).

### 3.17 Purificação das células dendríticas do baço

Os esplenócitos em suspensão (4 mL) foram cuidadosamente adicionadas em 3 mL de Percoll (General Electric Healthcare, Suécia) contidas num tubo de 15 mL e centrifugadas a 1.200 rpm durante 20 a 30 minutos a 4°C. Em seguida, a camada superior foi extraída com o uso de uma pipeta, deixando a camada de linfócitos não perturbada na interface. As células recuperadas foram lavadas em RPMI 1.640 completo suplementado com 10% de SFB e contadas. A suspensão de células foi enriquecida pelo *kit* de Enriquecimento de Células Dendríticas BD IMag™ Mouse - DM (BD, USA), seguindo as indicações do fabricante. As células enriquecidas foram marcadas com CD3-PE (clone anti-camundongo de hamster 500A2, BD Bioscience, EUA) CD19-PE (clone anti-camundongo de rato 1D3, BD Bioscience, EUA), CD11c-PECy7 (clone anti-camundongo de Hamster HL3, BD Bioscience, EUA) e IA-d-V500 (clone de rato anti-camundongo 39-1010-8, BD Bioscience, EUA) e purificado por *cell sorter* utilizando o BD FACSAria II (ver **Figura 14**).

**Figura 14** - Sistema de plotagem para *sorter* de células dendríticas com sinal positivo para *P. berghei* (GFP positivo)



Os esplenócitos enriquecidos pelo *kit* de Enriquecimento de Células Dendríticas BD IMag™ Mouse - DM (BD, USA) foram marcados para CD3/CD19, CD11c e MHC-II. O GFP foi utilizado para identificar a presença de *P. berghei*. Uma seleção inicial foi feita para SSC-A e FSC-A (*gate* A), depois que as células individuais foram selecionadas (*gate* B em A), seguiu-se uma seleção negativa de CD3/CD19 (*gate* C em B) e as DCs foram consideradas as células duplo positivas para CD11c e MHC-II (*gate* D em C). Todas as DCs foram avaliadas quanto à presença de GFP (DCs com GFP positivo, *gate* E em D) e o classificador foi desenvolvido com o BD FACSAria II.

### 3.18 Identificação da presença do parasito nas DCs por citometria de imagem ImageStream®<sup>X</sup>

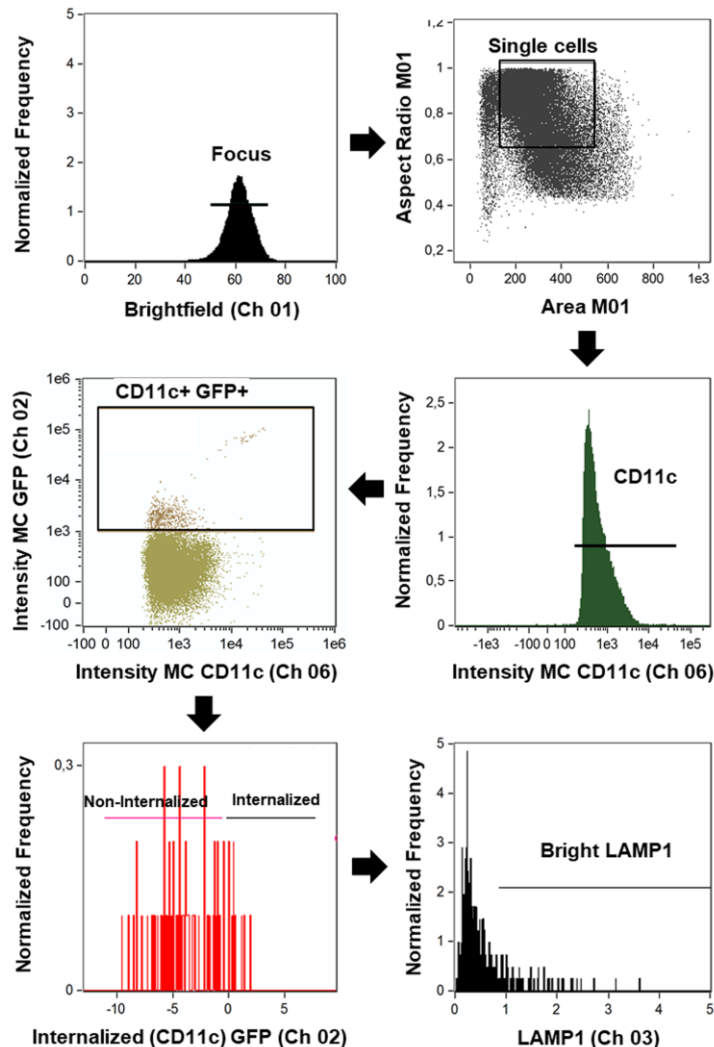
Foram coletados baços de animais crônicos infectados com *P. berghei* ANKA<sup>GFP/HSP70</sup> e processados para a obtenção de esplenócitos. As DCs foram purificadas segundo o protocolo descrito no item 3.17. Assim, cerca de  $1 \times 10^5$  células/poço foram marcadas utilizando o painel de anticorpos mostrado na **Tabela 7**. As amostras foram adquiridas utilizando-se o

citômetro de fluxo com imagem Amnis® com a plataforma ImageStream®<sup>X</sup>. Os dados foram analisados com o programa IDEAS versão 6.1. A estratégia de análise baseou-se nas *singles cells* e, posteriormente, seleção de células CD11c+, seguida da análise de coexpressão de GFP e posterior análise da presença de LAMP-1 nesse grupo de células que apresentaram colocalização. Tal como descrito na **Figura 15**.

**Tabela 7** - Pannel de anticorpos e canais a utilizar para a análise de fagocitose das DCs

Canal	Ch1	Ch2	Ch3	Ch5	Ch6
Marcação	Luz transmitida	GFP	LAMP-1 -PE (Rat anti-mouse, Clone 1D4B)	PI	CD11c-PECy7 (rat anti-mouse Clone RA3-6B2 BD)

**Figura 15** - Sistema de análise das células dendríticas por citometria de imagem ImageStream®<sup>X</sup>



Esplenócitos enriquecidos e classificados foram marcados para CD11c, LAMP-1 e PI. O GFP foi utilizado para a identificação da presença de *P. berghei*. A análise começa com a seleção de foco no canal 1 (Ch 01). Em seguida, as células foram selecionadas pela relação de aspecto e área (*single cells gate*). A análise foi seguida por uma seleção de CD11c pela intensidade (Ch 06). As células CD11c foram selecionadas para GFP (*gate CD11c*)

GFP, Ch 02 vs. Ch 06). As células duplamente positivas (CD11c+ e GFP+) foram analisadas para internacionalização e colocalização com GFP (*gates* não internalizado e internalizado) utilizando o *software* IDEAS versão 6.1. A coexpressão de LAMP-1 (Ch 03) nas células CD11c+ e GFP+.

### 3.19 Fixação das DCs GFP positivas para microscopia eletrônica de varredura

Foram purificadas  $5 \times 10^4$  DCs CD11c+ GFP+ de camundongos crônicos não prenhes (Ver protocolo 3.17) e misturados com  $5 \times 10^5$  DCs CD11c+ para gerar um *pellet* suficiente para a fixação e a montagem necessária à microscopia eletrônica. A fixação das amostras e a microscopia eletrônica de varredura foram feitas conforme descrito por Rezende et al. (149).

### 3.20 Tratamento com lipossomas contendo Clodronato (CILip)

Para a depleção de fagócitos, incluindo DCs, camundongos crônicos não prenhes com 50 dias pós-infecção foram tratados com lipossomas intravenoso (i.v.) três vezes durante 7 dias com a dose de 8,5 mg/g do animal (150). Os CILip foram feitos conforme o estabelecido por Lepique et al. (151).

### 3.21 Análise estatística

As análises comparativas entre os grupos experimentais foram feitas pelos testes T-student e ANOVA utilizando-se o programa GraphPad prism versão 5.01, e aplicados de acordo com cada situação. Para saber se os grupos foram significativamente diferentes ou se os resultados obtidos foram frutos de mera flutuação randômica ou acaso, as diferenças entre as amostras foram expressas com média  $\pm$  erro padrão da amostra (Média $\pm$ SE), conforme sugerido por Cumming e colaboradores (152). Os níveis de significância foram definidos como sendo iguais ou inferiores a 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## **4 RESULTADOS**

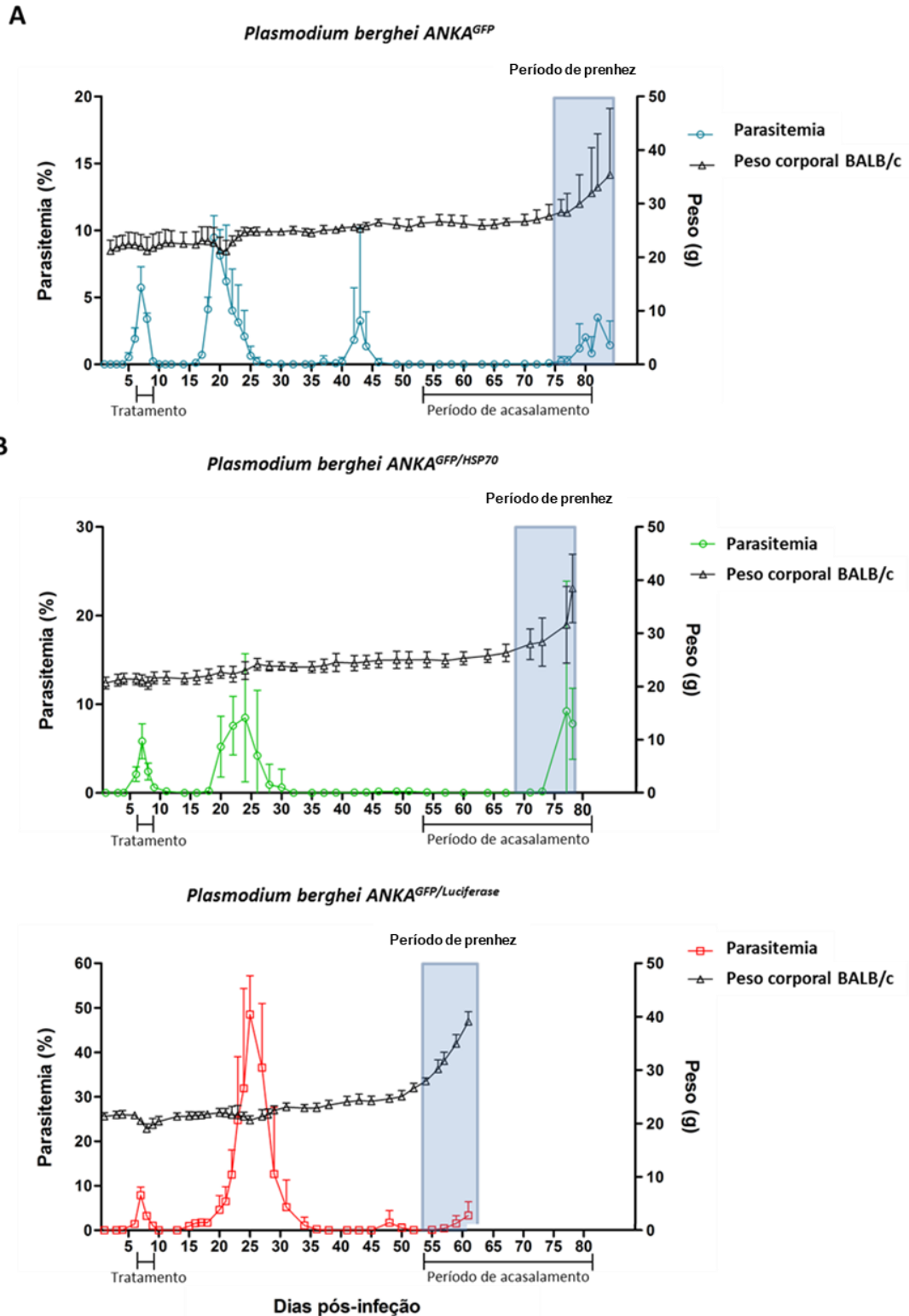
#### 4.1 Efeito da infecção com diferentes cepas de *P. berghei* sobre a recrudescência em camundongos BALB/c prenhes

Baseados não só nos dados reportados por Marinho et al. (2009), onde foram evidenciados os efeitos da recrudescência na gestação (46), bem como nos resultados apresentados por Pereira (2012) em sua dissertação de mestrado, em que foi evidenciada a presença de *P. berghei* interagindo com as DCs (147), este estudo teve como objetivo final a identificação dos mecanismos envolvidos na recrudescência. Neste sentido a identificação dos órgãos e das células reservatórios de parasitos nos períodos em que estes não são observados no sangue periférico é de extrema importância. Com o propósito de desvendar esta questão foram utilizados nos diferentes protocolos de infecção parasitos transgênicos expressando GFP ou luciferase, cuja finalidade era detectar o plamódio através da fluorescência em diferentes tecido e células. Inicialmente avaliou-se a progressão da parasitemia e do peso corporal de camundongos BALB/c infectados com três diferentes cepas transgênicas de *P. berghei* (*Pb* ANKA<sup>GFP</sup>, *Pb* ANKA<sup>HSP70/GFP</sup>, *Pb* ANKA<sup>luciferase</sup>), por cerca de 85 dias, sendo que, após o dia 50 de infecção, as fêmeas foram colocadas para acasalar a fim de identificar a presença da recrudescência durante a prenhez.

O peso corporal foi um dos parâmetros utilizados como indicativo do estado de prenhez, como se pode observar na **Figura 16**. Os resultados mostraram que os animais infectados com as três diferentes cepas de parasitos foram capazes de ficar prenhes e sofrer recrudescimento da infecção no período gestacional. Semelhante aos resultados anteriormente observados pelo nosso grupo (46), foi verificada a recrudescência da infecção por *P. berghei* em 65% das fêmeas de camundongos BALB/c que ficaram prenhes, indiferentemente da cepa utilizada (**Tabela 8**). Neste modelo, as fêmeas foram infectadas antes da prenhez e expostas a um tratamento subcurativo para induzir o fenômeno de recrudescência no momento da prenhez (**Figura 17A**).

Assim, decidiu-se desenvolver os experiemnetos seguintes utilizando o *Pb* ANKA<sup>HSP70/GFP</sup>, o qual apresentou uma intensidade maior de fluorescência de até um log em comparação com o parasita utilizado por Marinho et al; (2009) (46).

**Figura 16** – Níveis de parasitemia e peso corporal



Animais BALB/c foram infectados i.p. com  $10^4$  E.P. com diferentes clones de *P. berghei*, sendo o dia de infecção considerado D0. O tratamento com cloroquina (0,7mg/dia/animal) foi feito durante 3 dias a partir do D7. O acasalamento ocorreu cerca de 50 dias após a infecção. Os gráficos mostram o perfil de parasitemia e peso de camundongos BALB/c infectados com (A) *Pb* ANKA<sup>GFP</sup> (n=10), (B) *Pb* ANKA<sup>GFP/HSP70</sup> (n=14) e (C) *Pb* ANKA<sup>GFP/Luciferase</sup> (n=10). A quantificação dos níveis da parasitemia de *Pb* ANKA<sup>GFP/Luciferase</sup> foi realizada por marcação com o DRAQ5, devido aos baixos níveis de fluorescência (GFP) emitidos por este parasito. Dados representativos de três experimentos independentes expressos com média  $\pm$  DP.

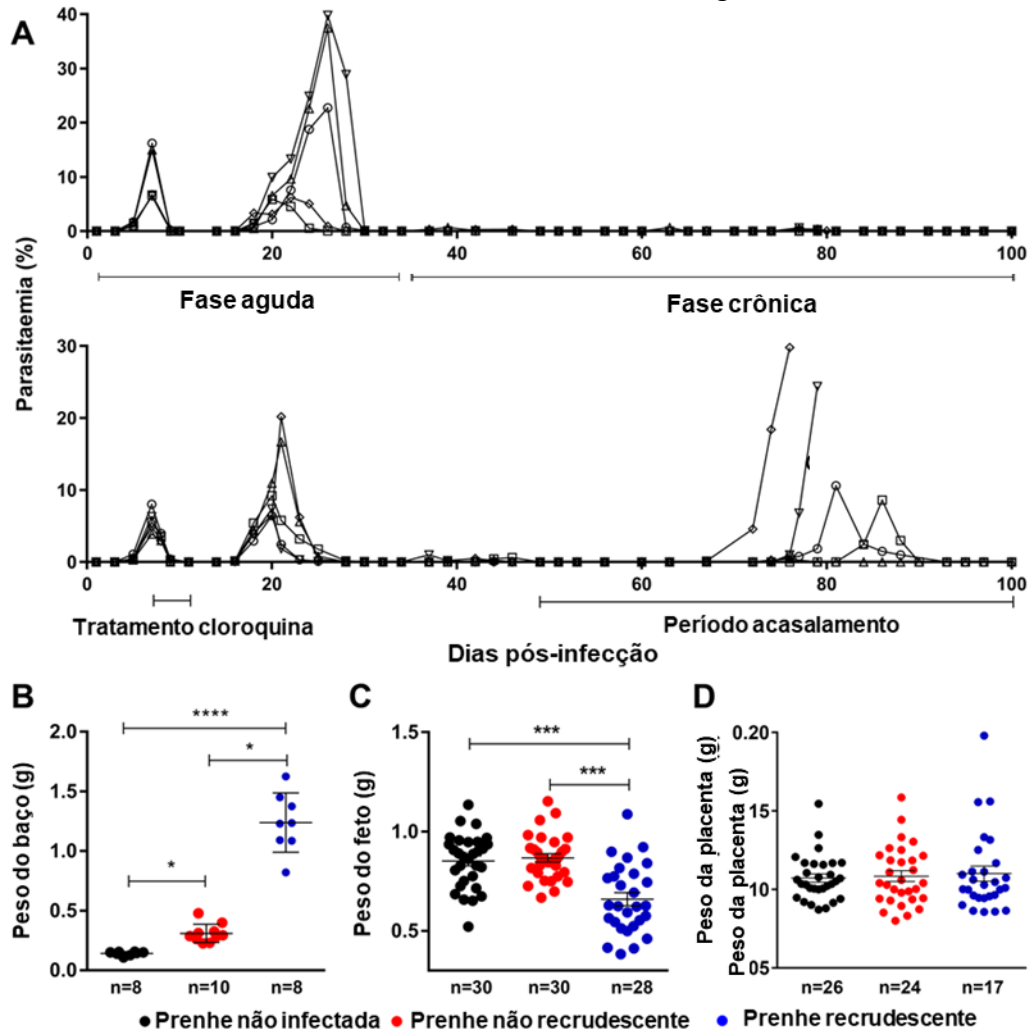


#### 4.2 Efeito da recrudescência na prenhez sobre o desenvolvimento do feto

A gestação induz modificações fisiológicas que podem modificar o status imunológico do camundongo e assim conseqüentemente ser responsável pelo recrudescimento da infecção. Dado que o baço e a placenta são compartimentos essenciais na patofisiologia da malária placentária os primeiros experimentos tiveram como foco a análise destes dois compartimentos.

O baço é um dos principais órgãos envolvidos na retirada do plasmódio da circulação. Em relação a este órgão observou-se uma diferença significativa no seu peso (peso do baço dos prenhes não recrudescentes *vs.* prenhes não infectados  $0,31\pm 0,05$  *vs.*  $0,14\pm 0,01$  g; e peso do baço dos prenhes recrudescentes *vs.* prenhes não infectados  $1,29\pm 0,18$  *vs.*  $0,14\pm 0,05$  g) (**Figura 17B e Tabela 8**). Os camundongos com recrudescência na prenhez mostraram uma diminuição significativa no peso do feto em comparação com os prenhes não infectados ( $0,85\pm 0,1$  *vs.*  $0,65\pm 0,13$  g) (**Figura 17C e Tabela 8**), indicando o efeito prejudicial da presença do parasito no momento da gestação e no desenvolvimento do feto (53). Os pesos das placentas não mostraram diferenças significativas entre os grupos (**Tabela 8**).

**Figura 17** – Efeito da recrudescência da malária associada à gravidez



(A) Animais BALB/c foram infectados i.p. com  $10^4$  E.P. de *P. berghei*, sendo o dia de infecção considerado D0. O tratamento com cloroquina (0,7mg/dia/animal) foi feito durante 3 dias a partir do D7. O acasalamento ocorreu cerca de 50 dias após a infecção. O peso do baço, o peso fetal e outras amostras ou mensurações foram obtidos no 19º dia de gestação (G19). (B) Peso do baço. (C) Peso do feto. (D) Espaço vascular placentário. Dados representativos de dois experimentos independentes expressos com média  $\pm$  DP. Para a análise estatística foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

**Tabela 8** - Resultado da gestação em camundongos recrudescientes e não recrudescientes infectados com *P. berghei*.

Resultado da prenhez								
	<i>n</i>	Parasitemi a Pico dia 7 (%) <sup>a</sup>	Pico Segunda parasitemi a (%) <sup>a</sup>	Pico de parasitemia na recrudescênci a (%) <sup>a</sup>	Mortalidad e (%)	Peso do baço (g)	Peso da placenta (g)	Peso do feto (g)
<b>Prenhe não recrudescente s</b>	1	15.64 ±	22.20 ±			0.31±0.0	0.1±0.01	0.86±0.0
	4	4.02	4.20	0	0	5 (10) <sup>b</sup>	(30) <sup>c</sup>	8 (30) <sup>c</sup>
<b>Prenhe recrudescente s</b>	2					1.29±0.1	0.11±0.0	0.65±0.1
	6	12.71 ± 4.3	16.4 ± 6.24	14.3 ± 8.4	15.33	8 (8) <sup>b</sup>	1 (28) <sup>c</sup>	3 (28) <sup>c</sup>
<b>Prenhe não infectados</b>						0.14±0.0	0.1±0.01	0.85±0.1
	8	0	0	0	0	1 (8) <sup>b</sup>	(30) <sup>c</sup>	1 (30) <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Média ± SE.

<sup>b</sup> Média ± SE (n=10 para animais não recrudescientes, n=8 para animais recrudescientes).

<sup>c</sup> Média ± SE para um n=30 placentas e n=30 fetos, procedentes de n=10 para animais não recrudescientes, n=8 para animais recrudescientes).

#### 4.3 Efeito da presença do *P. berghei* na redução do espaço placentário e no processo inflamatório

Considerando que o grupo prenhe não recrudescente os baços apresentaram um aumento de tamanho, apesar de não haver parasitemia periférica, o que indica indiretamente que os compartimentos linfocitários deste órgão estão ativados e que um processo inflamatório pode estar em curso e conseqüentemente prejudicar a gestação.

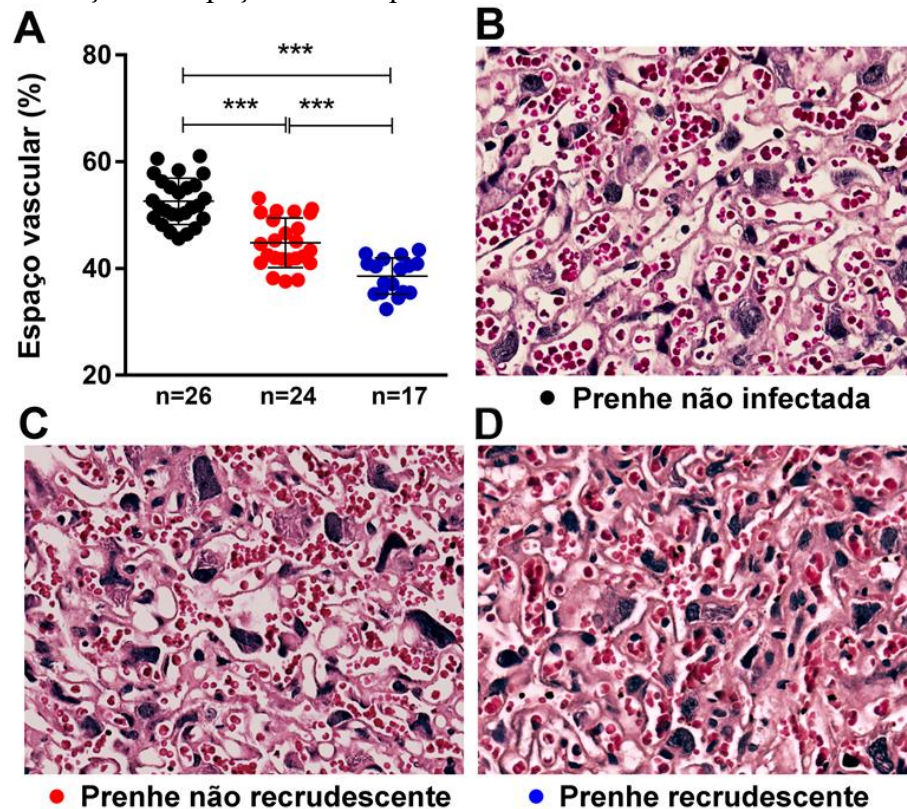
Assim para analisar o impacto da presença do parasito ou não sobre o desenvolvimento da placenta, realizou-se a quantificação do espaço vascular na zona do labirinto, como forma indireta de verificar o espessamento do sinciciotrofoblasto.

Foi evidenciado que, quando comparadas às placentas do grupo prenhe não infectado (**Figura 18A e 18B**), com o grupo prenhe não recrudescente (**Figura 18A e 18C**) e o prenhe recrudescente (**Figura 18A e 18D**) observou-se uma redução significativa do espaço vascular. Estes achados, provavelmente, relacionam-se à presença do parasito no tecido, o qual poderia gerar uma resposta inflamatória local (146), e sua intensidade seria determinante para a evolução da prenhez.

Curiosamente, o espaço vascular placentário de camundongos prenhes não recrudescientes (**Figura 18D**) em comparação com camundongos prenhes não infectados

também teve uma redução significativa ( $45,1 \pm 3,6$  vs.  $52,7 \pm 3,5\%$ , **Figura 18B**), entretanto, menos intenso do que o observado em camundongos prenhes recrudescentes. Isso sugere uma disfunção placentária que, provavelmente é decorrente de um processo inflamatório crônico mesmo na ausência da parasitemia periférica.

**Figura 18** - Redução do espaço vascular placentário na recrudescência

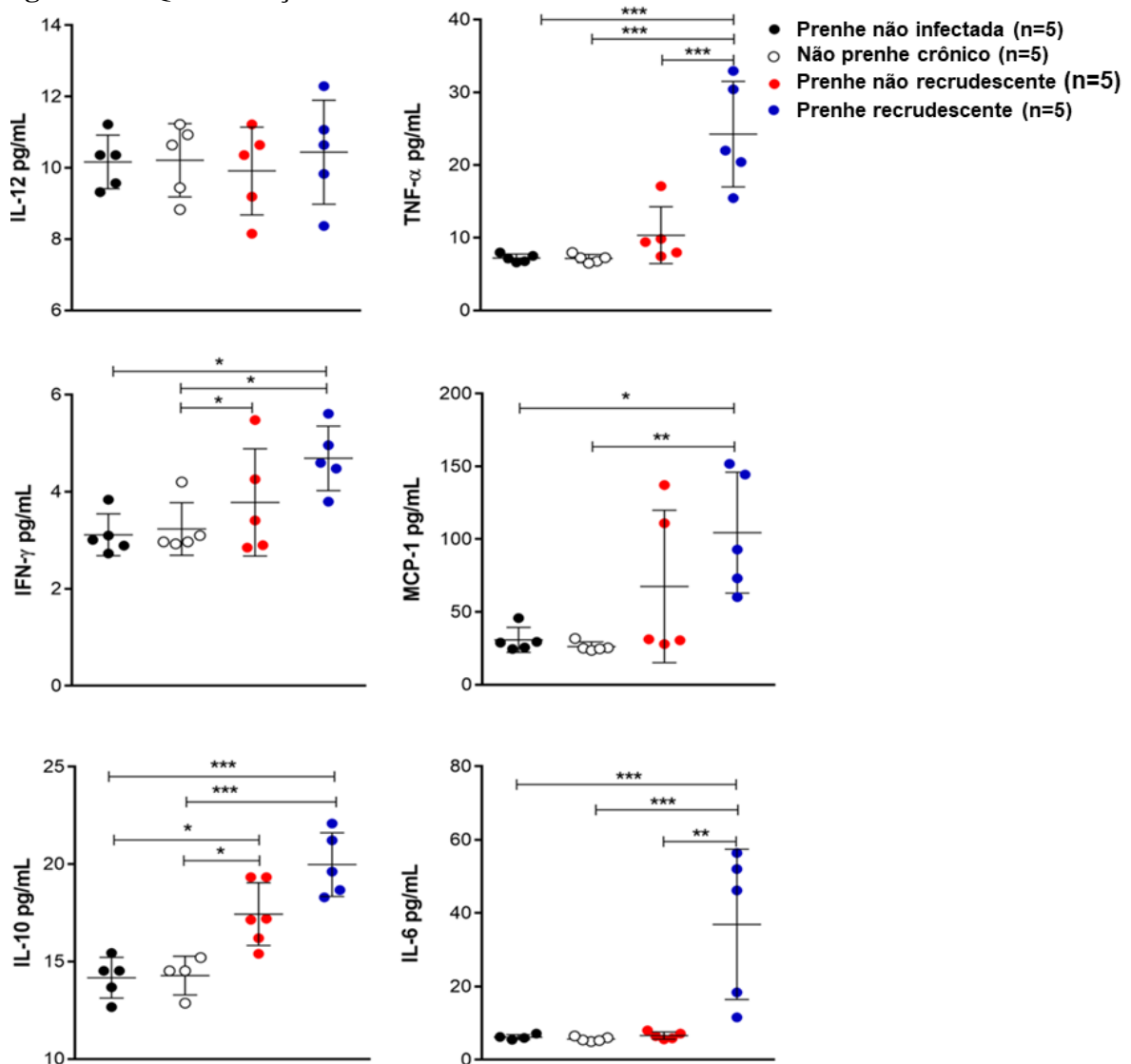


Animais BALB/c foram infectados i.p. com  $10^4$  E.P. de *P. berghei*, sendo o dia de infecção considerado D0. O tratamento com cloroquina (0,7mg/dia/animal) foi feito durante 3 dias a partir do D7. O acasalamento ocorreu cerca de 50 dias após a infecção. No dia 19 da prenhez, as placentas foram obtidas e coradas com H&E. (A) resultado das mensurações do espaço vascular placentário dos três grupos estudados. Fotomicrografia de corte histológico de placenta de (B) camundongo prenhe não infectado, (C) camundongo prenhe não recrudescente e (D) camundongo prenhe recrudescente. As áreas sinusoidais da placenta foram quantificadas em relação à área total da placenta, utilizando um método automatizado de avaliação morfométrica descrito nos Materiais e Métodos. Dados representativos de dois experimentos independentes expressos com média  $\pm$  DP. Para a análise estatística foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. \*\*\*  $p < 0,001$ .

Com o intuito de avaliar se as alterações observadas estavam associadas a uma mudança do perfil inflamatório, foi feita a quantificação de citocinas séricas relacionadas ao perfil pró- e anti-inflamatório. Conforme esperado, observou-se um aumento significativo na produção de algumas citocinas pró-inflamatórias nos animais prenhes recrudescentes em comparação com os prenhes não infectados (TNF- $\alpha$  30 pg/mL vs. 8 pg/mL, MCP-1 165,4 pg/mL vs. 32 pg/mL e IL-6 50,4 pg/mL vs. 7 pg/mL) (**Figura 19**). Ao mesmo tempo, a IL-10 apresentou um aumento significativo de 1,5 vezes no grupo de animais prenhes recrudescentes,

comparado com o grupo prenhe não infectado (20 pg/mL vs. 14 pg/mL) (**Figura 19**), mostrando a possível presença de uma infecção ativa (153). Convém chamar atenção que foi observado um aumento significativo da IL-10 em prenhes não recrudescentes em comparação com o grupo de prenhes não infectados (17,2 pg/mL vs. 14 pg/mL) (**Figura 19**). Esses dados poderiam mostrar a existência de um processo inflamatório ativo, possivelmente devido à presença do parasito ou aos restos destes ainda presentes.

**Figura 19** - Quantificação de citocinas séricas



Animais BALB/c foram infectados i.p. com  $10^4$  E.P. de *P. berghei*, sendo o dia de infecção considerado D0. O tratamento com cloroquina (0,7mg/dia/animal) foi feito durante 3 dias a partir do D7. O acasalamento ocorreu cerca de 50 dias após a infecção. Análise de citocinas pró- e anti-inflamatórias: INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-6, IL-10 e IL-12 no soro de prenhes não infectados, não prenhes crônicos, prenhes não recrudentes e prenhes recrudentes infectados com *P. berghei* ANKA<sup>GFP</sup>. Dados representativos de um único experimento expresso com média  $\pm$  DP. Para a análise estatística foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

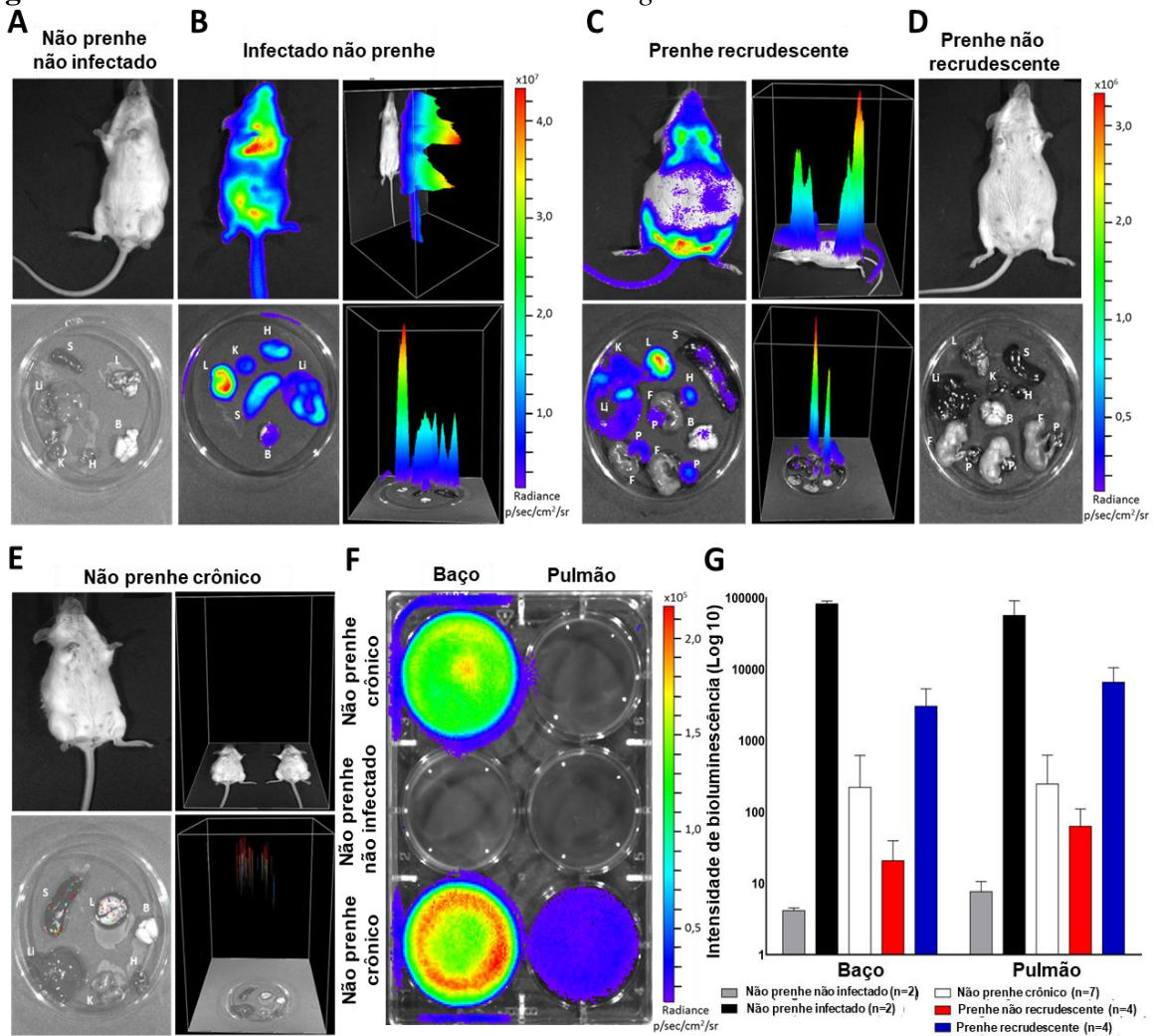
#### 4.4 Identificação do acúmulo do parasito mediante a atividade da luciferase e qRT PCR

De forma interessante, nossos achados mostram que animais prenhes não recrudescentes apresentam o sistema imune estimulado mesmo na ausência de parasitemia periférica (**Figura 17 e 19**). Por outro lado, estes animais também apresentam problemas no desenvolvimento placentário evidenciados pela redução do espaço vascular (**Figura 18**). Estes achados em conjunto indicam a presença de uma infecção subpatente em curso. Nesta etapa, nós perguntamos qual seria o tecido responsável por abrigar os parasitos?

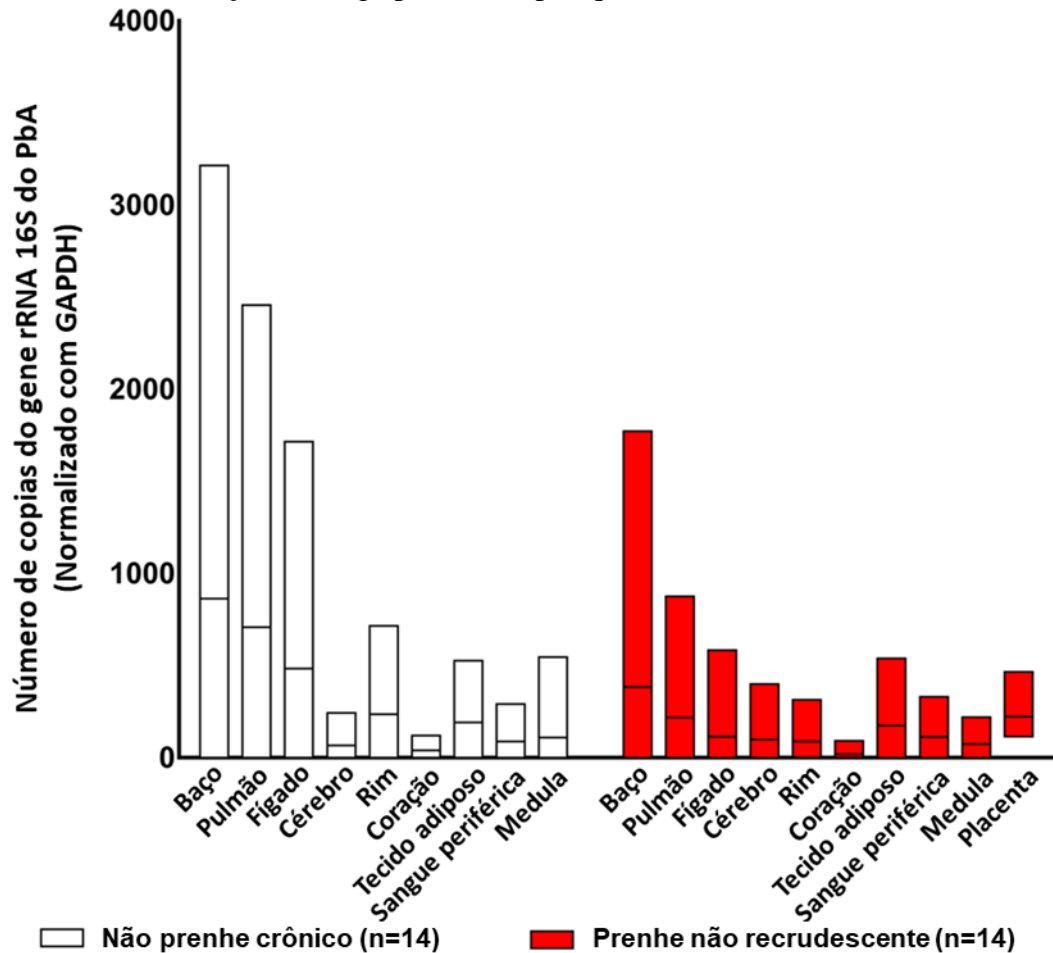
Assim, utilizando um ensaio de bioluminescência, pela catálise da D-Luciferina, em camundongos infectados com um clone de *P. berghei*<sup>luciferase</sup> foi possível fazer uma varredura buscando localizar o parasito no corpo dos animais e/ou órgãos dissecados. Desse modo, verificou-se que camundongos prenhes não recrudescentes (**Figura 20D e G**) e não prenhes crônicos (**Figura 20E, F e G**) possuíam um elevado sinal de bioluminescência no baço e no pulmão indicando a presença de parasitos viáveis nestes órgãos. Camundongos prenhes não infectados, nos quais não se observa nenhuma bioluminescência (**Figura 20 A**), foram utilizados como controle negativo da técnica. Camundongos infectados não prenhes e prenhes recrudescentes, usados como controles positivo, apresentaram praticamente todos os tecidos bioluminescentes (**Figuras 20B e C**, respectivamente).

Os resultados obtidos como os ensaios de bioluminescência foram posteriormente confirmados por qRT-PCR para o gene da subunidade C do rRNA 18S do *P. berghei* ANKA nos diferentes tecidos. Assim demonstrou-se que o baço e os pulmões de camundongos não prenhes crônicos e prenhes não recrudescentes são órgãos imprescindíveis tanto para o acúmulo quanto para manutenção de um pequeno numero de parasitos vivos (de 0 a 4000 cópias do gene rRNA 18S do *P. berghei* ANKA por miligrama de tecido para não prenhes crônicos, e de 0 a 1.000 cópias para o gene rRNA 18S do *P. berghei* ANKA para prenhes não recrudescentes) (**Figura 21**).

**Figura 20** - Ensaio de bioluminescência com *P. berghei*<sup>Luciferase</sup>



Animais BALB/c foram infectados i.p. com  $10^4$  E.P. de *P. berghei*, sendo o dia de infecção considerado D0. O tratamento com cloroquina (0,7mg/dia/animal) foi feito durante 3 dias a partir do D7. O acasalamento ocorreu cerca de 50 dias após a infecção. Após a injeção intraperitoneal da D-Luciferina foi mensurada a bioluminescência nos diferentes órgãos e no corpo de (A) camundongos não prenhes não infectados, (B) não prenhes infectados (agudos, parasitemia periférica 9,1%), (C) prenhes recrudescentes (parasitemia periférica 2,4%), (D) prenhes não recrudescentes (parasitemia periférica 0,0%), (E) não prenhes crônicos (parasitemia periférica 0,0%). (F) Suspensão celular de baço e pulmões de camundongos não prenhes crônicos (parasitemia periférica 0,0%), aos quais foi adicionado D-luciferina e a bioluminescência foi medida. S = baço, L= pulmão, Li= fígado, H= coração, B= cérebro, K= rim, P= placenta e F= feto. (G) Os valores dos baços e pulmões, os quais apresentaram maiores níveis de bioluminescência, foram dispostos em gráfico. Dados representativos de um único experimento expresso com média  $\pm$  DP.

**Figura 21** - Quantificação da carga parasitária por qRT PCR

Animais BALB/c foram infectados i.p. com  $10^4$  E.P. de *P. berghei*, sendo o dia de infecção considerado D0. O tratamento com cloroquina (0,7mg/dia/animal) foi feito durante 3 dias a partir do D7. O acasalamento ocorreu cerca de 50 dias após a infecção. Quantificação da expressão do gene *P. berghei* rRNA 18S nos diferentes tecidos de camundongos não prenhes crônicos e prenhes não recrudescentes. A expressão foi normalizada pelo GAPDH e quantificada utilizando-se a curva de quantificação do gene *P. berghei* rRNA 18S. Curva padrão: Slope: -3,56; Y-inter: 33,948;  $R^2$ :0,998; Eff%: 90,924. Curva padrão realizada com diluições seriadas do parasito: de  $2 \times 10^9$  parasitos/uL até 2 parasitos/uL. Dados representativos de um único experimento expresso com média  $\pm$  DP.

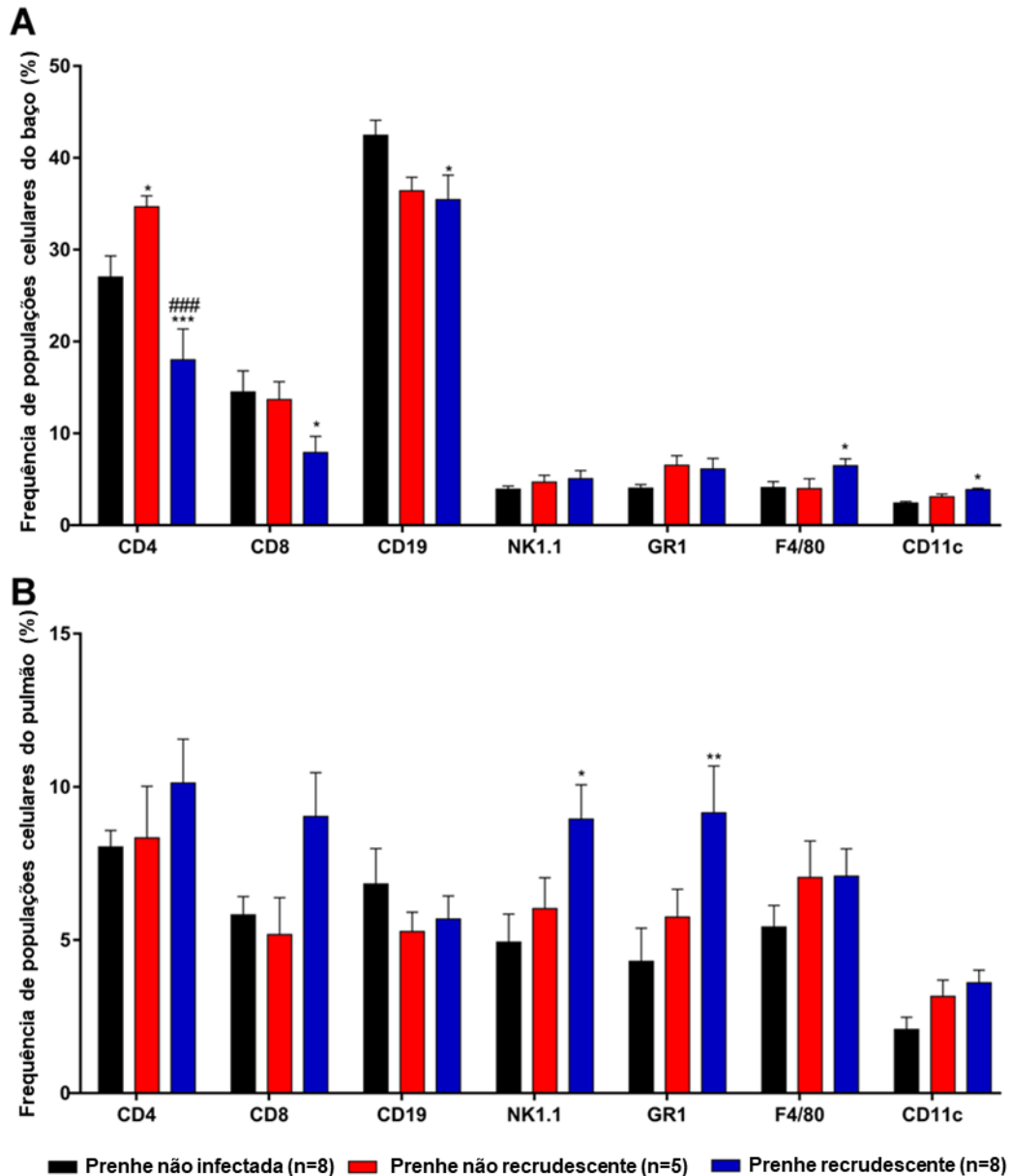
#### 4.5 As DCs são capazes de abrigar o *P. berghei* em camundongos não prenhes crônicos

Considerando que o baço e os pulmões apresentam não apenas um grande acúmulo do parasito (**Figura 20 e 21**), bem como informações anteriores mostrando que as células dendríticas têm a capacidade de hospedar e manter o parasito vivo em seu interior (150, 156), optou-se por avaliar as populações de células presentes nestes tecidos, especialmente os fagócitos em virtude da importância destas células na eliminação do parasito durante a infecção precoce. Após a imunomarcagem e a identificação de diferentes populações celulares, observou-se um aumento significativo de macrófagos e DCs no baço de camundongos prenhes recrudescentes, em comparação com os camundongos prenhes não infectados (para



Macrófago  $6,4 \pm 0,9$  vs.  $4,1 \pm 0,4\%$  e para DCs  $3,8 \pm 0,4$  vs.  $4,1 \pm 0,3\%$ ) (**Figura 22A**), fato não foi evidenciado nos pulmões (**Figura 22B**).

**Figura 22** - Análise por citometria de fluxo da frequência de células esplênicas e pulmonares



Animais BALB/c foram infectados i.p. com  $10^4$  E.P. de *P. berghei*, sendo o dia de infecção considerado D0. O tratamento com cloroquina (0,7mg/dia/animal) foi feito durante 3 dias a partir do D7. O acasalamento ocorreu cerca de 50 dias após a infecção. Frequência de diferentes subpopulações de células T CD4, linfócitos T CD8, linfócitos B (CD19), *Natural Killer* (NK1.1), macrófagos (F4/80) e células dendríticas (CD11c) presentes (**A**) no baço e (**B**) no pulmão de prenhes não infectados, prenhes não recrudescentes e prenhes recrudescentes no dia 19 da prenhez (G19). Dados representativos de um único experimento expresso com média  $\pm$  DP. \*  $p < 0,05$  em relação ao prenhe não infectado; \*\*  $p < 0,01$  em relação ao prenhe não infectado; prenhe recrudescente: ###  $p < 0,001$  em relação ao prenhe não recrudescente. Para a análise estatística, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis.

Os resultados preliminares deste trabalho evidenciaram a presença do parasito no baço e no pulmão dos animais não prenhes crônicos, bem como a capacidade de fagocitar e manter o

parasito vivo por algum tempo dentro das células dendríticas purificadas (147), da mesma forma como demonstrado por Wykes e colaboradores (154). Após identificar um acúmulo do parasito no baço e nos pulmões de camundongos não prenhes crônicos (**Figura 22**), e um aumento da frequência das DCs e macrófagos no baço (**Figura 22A**), o próximo passo consistiu em identificar os principais fagócitos responsáveis pela *clearance* do parasito.

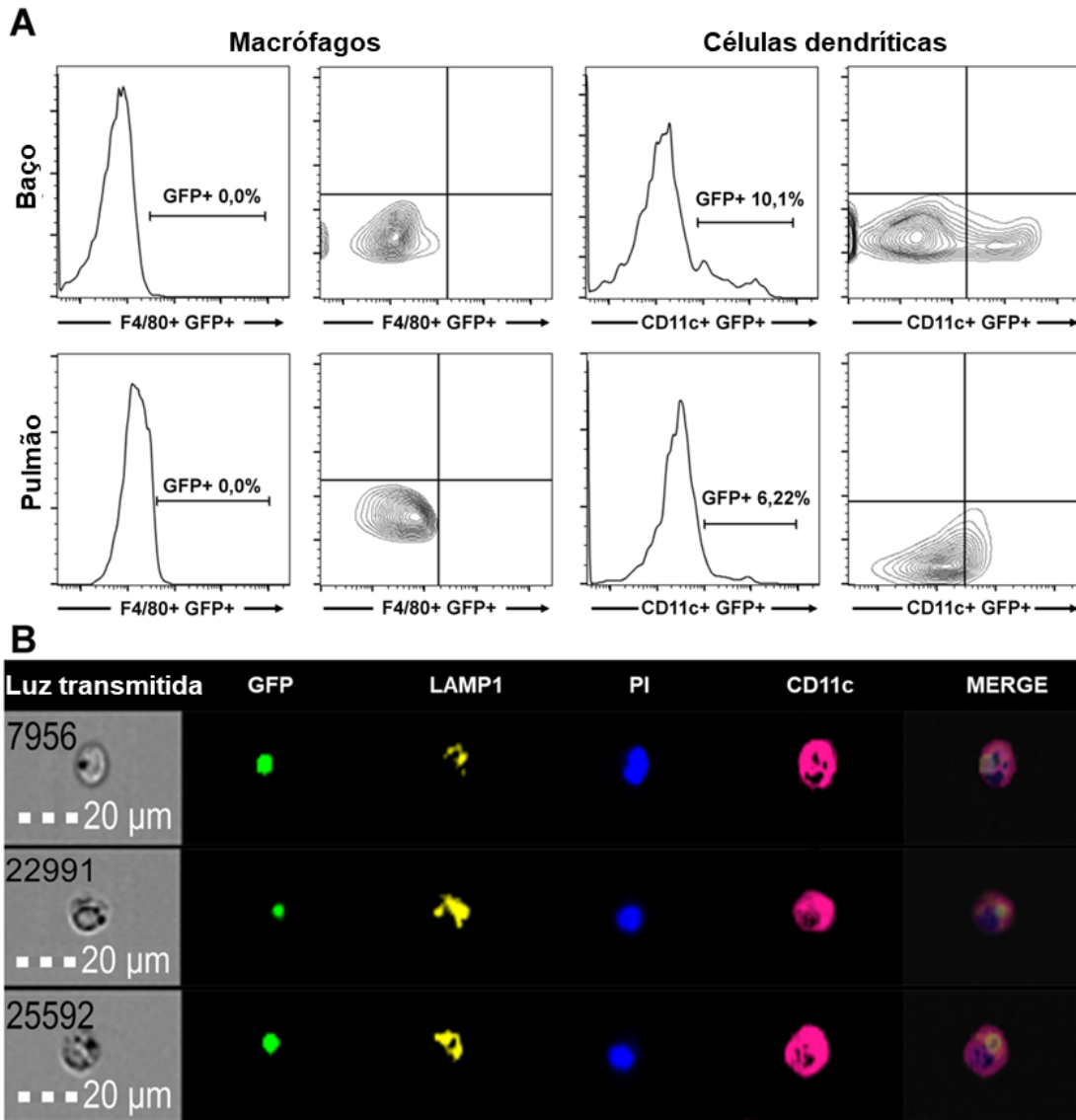
Para este objetivo, as DCs provenientes do baço e pulmões de camundongos não prenhes crônicos foram enriquecidas com a utilização do *kit* de seleção negativa para CD11c, seguido de marcação com os anticorpos anti-IAb (MHC-II), CD3, CD19 e CD11c e purificadas pela técnica de *cell sorter*. Assim, selecionou-se uma população IAb+ e uma população de células CD11c+. Dentre as células CD3-CD19-IAb+CD11c+, observou-se a presença de GFP, ou seja, um marcador da viabilidade do parasito.

Interessantemente, 10,1% das DCs foram positivas para GFP no baço (**Figura 23A**, painéis acima e à direita) e 6,22% no pulmão (**Figura 23A**, painéis abaixo e à direita). Por outro lado, não foi observada a marcação para GFP nos macrófagos (F4/80+) esplênicos (**Figura 23A**, painéis acima e à esquerda) e dos pulmões (**Figura 23A**, painéis abaixo e à esquerda).

Os resultados descritos acima indicam fortemente que as DCs podem abrigar os eritrócitos infectados em seu interior. Assim, foi necessário utilizar uma outra metodologia para confirmar esta afirmação. Nestes entido analizamos DCs isoladas do baço de camundongos não prenhes crônicos utilizando a citometria de imagem ImageStream®X com resolução de 20X. Na **Figura 23B** pode-se claramente observar a presença do parasito vivo no interior de células CD11c+ e colocalizadas com LAMP1 ou CD107a, um marcador de vesículas ácidas.

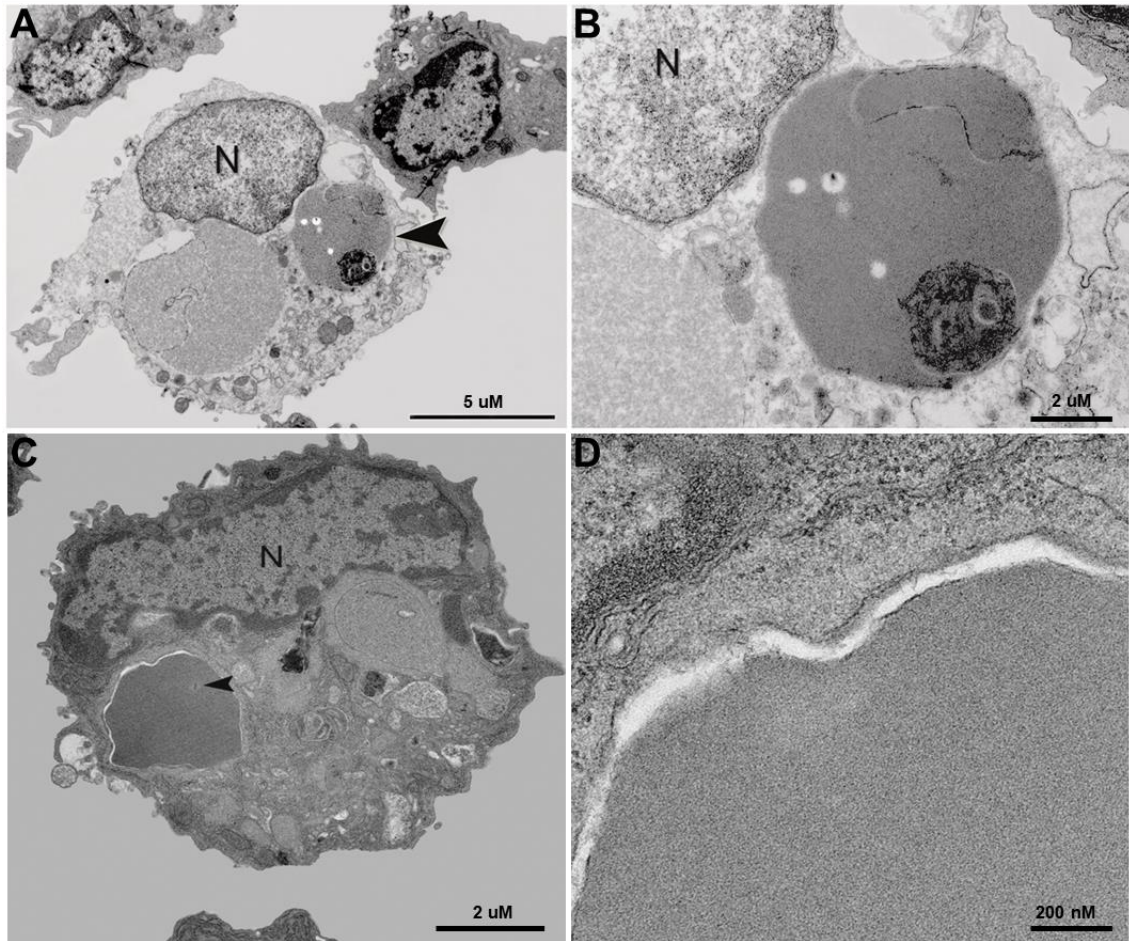
Por ultimo, os dados mostrados por qRT-PCR, bioluminescência e citometria convencional e de imagem foram corroborados por imagens provenientes de microscopia eletrônica. Assim a partir de DCs isoladas por enriquecimento e cell sorter do baço de camundongos não prenhes crônicos, observou-se um eritrócito infectado no interior do citoplasma de uma DC (**Figura 24A e C**). Cabe também salientar que corroborando com os resultados da colocalização com LAMP1 foi possível também demonstrar que os eritrócitos presentes no interior das DCs estavam contidos numa membrana dupla (**Figura 24Be D**).

**Figura 23** - Identificação de *P. berghei* em células dendríticas do baço e pulmões de BALB/c não prenhes crônicos



Animais BALB/c foram infectados i.p. com  $10^4$  E.P. de *P. berghei*, sendo o dia de infecção considerado D0. O tratamento com cloroquina (0,7mg/dia/animal) foi feito durante 3 dias a partir do D7. O acasalamento ocorreu cerca de 50 dias após a infecção. (A) As células do baço (painel superior) e pulmão (painel inferior) de camundongos não prenhes crônicos foram marcadas para F4/80 (gráficos da esquerda e histogramas) e CD11c (gráficos da direita e histogramas) para determinar a localização do sinal do GFP com o objetivo de identificar o *P. berghei* ANKA GFP. Dados representativos de três experimentos independentes expressos em frequência (%). (B) DCs enriquecidas e purificadas a partir do baço de camundongos não prenhes crônicos foram marcadas com CD11c, LAMP-1 e PI. A presença do parasito viável foi confirmada pela expressão GFP. A análise das células dendríticas foi feita por citometria de imagem ImageStream®X, enquanto a análise de internalização foi feita com o *software* IDEAS versão 6.1. Imagem representativa de três experimentos independentes.

**Figura 24** - Microscopia eletrônica de DCs contendo um eritrócito infectado com *P. berghei*



Animais BALB/c foram infectados i.p. com  $10^4$  E.P. de *P. berghei*, sendo o dia de infecção considerado D0. O tratamento com cloroquina (0,7mg/dia/animal) foi feito durante 3 dias a partir do D7. O acasalamento ocorreu cerca de 50 dias após a infecção. As DCs enriquecidas, purificadas e positivas para GFP (presença de *P. berghei*) de camundongos não prenhes crônicos foram avaliadas pela técnica de microscopia eletrônica de varredura para confirmação da presença de parasitos no seu interior. (A) A ponta da seta indica a localização do iRBC (*infected red blod cell*) intacto. (B) Eritrócito com o parasito intacto inserido numa vesícula com dupla membrana, observada em (D) com maior aumento. (C) Presença do eritrócito intacto evidenciando uma parte do parasito, indicada com a seta. Imagem representativa de um único experimento.

#### 4.6 Efeito da depleção de células dendríticas na recrudescência da infecção

A destruição do *Plasmodium* pelo tratamento antimalárico ou pelo sistema imunológico pode ser dificultada se este parasito estiver protegido dentro de DCs, como já foi descrito em alguns trabalhos (157, 158). Assim, considerando os resultados obtidos até o momento pode-se inferir que o recrudescimento após tratamentos poderia ser atribuído à proteção do parasito conferida pelas DCs (104).

Com o intuito de confirmar a função crucial das DCs no fenômeno de recrudescência, camundongos não prenhes crônicos foram tratados com lipossomas contendo clodronato (CILip), a cada 72 horas por 7 dias, com intuito de eliminar todos os fagócitos, em especial as células dendríticas. Em seguida, os animais foram acasalados com a finalidade de observar a

possibilidade de recrudescência da infecção durante a prenhez. Para o controle negativo do ensaio foram utilizados lipossomas contendo PBS (PBSLip).

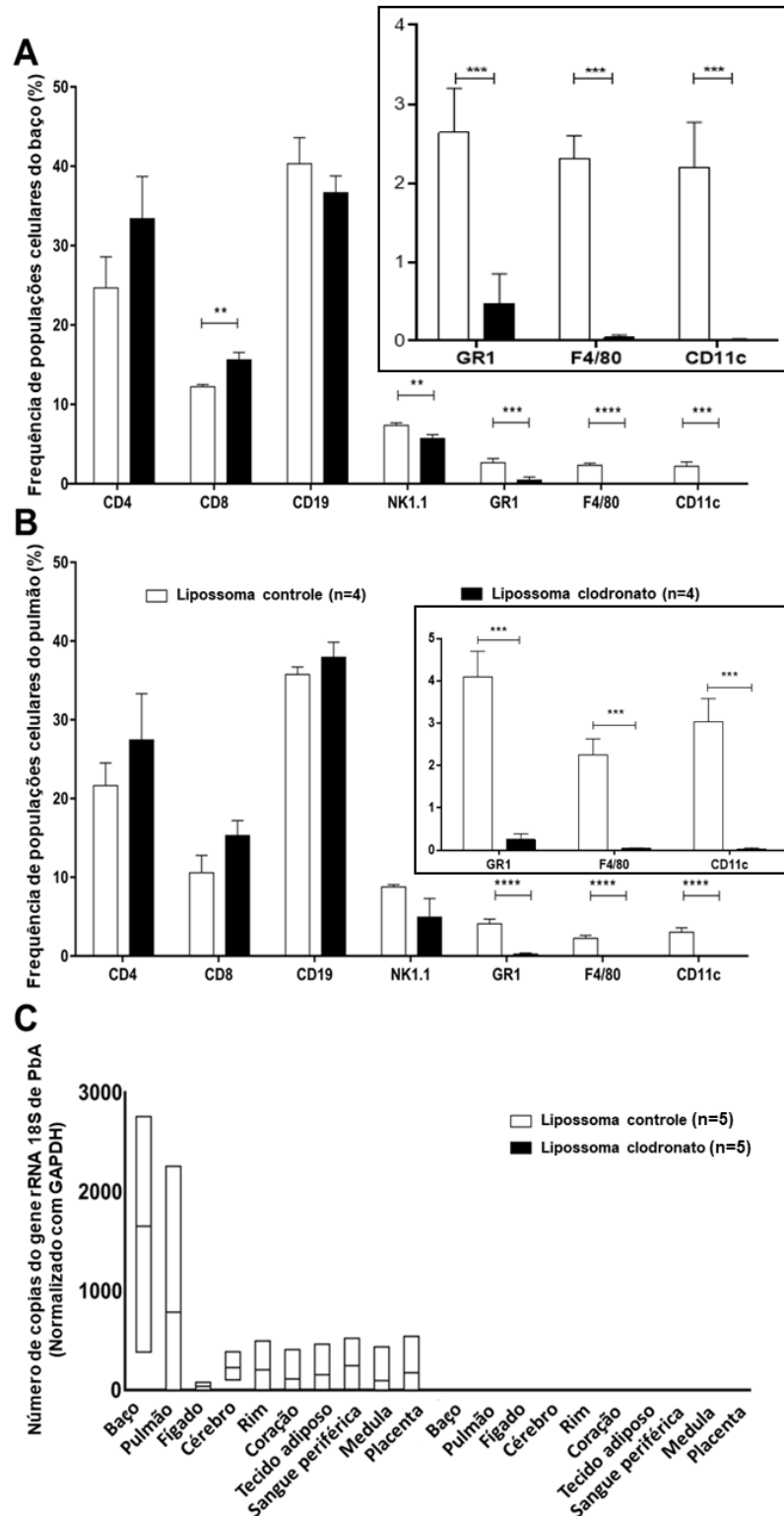
Por conseguinte, para identificar o efeito do CILip na depleção dos fagócitos, fez-se a avaliação de diferentes populações celulares (**Figura 25A e B**) logo após o término do tratamento (após o 7º dia de tratamento com CILip ou PBCLip). A análise por citometria de fluxo mostrou que as DCs (CD11c+) sofreram depleção, com uma redução significativa de mais de cem vezes tanto nos pulmões quanto no baço, em relação ao grupo tratamento com PBSLip (controle). Para os macrófagos (F4/80+) houve uma redução significativa, mais de cinquenta vezes, em ambos os tecidos. Nos monócitos (GR1+) a redução foi mais de cinco vezes no baço e dezesseis vezes nos pulmões (**Figura 25A e B**). A população de NK (NK1.1+) no baço também apresentou redução significativa com o tratamento (**Figura 25A**).

No experimento seguinte, após o tratamento com lipossoma com clodronato e lipossoma controle, os camundongos crônicos foram acasalados passados 15 dias do tratamento e tiveram os órgãos coletados no 19º dia de prenhez, para avaliar, por qRT-PCR, a presença ou não de *P. berghei* através da análise da expressão do rRNA 18S.

A presença do parasito não foi detectada em nenhum dos dez tecidos avaliados nos animais tratados com CILip (**Figura 25C**, direita). No grupo de camundongos tratados com o PBSLip, todos os tecidos foram positivos para a expressão do rRNA 18S do *P. berghei*, sendo conforme mostrado anteriormente (**Figura 21**) mais abundante a presença do parasito no baço e nos pulmões (**Figura 25C**, esquerda).

Interessantemente, não foi observada a aparição de um novo pico de parasitemia nem antes, nem durante, nem após o tratamento (passados 15 dias do tratamento) com CILip (**Figura 26**, abaixo). Também não se observou nenhum caso de recrudescência durante a gestação nos camundongos tratados com CILip (**Figura 26**, abaixo), diferente do observado em animais tratados com PBSLip, que apresentaram recrudescimento após o dia 13 de gestação (**Figura 25**, acima). Estes resultados mostram que, o tratamento com lipossomas foi capaz de destruir todas as células dendríticas que abrigavam o parasito abolindo por completo o recrudescimento da infecção durante a prenhez.

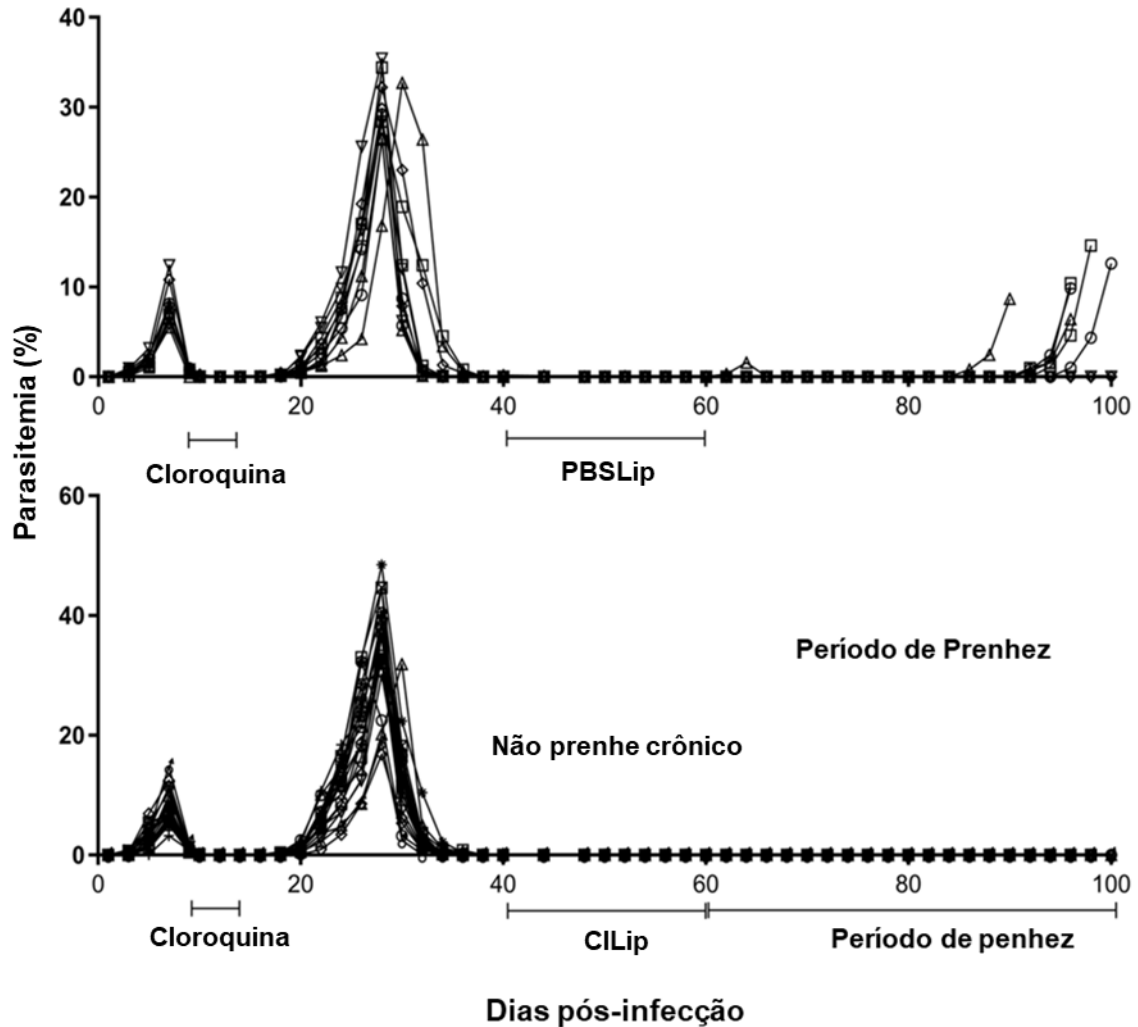
**Figura 25** - Frequência de diferentes populações leucocitárias que sofreram depleção com o tratamento com clodronato



Animais BALB/c foram infectados i.p. com  $10^4$  E.P. de *P. berghei*, sendo o dia de infecção considerado D0. O tratamento com cloroquina (0,7mg/dia/animal) foi feito durante 3 dias a partir do D7. Frequência de diferentes populações, como: células T CD4, linfócitos T CD8, linfócitos B (CD19), *Natural Killer* (NK1.1), monócitos (GR1), macrófagos (F4/80) e células dendríticas (CD11c) presentes em (A) baço e (B) nos pulmões de camundongos não prenhes crônicos tratados com CILip ou PBSLip, com intenção de identificar populações que sofreram depleção pelo tratamento com clodronato. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Para a análise estatística, utilizou-se o teste t de *student*. (C) Após 15 dias do tratamento, as fêmeas tratadas com o lipossoma com clodronato (CILip) e lipossoma controle (PBSLip) ficaram prenhez e no dia 19 da gestação diferentes tecidos foram avaliados para identificar a carga parasitária por amplificação do gene rRNA 18S do *P. berghei*, e

quantificação usando uma curva padrão para *P. berghei* ANKA<sup>GFP</sup>: Slope: -3,061; Y-inter: 33,273; R2: 0,99; Eff%: 112,158. O GAPDH foi usado como controle interno e para normalizar os resultados. Dados representativos de um único experimento expresso com média  $\pm$  DP.

**Figura 26** - Efeito da depleção de fagócitos no recrudescimento da infecção durante a prenhez



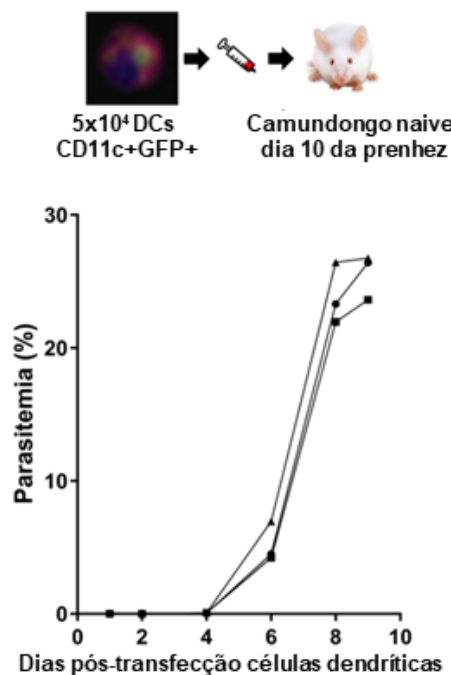
Animais BALB/c foram infectados i.p. com  $10^4$  E.P. de *P. berghei*, sendo o dia de infecção considerado D0. O tratamento com cloroquina (0,7mg/dia/animal) foi feito durante 3 dias a partir do D7. O acasalamento ocorreu cerca de 50 dias após a infecção. O tratamento com CILip ou PBSLip foi feito no d40 pós-infecção três vezes por 7 dias. O acasalamento ocorreu cerca do d60 (dia 60 pós-infecção). No dia 19 da prenhez, as fêmeas foram dissecadas e as amostras dos diferentes tecidos foram coletadas para outras análises. Dados representativos de um único experimento.

Após observar que a gestação representa uma condição fundamental para a geração da recrudescência e que também as DCs são importantes na geração deste fenômeno, DCs positivas para GFP (com parasito vivo internalizado) foram purificadas do baço dos camundongos não prenhes crônicos, por enriquecimento e *cell sorter*. As células dendríticas duplo positivas para CD11c e GFP foram transferidas, por injeção intravenosa, nas concentrações de 5.000, 10.000 e 50.000 células, para camundongos *naive* no 10<sup>o</sup> dias de

preñez. Em paralelo, como controle, semelhante protocolo foi aplicado em camundongos *naive* não prenhes (**Tabela 9**).

A geração de uma nova infecção foi evidenciada apenas nos camundongos prenhes que receberam 50.000 DCs GFP+ (**Figura 27**). A parasitemia no sangue periférico começou a ser detectada por citometria de fluxo no dia 4 pós-transfecção (dia 14 de prenhez) e no dia 19 da prenhez foi avaliado o peso dos fetos, o qual apresentou uma redução de mais de 25% (Média de peso fetal= 0,79 vs. 1,06 g) em relação aos fetos dos camundongos que não desenvolveram infecção. Da mesma forma, o baço apresentou aumento do peso de mais de duas vezes em relação aos camundongos que não desenvolveram infecção (**Tabela 9**). A partir desses dados, pode-se mostrar que as DCs, que abrigam o parasito vivo, têm a capacidade de liberar e gerar uma nova infecção, contudo, este fenômeno acontece apenas mna prenhez, indicando que as condições próprias da gestação, como por exemplo, flutuações hormonais são necessárias para o desenvolvimento do fenômeno de recrudescência.

**Figura 27** - Transferência de células dendríticas positivas para *P. berghei* para camundongos prenhes



Foram transferidas (i.v.)  $5 \times 10^4$  DCs positivas para GFP enriquecidas e separadas por *sorter* aos camundongos no 10º dia de prenhez (n= 3). A parasitemia foi medida por citometria de fluxo. Dados representativos de um único experimento.



**Tabela 9** - Transferência de células dendríticas positivas para *P. berghei* em camundongos prenhes

Transferência de células dendríticas CD11c+GFP+ enriquecidas e purificadas por <i>cell sorter</i> .								
		Dia da gestação	Número de DCs	Parasitemia (%) <sup>a</sup>	Peso do baço (g)	Número de fetos	Peso placenta (g)	Peso do feto (g)
<b>Grupo 1</b>	1	10	5000	0	0,125	4	0,124	1,103
	2	10	5000	0	0,103	5	0,136	1,084
	3	10	5000	0	0,115	4	0,098	1,072
<b>Grupo 2</b>	1	10	10000	0	0,122	4	0,102	1,010
	2	10	10000	0	0,144	4	0,094	1,112
	3	10	10000	0	0,132	6	0,114	0,998
<b>Grupo 3</b>	1	10	50000	<b>26,42</b>	0,222	4	0,116	0,822
	2	10	50000	<b>23,63</b>	0,295	6	0,104	0,764
	3	10	50000	<b>26,76</b>	0,267	4	0,098	0,802
<b>Grupo 4</b>	1	NP	5000	0	0,112	NA	NA	NA
	2	NP	5000	0	0,106	NA	NA	NA
	3	NP	5000	0	0,134	NA	NA	NA
<b>Grupo 5</b>	1	NP	10000	0	0,147	NA	NA	NA
	2	NP	10000	0	0,123	NA	NA	NA
	3	NP	10000	0	0,113	NA	NA	NA
<b>Grupo 6</b>	1	NP	50000	0	0,108	NA	NA	NA
	2	NP	50000	0	0,111	NA	NA	NA
	3	NP	50000	0	0,120	NA	NA	NA

NP= Não prenhe.

NA= Não se aplica.

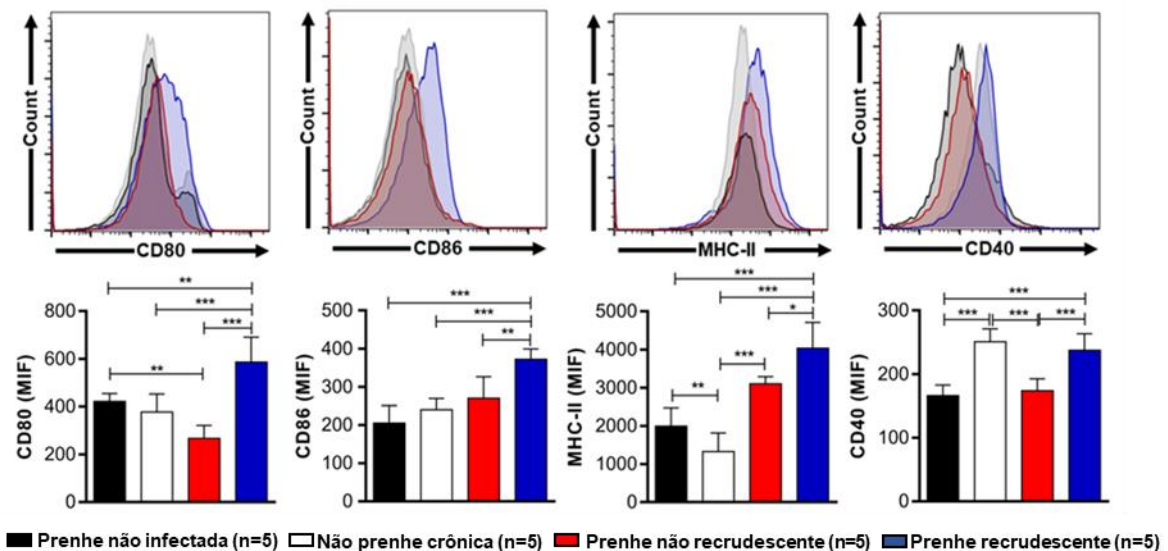
#### 4.7 Análise de marcadores de ativação de células dendríticas por citometria de fluxo

Baseado no resultado anterior, e considerando a importância das DCs na proteção do parasito, foi analisado o perfil de ativação das DCs do baço de camundongos prenhes não infectados, não prenhes crônicos, prenhes não recrudescentes e prenhes recrudescentes. Assim, os esplenócitos foram obtidos e marcados com anticorpos específicos. Foi feita uma seleção negativa das populações CD3+/CD19+ e, subsequentemente, as células positivas para

CD11c e MHC-II foram selecionadas para análise. Os resultados indicaram que as DCs de animais prenhes recrudescentes mostram um aumento significativo em seu perfil de ativação de: CD80 (MIF  $586,5 \pm 85,3$  vs.  $421,6 \pm 27,0$ ), CD86 (MIF  $372,0 \pm 22,6$  vs.  $205,1 \pm 30,3$ ), MHC-II (MIF  $4033,1 \pm 473,1$  vs.  $1995,5 \pm 319,1$ ) e CD40 (MIF  $237,3 \pm 20,6$  vs.  $166,3 \pm 13,6$ ) em comparação com os camundongos prenhes não infectados (**Figura 28A**). Curiosamente, camundongos prenhes não recrudescentes apresentaram uma redução significativa de CD80 (MIF  $237,3 \pm 20,6$  vs.  $166,3 \pm 13,6$ ), enquanto CD86, MHC-II e CD40 foram mantidos com um perfil similar ao grupo de animais prenhes não infectados.

Por outro lado, os camundongos não prenhes crônicos apresentaram uma redução significativa do MHC-II (MIF  $237,3 \pm 20,6$  vs.  $166,3 \pm 13,6$ ), ao passo que as moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 foram mantidos com perfil semelhante ao grupo de prenhes não infectados, como já havia sido observado por outros autores para *P. falciparum* em uma infecção submicroscópica, em que, apesar da presença do parasito, as DCs permaneceram inativas e com baixa expressão de CD80, CD86 e MHC-II (156). Cabe salientar que, neste modelo, a expressão de CD40 nos camundongos não prenhes crônicos mostrou um aumento significativo em relação aos camundongos prenhes não infectados (MIF 1,5 vezes), ao contrário do que já foi mostrado em múltiplos trabalhos (22, 105, 160).

**Figura 28** - Análise de marcadores de ativação de células dendríticas por citometria de fluxo



Animais BALB/c foram infectados i.p. com  $10^4$  E.P. de *P. berghei*, sendo o dia de infecção considerado D0. O tratamento com cloroquina (0,7mg/dia/animal) foi feito durante 3 dias a partir do D7. O acasalamento ocorreu cerca de 50 dias após a infecção. Perfil de ativação para: CD80, CD86, MHC-II e CD40, nas DCs do baço de prenhes não infectados, não prenhes crônicos, prenhes não recrudescentes e prenhes recrudescentes (na parte superior da figura observa-se o perfil do histograma e, na parte inferior, o mesmo resultado expresso em gráfico de barras). Dados representativos de um único experimento expresso com média  $\pm$  DP. Para a análise foi utilizado o teste de Kruskal-Waills, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

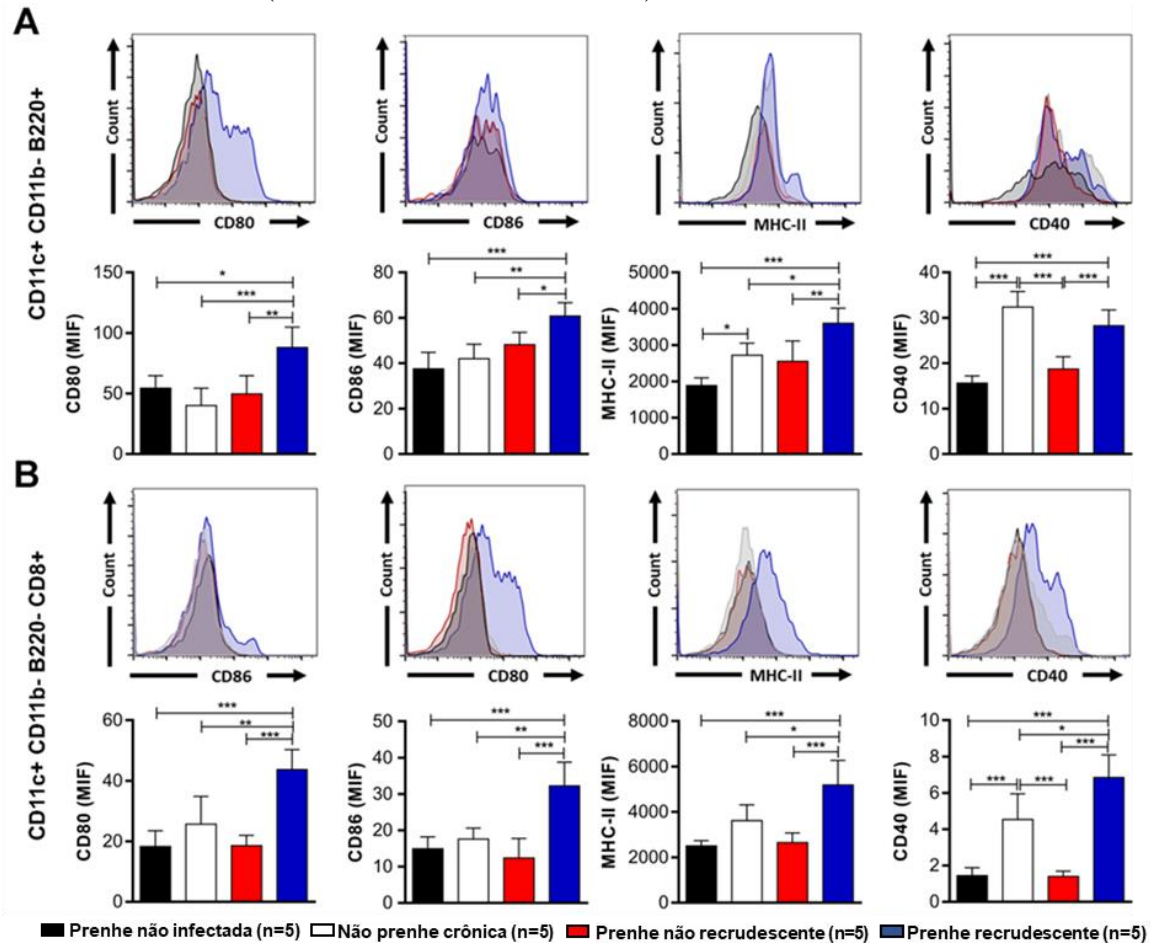
#### 4.8 Perfis de ativação das diferentes subpopulações de células dendríticas

Uma vez observados os perfis de ativação das DCs nos camundongos não prenhes crônicos, as principais subpopulações de DCs do baço foram também avaliadas nos diferentes grupos, como segue: pDCs= CD11c+CD11b-B220+; cDC CD8= CD11c+CD11b-B220-CD8+ (**Figura 29A e B**); cDC CD4= CD11c+B220-CD11b+CD4+; cDC CD4/CD8 duplo negativo= CD11c+B220-CD11b+CD4-CD8- (**Figura 30A e B**). Semelhante aos resultados anteriores (**Figura 27A**), as diferentes subpopulações de DCs (pDCs, cDCs CD8, cDCs CD4, cDCs CD4/CD8 duplo negativa) de camundongos prenhes recrudescentes apresentaram um perfil de ativação característico de uma infecção ativa por *Plasmodium*, em comparação com camundongos prenhes não infectados (**Figuras 29 e 30**).

No grupo de camundongos não prenhes crônicos, foi observado um aumento significativo na expressão de CD40 para todas as subpopulações de DCs (MIF para pDCs 1,8 vezes, cDCs CD8 4,5 vezes, cDCs CD4 1,3 vezes e cDCs CD4/CD8 duplo negativa 4,6 vezes), comparado aos camundongos prenhes não infectados (**Figuras 29 e 30**). Adicionalmente, foi detectado um aumento significativo da expressão de MHC-II em pDCs (MIF  $2644,7 \pm 272,9$  vs.  $1871,5 \pm 143,8$ ) (**Figura 29A**). Nas cDCs CD4/CD8 duplo negativas foi observada uma redução significativa da expressão de MHC-II (MIF  $2353 \pm 451,4$  vs.  $4227 \pm 632,5$ ) (**Figura 30B**) em relação aos camundongos prenhes não infectados. Isto é uma indicação clara da estimulação constante do *Plasmodium* ou de seus componentes.

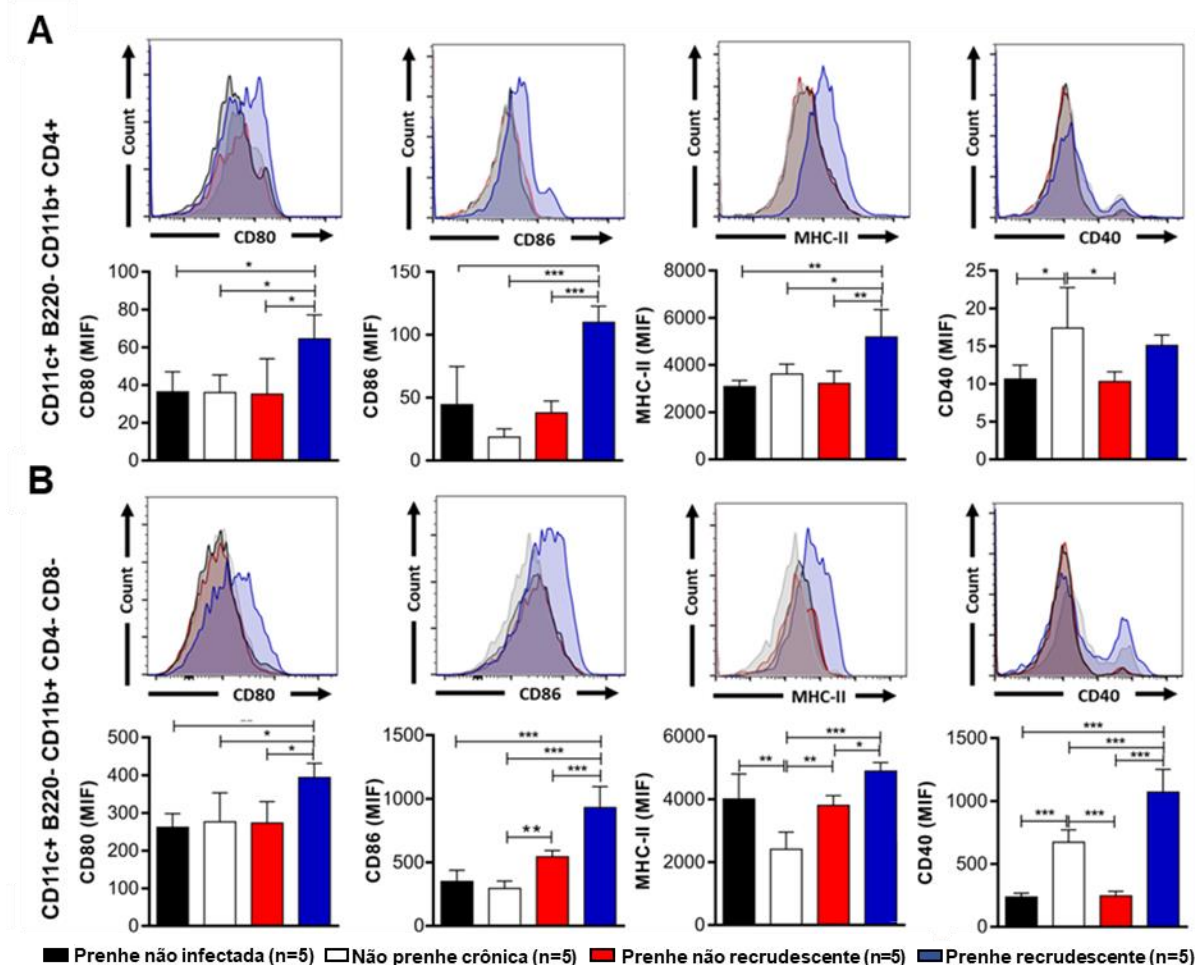
Nos camundongos prenhes crônicos observou-se nas diferentes subpopulações DCs uma expressão diminuída de alguns marcadores o que poderia indicar um estado basal de ativação e, ou uma condição de anergia ou tolerância ao parasito. Este é um dado interessante, uma vez que, estes animais apesar de ter parasitos vivos no baço, não conseguem uma ativação eficiente destas células, o que permitiria uma fácil sobrevivência de *P. berghei* no interior das mesmas.

**Figura 29** - Perfil de ativação de células dendríticas plasmocitoides (CD11c+CD11b-B220+) e convencionais CD8 (CD11c+CD11b-B220-CD8+)



Animais BALB/c foram infectados i.p. com  $10^4$  E.P. de *P. berghei*, sendo o dia de infecção considerado D0. O tratamento com cloroquina (0,7mg/dia/animal) foi feito durante 3 dias a partir do D7. O acasalamento ocorreu cerca de 50 dias após a infecção. **(A)** Perfil de ativação de: CD80, CD86, MHC-II e CD40 de pDCs (CD11c+CD11b-B220+); **(B)** Perfil de ativação de: CD80, CD86, MHC-II e CD40 de cDCs CD8 (CD11c+CD11b-B220-CD8+) do baço de camundongos prenhes não infectados, não prenhes crônicas e prenhes não recrudescentes e recrudescentes. Dados representativos de um único experimento expresso com média  $\pm$  DP. Para a análise foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

**Figura 30** - Perfil de ativação de células dendríticas convencionais CD4 (CD11c+CD11b-B220-CD8+) e CD4/CD8 duplo negativa do baço



Animais BALB/c foram infectados i.p. com  $10^4$  E.P. de *P. berghei*, sendo o dia de infecção considerado D0. O tratamento com cloroquina (0,7mg/dia/animal) foi feito durante 3 dias a partir do D7. O acasalamento ocorreu cerca de 50 dias após a infecção. **(A)** Perfil de ativação de: CD80, CD86, MHC-II e CD40 de cDCs CD4 (CD11c+B220-CD11b+CD4+); **(B)** Perfil de ativação de: CD80, CD86, MHC-II e CD40 de cDCs CD4/CD8 duplo negativa (CD11c+B220-CD11b+CD4-CD8-) do baço de camundongos prenhes não infectados, não prenhes crônicas, prenhes não recrudescentes e recrudescentes. Dados representativos de um único experimento expresso com média  $\pm$  DP. Para a análise foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.9 Análise das subpopulações de DCs do baço na fase aguda e crônica da infecção

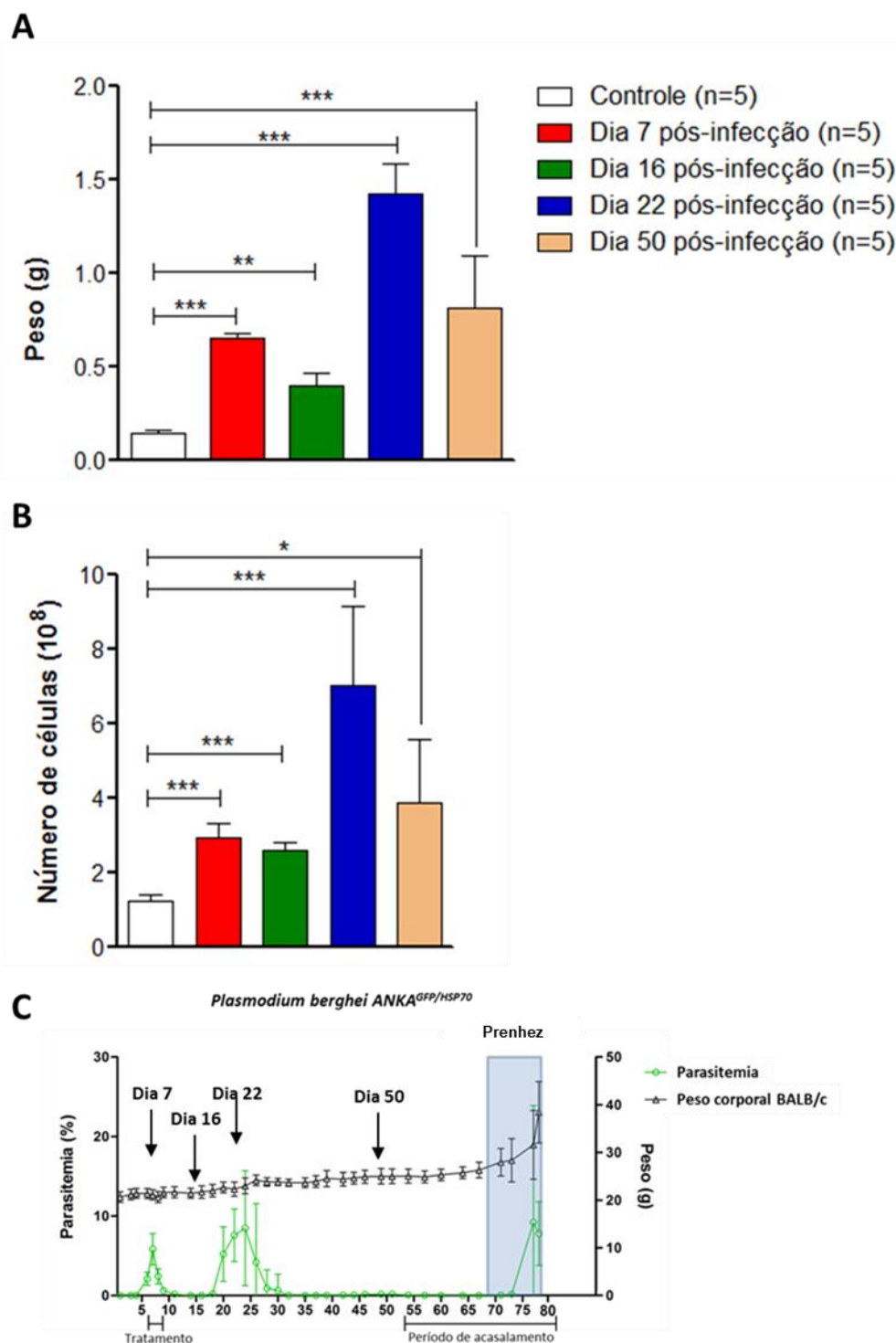
Nesta etapa, foram estudadas as modificações que a infecção pode induzir nas populações leucocitárias esplênicas dos animais não prenhes nas fases crônicas e agudas, tendo em vista que o baço trata-se de um órgão central para a retirada de eritrócitos parasitados da circulação. De partida, foi identificada uma diferença significativa no peso do baço e no número absoluto de células deste órgão de camundongos infectados em comparação com os não infectados, de acordo com as **Figuras 31A** e **31B**. Como esperado, o grupo de animais no dia 7 pós-infecção (agudo, primeiro pico de parasitemia) apresentaram não apenas

um aumento do tamanho do baço ( $0,65\pm 0,08$  vs.  $0,154\pm 0,05$  g), como também do número de células totais ( $3,8\pm 0,2\times 10^8$  vs.  $1,8\pm 0,1\times 10^8$  células/baço). Resultado semelhante foi observado no dia 16 pós-infecção (crônico) (tamanho do baço  $0,42\pm 0,06$  vs.  $0,154\pm 0,05$  g e número de células  $2,4\pm 0,2\times 10^8$  vs.  $1,8\pm 0,1\times 10^8$  células/baço). No dia 22 pós-infecção (agudo, segundo pico de parasitemia) houve um aumento bastante acentuado do tamanho do baço ( $1,42\pm 0,3$  vs.  $0,154\pm 0,05$  g) e do número de células ( $7,02\pm 2\times 10^8$  vs.  $1,8\pm 0,1\times 10^8$  células/baço). No dia 50 pós-infecção (crônico) (tamanho do baço  $0,75\pm 0,3$  vs.  $0,154\pm 0,05$  g e número de células  $4,04\pm 1\times 10^8$  vs.  $1,8\pm 0,1\times 10^8$  células/baço) houve diminuição significativa em relação ao dia do segundo pico (**Figuras 31A, B e C**).

Estes resultados assinalam a existência de alterações significativas no peso e no número de células totais do baço, as quais, por sua vez, poderiam modificar o *status* imunológico deste importante órgão durante a patofisiologia da malária placentária (MiP). Assim, o passo seguinte compreendeu a avaliação de subpopulações de DCs durante a infecção e na ausência de gravidez. Nos resultados obtidos, pode-se observar que houve um aumento significativo no número absoluto de pDCs (CD11c+CD11b-B220+) no baço nos dias 22 e 50 pós-infecção ( $11,8\pm 1\times 10^6$  vs.  $1,4\pm 0,4\times 10^6$  células; e  $6,2\pm 4\times 10^6$  vs.  $1,4\pm 0,4\times 10^6$  células), fato que pode ser explicado pelo aumento do número de células totais esplênicas, devido à constante presença do parasito, sem diferenças na frequência destas subpopulações em relação ao controle.

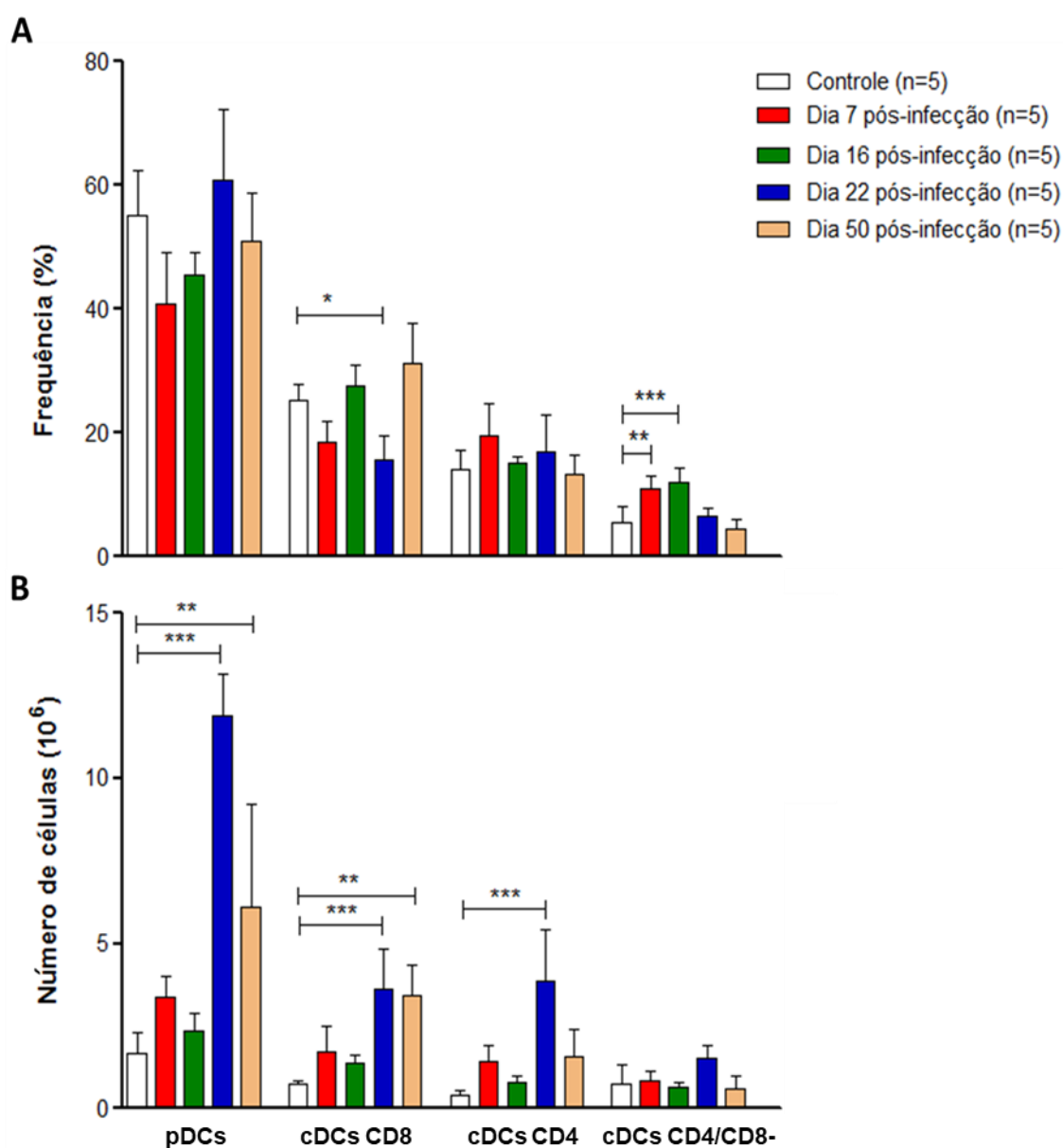
Para as cDCs CD8 (CD11c+CD11b-B220-CD8+), nos dias 22 e 50, foi observado um aumento significativo do número de células ( $4,1\pm 0,03\times 10^6$  vs.  $0,6\pm 0,02\times 10^6$  células; e  $4,04\pm 0,5\times 10^6$  vs.  $0,6\pm 0,02\times 10^6$  células), bem como uma diminuição significativa de 27,27% da frequência das cDCs CD11b-CD8+ no dia 22 pós-infecção. Enquanto que nas cDCs CD4 (CD11c+CD11b+B220-CD4+) foi identificado um aumento significativo de onze vezes em relação ao controle. As cDCs CD4/CD8 duplo negativas (CD11c+CD11b+B220-CD4-CD8-) apresentaram um aumento na frequência no dia 7 ( $10,9\pm 1,3$  vs.  $5,5\pm 1,7$  %) e no dia 16 ( $12,6\pm 1,4$  vs.  $5,5\pm 1,7$  %) (**Figura 32A e 32B**). Os dados apresentados evidenciaram um expressivo efeito da infecção na modulação de número absoluto e frequência de algumas subpopulações de DCs esplênicas.

**Figura 31** - Peso e número de células do baço de camundongos BALB/c na fase aguda e crônica da infecção



Animais BALB/c foram infectados i.p. com 104 E.P. de *P. berghei*, sendo o dia de infecção considerado D0. O tratamento com cloroquina (0,7mg/dia/animal) foi feito durante 3 dias a partir do D7. (A) Peso e (B) número de células totais de baços de camundongos BALB/c infectados com *P. berghei* ANKA GFP. (C) gráfico da parasitemia indicando as datas e o comportamento do parasito pós-infecção nos diferentes grupos utilizados. Dados representativos de um único experimento expresso com média  $\pm$  DP. Para a análise foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

**Figura 32** - Subpopulações de DCs do baço de camundongos BALB/c na fase aguda e crônica da infecção



Animais BALB/c foram infectados i.p. com 104 E.P. de *P. berghei*, sendo o dia de infecção considerado D0. O tratamento com cloroquina (0,7mg/dia/animal) foi feito durante 3 dias a partir do D7. Comparação da (A) frequência e (B) do número absoluto das diferentes subpopulações de DCs presentes no baço para os diferentes grupos experimentais. Dados representativos de um único experimento expresso com média  $\pm$  DP. Para a análise foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.10 Perfil de ativação das diferentes subpopulações de DCs na fase aguda e crônica da infecção

Após caracterizar a frequência das subpopulações de DCs do baço, avaliou-se o perfil de ativação das diferentes subpopulações de DCs. Assim, foi observado que as pDCs após 7 dias pós-infecção apresentaram um aumento significativo na expressão de moléculas de



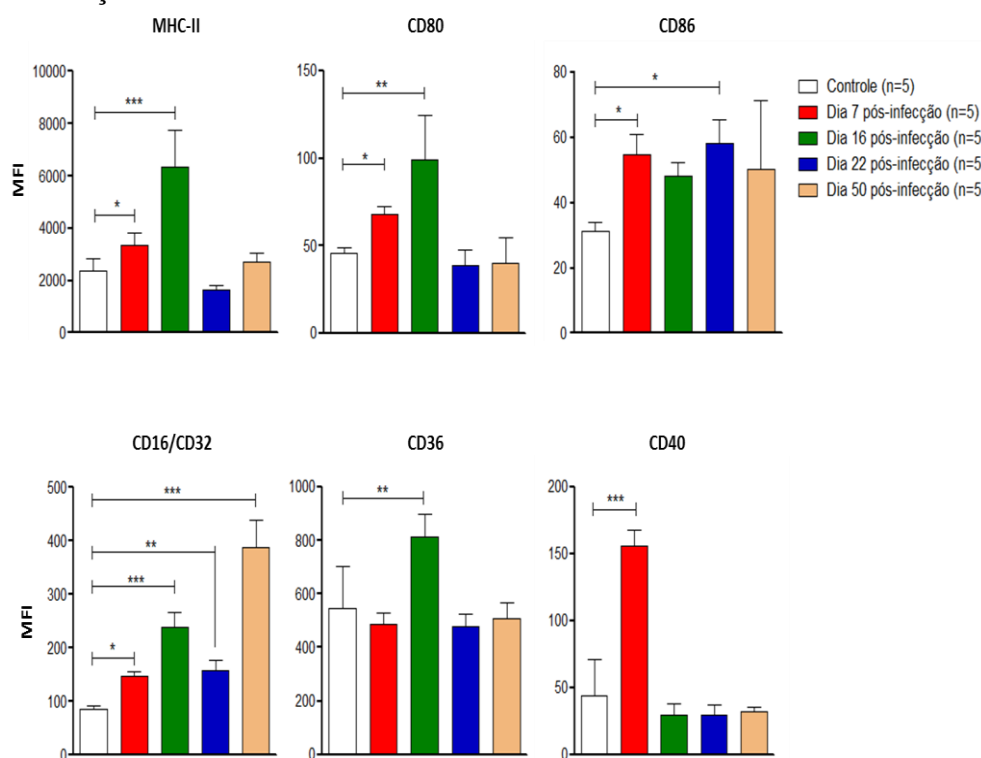
MCH-II (MFI 3842 vs. 2115), CD80 (MFI 65 vs. 47), CD86 (MFI 58 vs. 32), CD16/CD32 (MFI 152 vs. 96) e CD40 (153 vs. 47), mostrando um perfil de ativação compatível com modelo de infecção por plasmódio. No dia 16 foi também evidenciado um aumento significativo na expressão de MCH-II (MFI 6000 vs. 2115), CD80 (MFI 101 vs. 47), CD86 (MFI 51 vs. 32), CD16/CD32 (MFI 248 vs. 96), possivelmente devido ao tempo que as DCs levam para apresentarem antígenos para os linfócitos (**Figura 33**). Nos dias 22 e 50 só foi evidenciado um aumento significativo na expressão de CD16/CD32. Além disto, nos dias 22 (agudo) e 50 (crônico) foi evidenciado um perfil similar ao controle não infectado (**Figura 33**), o que pode demonstrar um aumento da tolerância da pDCs em virtude da constante exposição desta célula ao parasito.

As cDCs CD8 do baço apresentaram um aumento na expressão de moléculas de MCH-II (MFI 4050 vs. 3200), CD80 (MFI 140 vs. 42), CD86 (MFI 25 vs. 99), CD16/CD32 (MFI 498 vs. 49), e CD40 (MFI 1,5 vs. 32) e CD36 (MFI 750 vs. 420) no dia 7 pós-infecção, o que é esperado para um quadro agudo de infecção. No dia 22 pós-infecção, observou-se uma diminuição significativa (MFI 1.200 vs. 3.200) na expressão de MCH-II. Ao mesmo tempo, as moléculas de CD80 e CD86 mantiveram um perfil similar ao controle. Interessantemente, foi visto um aumento de na expressão de moléculas de CD16/CD32 e CD36 nos dias 16 e 50 pós-infecção, o que pode indicar que estas cDCs CD8 têm a capacidade de fagocitar, mas sem o aumento de seus marcadores de ativação. No dia 50 pós-infecção, os marcadores de ativação mantiveram um perfil similar ao controle não infectado, embora tenha sido identificado um aumento de CD36 (MFI 786 vs. 420) e CD16/CD32 (MFI 1650 vs. 49) (**Figura 34**).

As cDCs CD4 apresentaram um aumento significativo do perfil de ativação, no dia 7 pós-infecção, na expressão de moléculas de MCH-II (MFI 4850 vs. 4210), CD80 (MFI 51 vs. 24), CD86 (MFI 35 vs. 11), CD16/CD32 (MFI 1010 vs. 530), e CD40 (MFI 82 vs. 11), e uma diminuição significativa na expressão de moléculas de CD36 (MFI 830 vs. 1305). Para o dia 16 pós-infecção, foi identificado um aumento significativo do perfil de ativação em função da expressão de moléculas de MCH-II, CD80 e CD86, mas não para o CD40. A expressão de moléculas de CD36 apresentou uma diminuição significativa (MFI 380 vs. 1305). Já no dia 22 pós-infecção foi evidenciada uma diminuição significativa de MHC-II (MFI 1820 vs. 4210) e CD36 (MFI 760 vs. 1305) com um aumento de CD16/CD36 (MFI 1260 vs. 530). No dia 50 pós-infecção, CD16/CD36 mostrou um aumento significativo (MFI 1780 vs. 530) e CD36 manteve uma expressão menor do que o controle e similar aos dias 7, 16 e 22 (**Figura 35**), sendo, provavelmente, reflexo de uma perda da capacidade de fagocitose mediada pelo CD36, em função do constante estímulo do parasito.

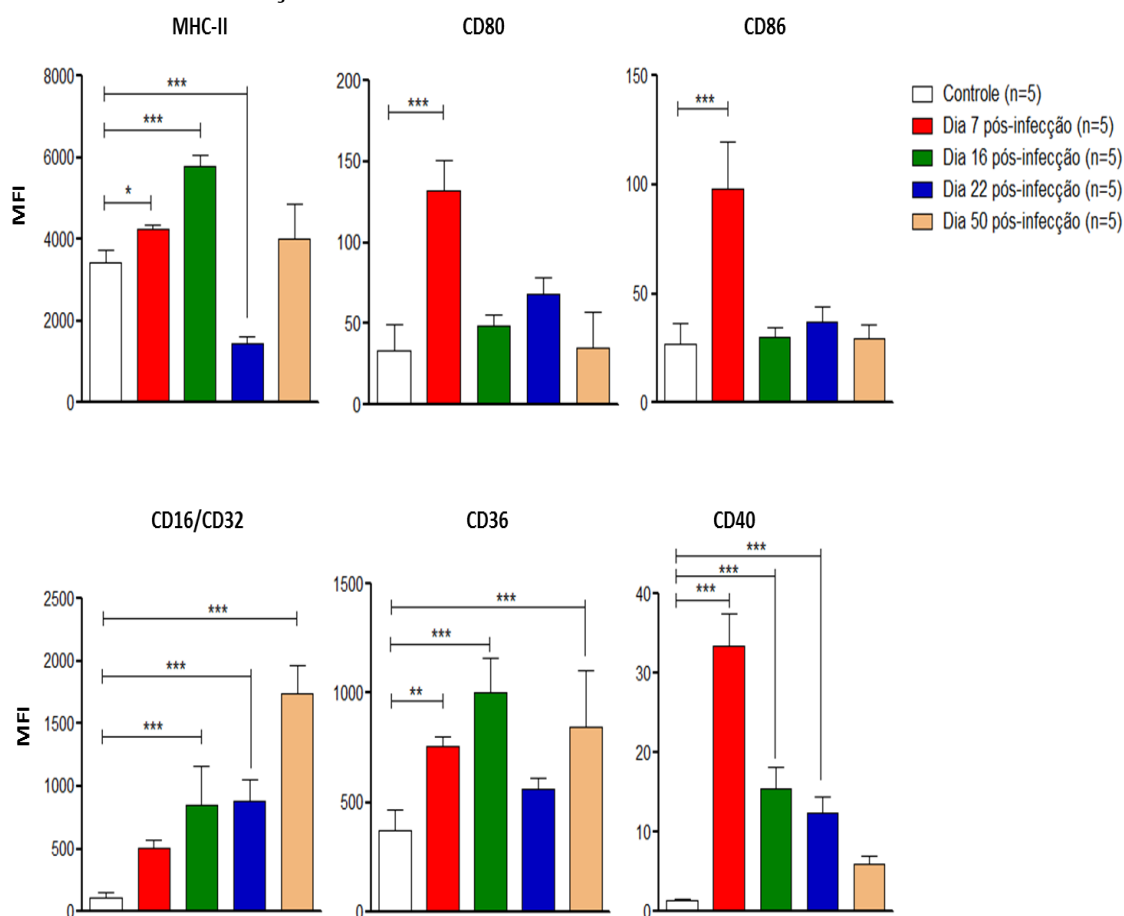
Na **Figura 36**, nota-se que as cDCs CD4/CD8 duplo negativa apresentaram, no dia 7 pós-infecção, um aumento significativo na expressão de moléculas de MCH-II (MFI 5850 vs. 3810), CD80 (MFI 5830 vs. 2840), CD86 (MFI 390 vs. 270), e CD40 (MFI 820 vs. 480). Semelhante ao dia 7, no dia 16 pós-infecção, estas DCs mantiveram um aumento significativo na expressão de moléculas de MCH-II (MFI 5050 vs. 3810), CD80 (MFI 4810 vs. 2840), CD86 (MFI 320 vs. 270). Interessantemente, no dia 22 a expressão de moléculas de MCH-II (MFI 1320 vs. 3810), CD80 (MFI 1030 vs. 2840) e CD36 (MFI 810 vs. 1880) apresentaram uma diminuição significativa em relação do controle não infectado, mostrando um possível efeito da infecção na ativação desta subpopulação, entretanto, com pouca importância na expressão de CD36 para este grupo de DCs.

**Figura 33** - Perfis de ativação das pDCs de baço de camundongos BALB/C na fase aguda e crônica da infecção



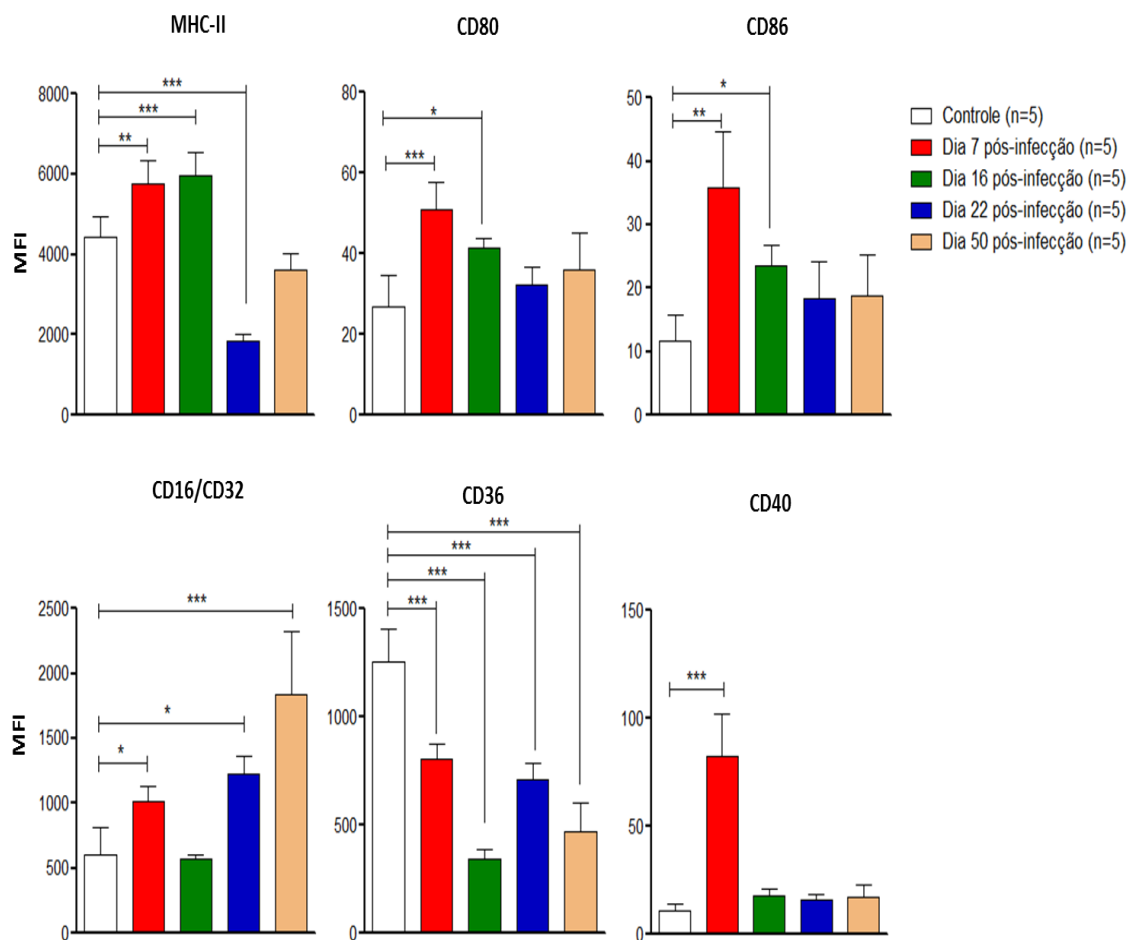
Animais BALB/c foram infectados i.p. com 104 E.P. de *P. berghei*, sendo o dia de infecção considerado D0. O tratamento com cloroquina (0,7mg/dia/animal) foi feito durante 3 dias a partir do D7. Média de fluorescência para os marcadores de ativação MHC-II, CD80, CD86, CD16/CD32, CD36 e CD40 das pDCs do baço para os dias 7 (agudo não tratado), 16 (crônico tratado), 22 (agudo) e 50 (crônico) pós-infecção com *P. berghei* ANKAGFP. Dados representativos de um único experimento expresso com média  $\pm$  DP. Para a análise foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

**Figura 34** - Perfis de ativação das cDCs CD8 do baço de camundongos BALB/C na fase aguda e crônica da infecção



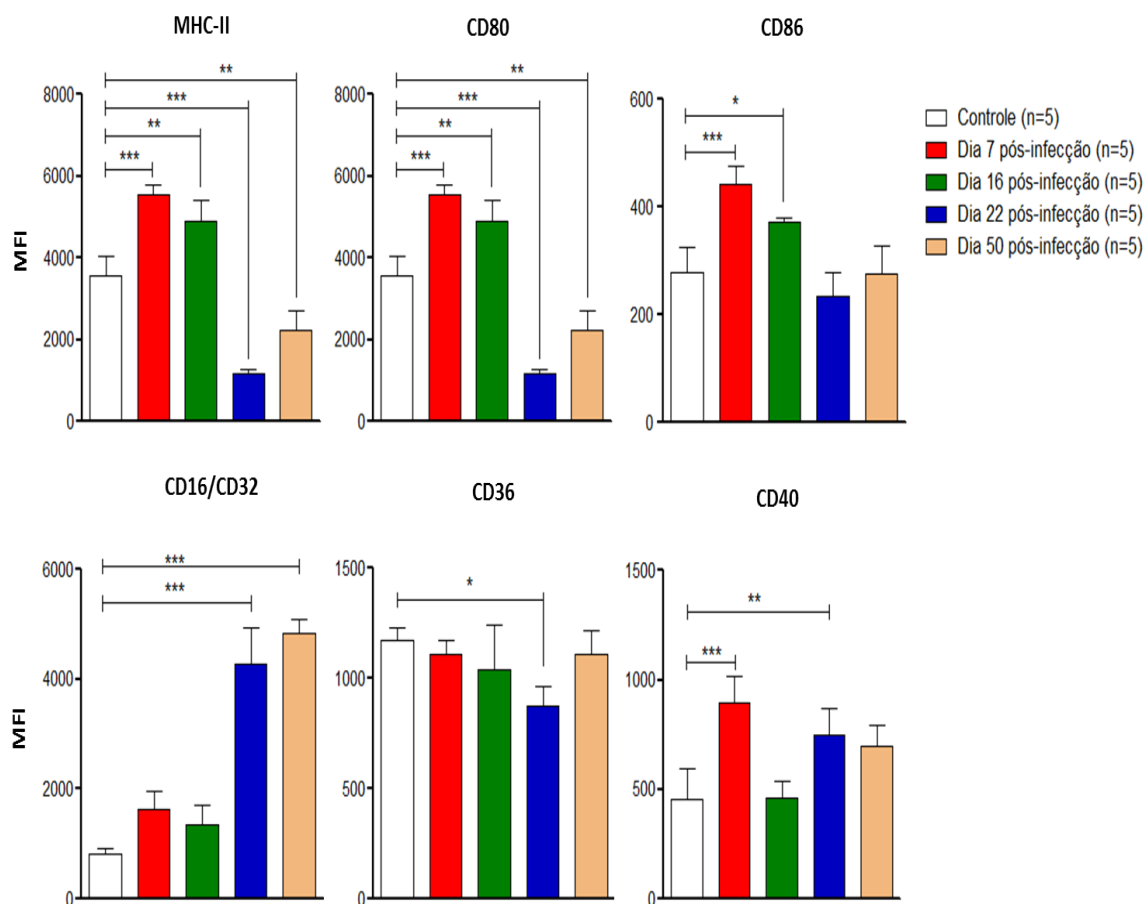
Animais BALB/c foram infectados i.p. com  $10^4$  E.P. de *P. berghei*, sendo o dia de infecção considerado D0. O tratamento com cloroquina (0,7mg/dia/animal) foi feito durante 3 dias a partir do D7. Média de fluorescência para os marcadores de ativação MHC-II, CD80, CD86, CD16/CD32, CD36 e CD40 das cDCs CD8 do baço nos dias 7 (agudo não tratado), 16 (crônico tratado), 22 (agudo) e 50 (crônico) pós-infecção com *P. berghei* ANKA GFP. Dados representativos de um único experimento expresso com média  $\pm$  DP. Para a análise foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

**Figura 35** - Perfis de ativação das cDCs CD4 do baço de camundongos BALB/C na fase aguda e crônica da infecção



Animais BALB/c foram infectados i.p. com 104 E.P. de *P. berghei*, sendo o dia de infecção considerado D0. O tratamento com cloroquina (0,7mg/dia/animal) foi feito durante 3 dias a partir do D7. Média de fluorescência para os marcadores de ativação MHC-II, CD80, CD86, CD16/CD32, CD36 e CD40 das cDCs CD11b+CD4+ do baço para os dias 7 (agudo não tratado), 16 (crônico tratado), 22 (agudo) e 50 (crônico) pós-infecção com *P. berghei* ANKA GFP. Dados representativos de um único experimento expresso com média  $\pm$  DP. Para a análise estatística, utilizou-se o teste t de student. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ .

**Figura 36** - Perfis de ativação das cDCs CD4/CD8 duplo negativas do baço de camundongos BALB/C na fase aguda e crônica da infecção



Animais BALB/c foram infectados i.p. com  $10^4$  E.P. de *P. berghei*, sendo o dia de infecção considerado D0. O tratamento com cloroquina (0,7mg/dia/animal) foi feito durante 3 dias a partir do D7. Média de fluorescência para os marcadores de ativação MHC-II, CD80, CD86, CD16/CD32, CD36 e CD40 das cDCs CD4/CD8 duplo negativa do baço para os dias 7 (agudo não tratado), 16 (crônico tratado), 22 (agudo) e 50 (crônico) pós-infecção com *P. berghei* ANKA GFP. Dados representativos de um único experimento expresso com média  $\pm$  DP. Para a análise estatística, utilizou-se o teste t de student. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,005.

#### 4.11 Análise das subpopulações de DCs do baço durante a gestação

Com o propósito de saber se a prenhez, por si só, tem a capacidade de modular algumas das subpopulações celulares presentes no baço na ausência de infecção, avaliamos inicialmente o peso e o número total de esplenócitos em fêmeas prenhes e não prenhes.

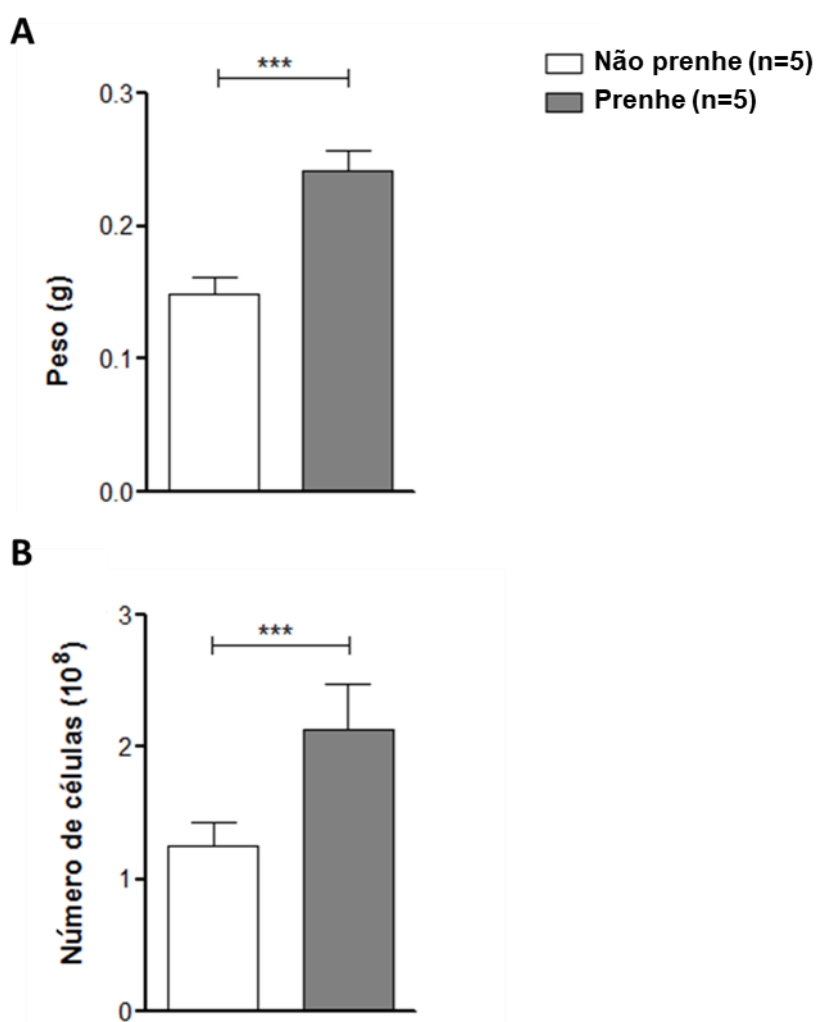
Foi observado um significativo aumento tanto para o peso do baço (mais de 0,6 vezes com relação ao controle não grávido), quanto para o número de esplenócitos (mais de duas vezes em relação ao controle não prenhes), quando comparados prenhes e não prenhes, (Figura 37).

São múltiplas as variáveis que podem explicar este fenômeno, como, por exemplo, os hormônios esteroides induzidos durante a gestação, os quais apresentam um efeito expressivo na resposta imune, modulando a atividade das células apresentadoras de antígenos, tanto da

linhagem mieloide como linfoide, com relação direta sobre as respostas imunológicas daí decorrentes.

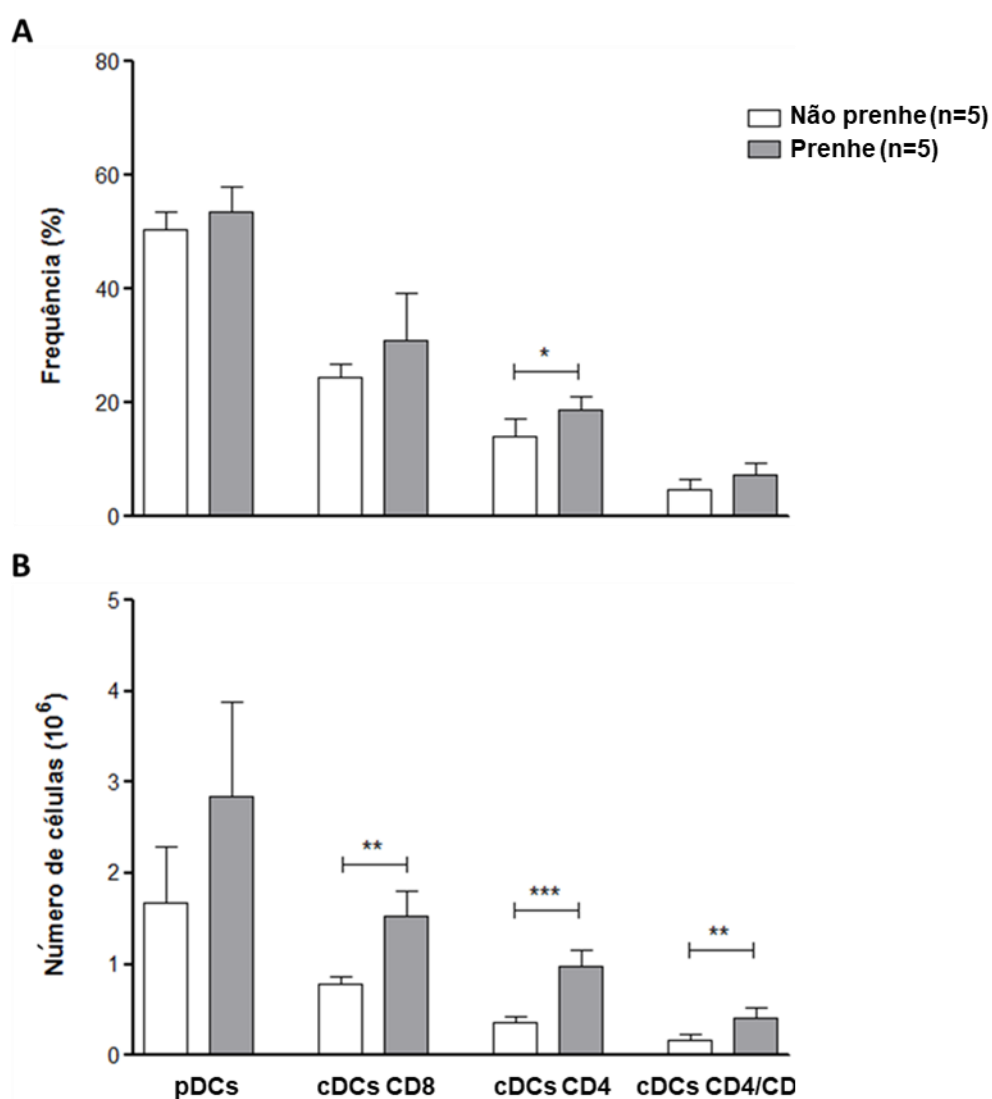
Assim, em relação às subpopulações de DCs nos prenhes, verifica-se um aumento das populações das cDCs CD8, cDCs CD4 e cDCs CD4/CD8 duplas negativas (**Figura 38**). Estas modificações nas diferentes subpopulações de DCs pode resultar na migração destas do sangue periférico ao baço, o que pode estar relacionado ao seu papel na manutenção da tolerância à presença do embrião (58).

**Figura 37** - Peso e número de células de baço de camundongos BALB/c prenhes na ausência de infecção



(A) Peso e (B) número de células de baços de camundongos BALB/c prenhes e não prenhes na ausência de infecção. Dados representativos de três experimentos independentes expressos com média  $\pm$  DP. Para a análise estatística, utilizou-se o teste t de Student. \*\*\* $p < 0,001$ .

**Figura 38** - Subpopulações de DCs de baço de camundongos BALB/c prenhes na ausência de infecção



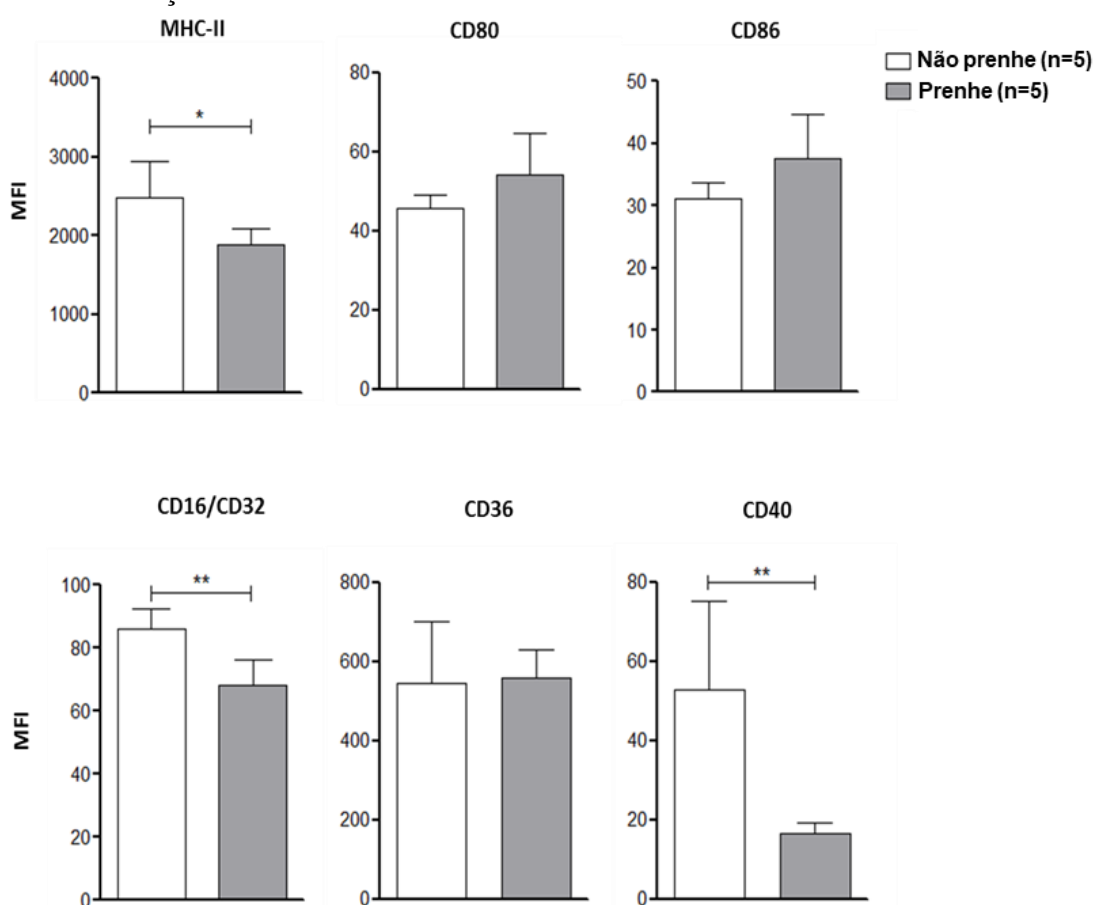
Comparação da (A) frequência e (B) o número absoluto das diferentes subpopulações de DCs presentes no baço de camundongos prenhes e não prenhes sem infecção. Dados representativos de um único experimento expresso com média  $\pm$  DP. Para a análise estatística, utilizou-se o teste t de Student. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ .

#### 4.12 Perfil de ativação das diferentes subpopulações de DCs no baço das prenhes

Ao analisarmos o perfil de ativação das pDCs no baço de prenhes (**Figura 39**) observa-se uma diminuição significativa na expressão de moléculas de MCH-II (MIF 1940 vs. 2255), CD16/CD32 (MIF 67 vs. 84) e CD40 (MIF 18 vs. 53) em relação ao controle não prenhe. Isto pode evidenciar que o efeito imunoregulador na prenhez não é muito intenso para esta subpopulação de células. Para as cDCs CD8 (**Figura 40**), foi encontrada uma diminuição significativa na expressão de moléculas de MHC-II, CD80, CD86, CD16/CD32 e CD36.

As cDCs CD4 (**Figura 41**) apresentaram uma diminuição significativa somente na expressão de moléculas de MHC-II e CD16/CD32. Enquanto a expressão de moléculas CD80 e CD86 mantiveram o perfil similar ao controle não prenhe. Por último, após a avaliação da subpopulação esplênica de cDCs CD4/CD8 duplo negativa, não foram encontradas diferenças significativas em relação ao controle na expressão de CD36 (**Figura 42**). Isso demonstra a acentuada modulação da prenhez na capacidade de ativação e na expressão de marcadores de fagocitose por parte das pDCs, cDCs CD8 e cDCs CD4.

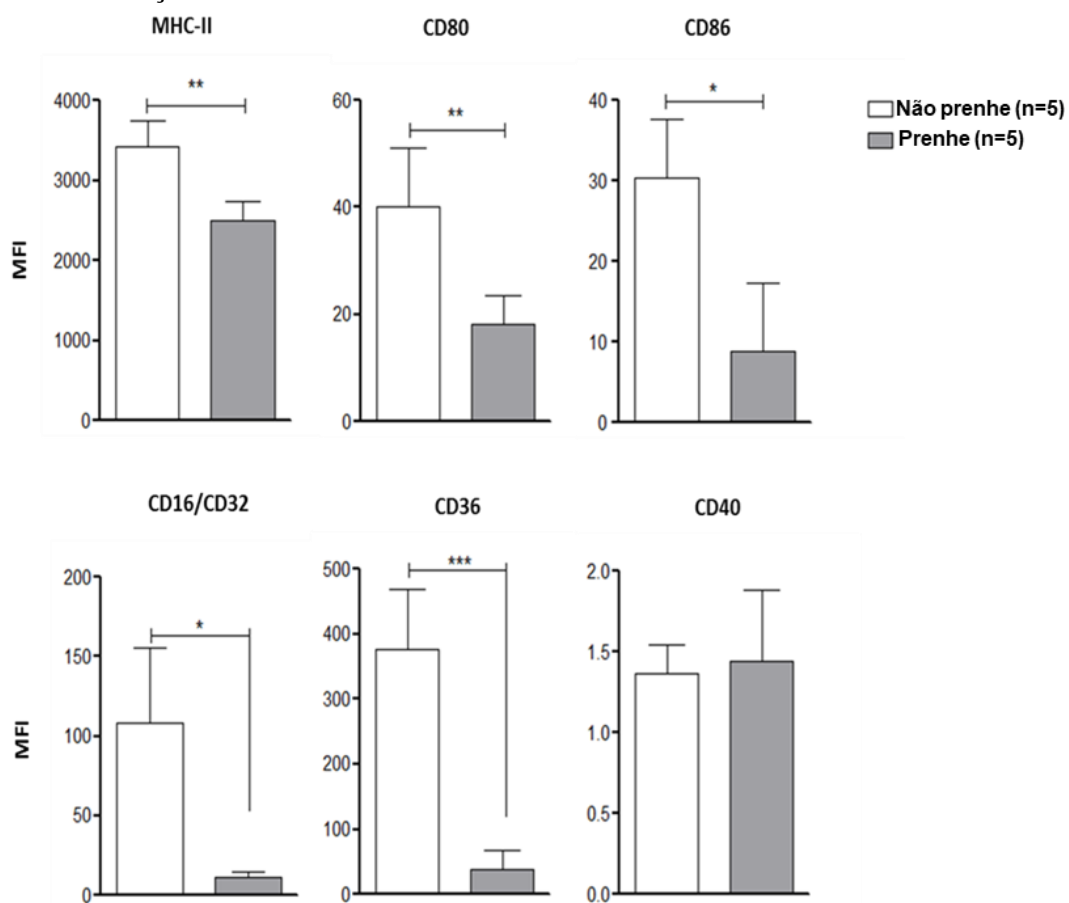
**Figura 39** - Perfis de ativação das pDCs do baço de camundongos BALB/c prenhes na ausência de infecção.



Média de fluorescência para os marcadores de ativação MHC-II, CD80, CD86, CD16/CD32, CD36 e CD40 das pDCs do baço de camundongos prenhes e não prenhes sem infecção. Dados representativos de um único experimento expresso com média  $\pm$  DP. Para a análise estatística, utilizou-se o teste t de Student. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

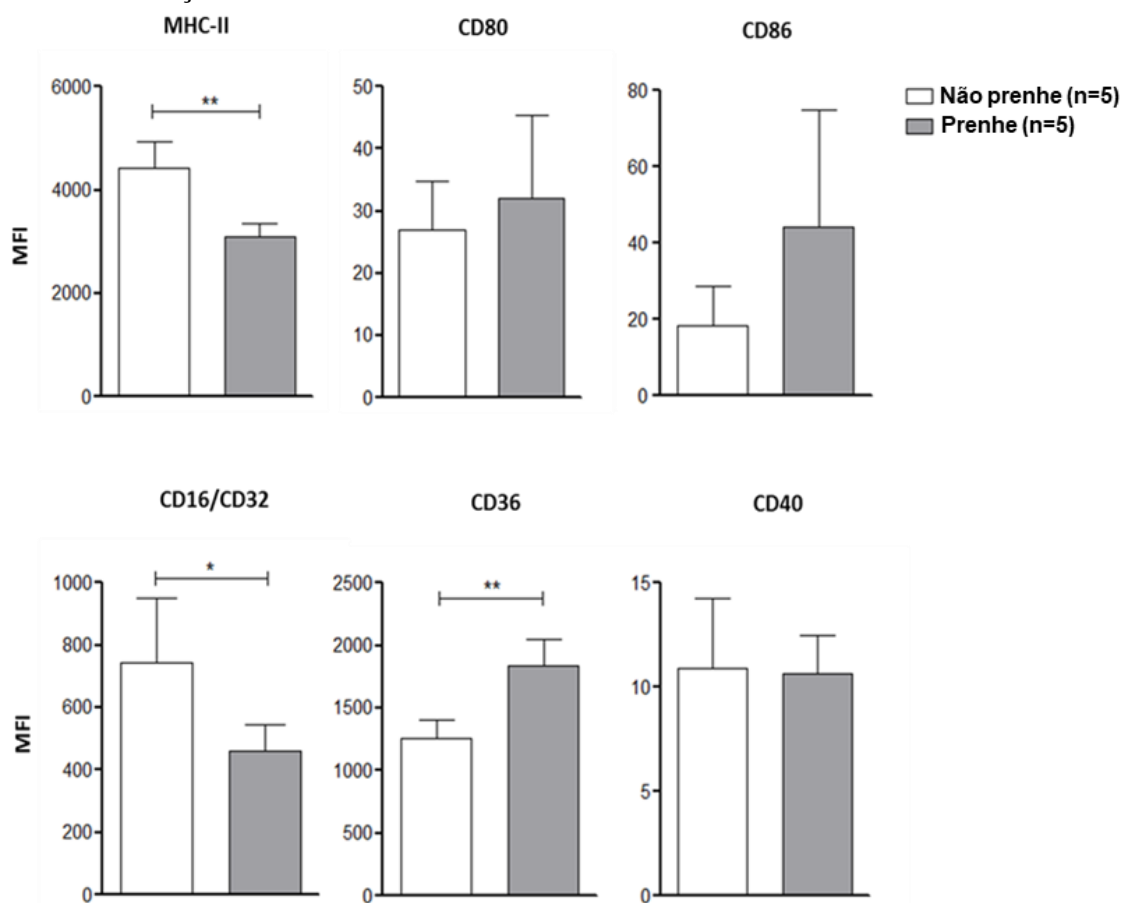


**Figura 40** - Perfis de ativação das cDCs CD8 do baço de camundongos BALB/c prenhes na ausência de infecção



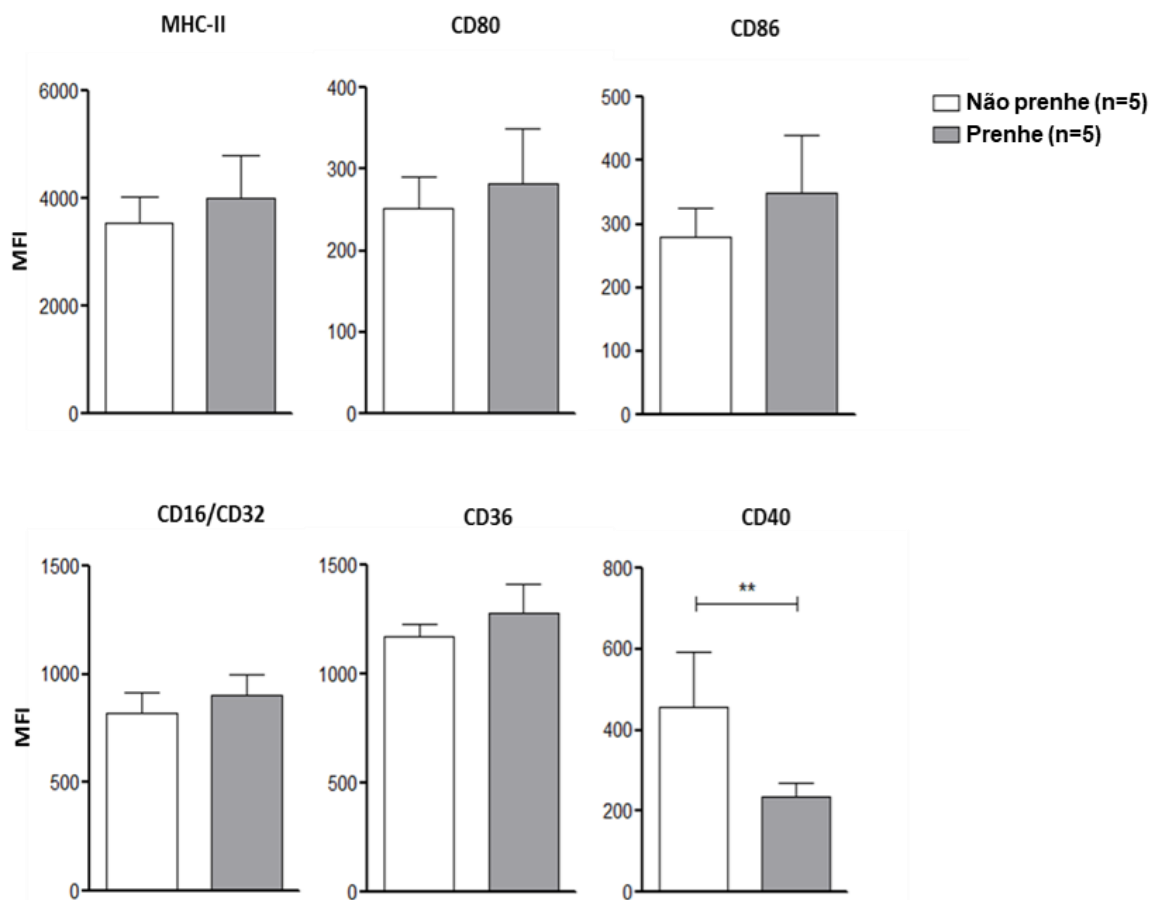
Média de fluorescência para os marcadores de ativação MHC-II, CD80, CD86, CD16/CD32, CD36 e CD40 das cDCs CD8 do baço de camundongos prenhes e não prenhes sem infecção. Dados representativos de um único experimento expresso com média  $\pm$  DP. Para a análise estatística, utilizou-se o teste t de Student. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .

**Figura 41** - Perfis de ativação das cDCs CD4 do baço de camundongos BALB/c prenhes na ausência de infecção



Média de fluorescência para os marcadores de ativação MHC-II, CD80, CD86, CD16/CD32, CD36 e CD40 das cDCs CD4 do baço de camundongos prenhes e não prenhes sem infecção. Dados representativos de um único experimento expresso com média  $\pm$  DP. Para a análise estatística, utilizou-se o teste t de Student. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

**Figura 42** - Perfis de ativação das cDCs CD4/CD8 duplo negativa do baço de camundongos BALB/c prenhes na ausência de infecção



Média de fluorescência para os marcadores de ativação MHC-II, CD80, CD86, CD16/CD32, CD36 e CD40 das cDCs CD4/CD8 duplo negativa do baço de camundongos prenhes e não prenhes sem infecção. Dados representativos de um único experimento expresso com média  $\pm$  DP. Para a análise estatística, utilizou-se o teste t de Student. \*\* $p < 0,01$ .

#### 4.13 A malária na gravidez favorece o aumento da parasitemia, o dano placentário e a redução do peso do feto

As características imunológicas que envolvem a gravidez tornam as mulheres mais suscetíveis a múltiplas infecções, incluindo a infecção por *Plasmodium*. Isto pode ser devido à regulação imunológica materna, que protege o feto contra a ação do sistema imunológico, como foi demonstrado nas **Figuras 37, 38, 39, 40 e 42**, onde observou-se nas DCs uma redução do perfil de ativação, associado a uma diminuição na expressão de moléculas de MHC-II, e também de marcadores de fagocitose, como CD36 e CD16/CD32.

Por conseguinte, esses achados podem ser interpretados como as possíveis causas de falha na eficiência do *clearance* do parasito, evidenciado pelo aumento exacerbado da parasitemia no período da prenhez (**Figura 43A**). Para avaliar o efeito da infecção no curso da gestação e os efeitos na fagocitose, utilizou-se um protocolo experimental, no qual os

camundongos BALB/c foram infectados no 13º dia da prenhez (G13) (146) e, posteriormente, sofreram eutanásia no 19º dia de prenhez (G19) para a coleta de amostras.

As parasitemias, o peso do baço e dos fetos e o espaço vascular placentário foram avaliados. Em relação à parasitemia, observou-se um aumento de mais de três vezes o número de parasitos circulantes nos camundongos prenhes infectados em relação aos camundongos não prenhes infectados (**Figura 43A**). Esta diferença foi significativa após o 4º dia pós-infecção, evidenciando uma menor eficiência da prenhe no controle da parasitemia.

Em relação ao peso do baço, camundongos prenhes infectados mostraram um aumento significativo de duas vezes no peso em comparação aos camundongos prenhes não infectados. Entretanto, curiosamente, os camundongos prenhes infectados apresentaram uma redução significativa de 1,8 vezes no peso do baço em comparação com camundongos não prenhes infectados (**Figura 43B**), mostrando um efeito evidente da prenhez na modulação da resposta imune.

Além disso, foi também identificada uma redução significativa no peso dos fetos dos camundongos prenhes infectados em comparação com camundongos prenhes não infectados ( $0,81 \pm 0,08$  vs.  $1,10 \pm 0,08$  g) (**Figura 43C**), confirmando que a infecção exerce um efeito decisivo no desenvolvimento fetal. Esses resultados corroboram com o observado nas gestantes que vivem nas áreas endêmicas para malária, em que a infecção durante a gestação pode gerar recém-nascidos com baixo peso (158).

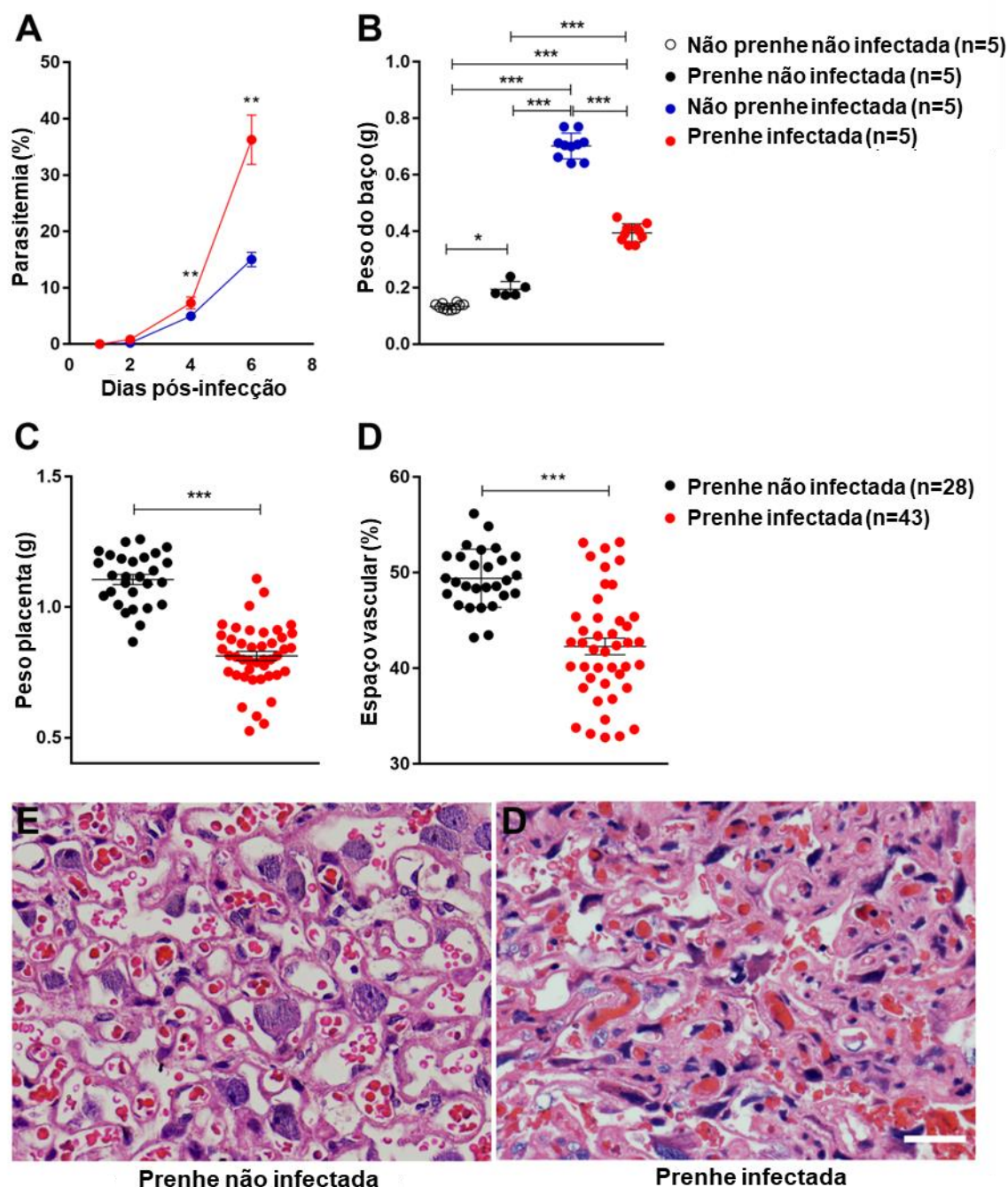
Da mesma forma, ao avaliarmos o espaço vascular da placenta dos camundongos prenhes infectados, observou-se uma redução significativa de 7% em comparação com as placentas dos camundongos prenhes não infectados (**Figura 43D**). Este dado indica que a redução do espaço vascular placentário, com consequente redução da circulação sanguínea na placenta das prenhes infectadas, pode contribuir para o fenótipo de baixo peso ao nascer.

Posteriormente, para verificar o perfil inflamatório e comprovar que o modelo funcionava de acordo com o descrito na bibliografia (146), as concentrações de citocina no soro foram analisadas nos diferentes grupos, no modelo de infecção no dia G13. Camundongos prenhes infectados apresentaram um aumento significativo na expressão de algumas citocinas em relação aos não prenhes não infectados, como: INF- $\gamma$  ( $118,3$  pg/mL vs.  $3,2$  pg/mL), TNF- $\alpha$  ( $53$  pg/mL vs.  $8$  pg/mL), MCP-1 ( $258,4$  pg/mL vs.  $32$  pg/mL), IL-6 ( $22,2$  pg/mL vs.  $7$  pg/mL) e IL-10 ( $35,2$  pg/mL vs.  $17,2$  pg/mL) (**Figura 44**).

Além disso, foi observado um aumento significativo no perfil pró-inflamatório nos camundongos prenhes infectados em comparação com camundongos não prenhes infectados para INF- $\gamma$  ( $118,3$  pg/mL vs.  $51,4$  pg/mL), MCP-1 ( $258,4$  pg/mL vs.  $121$  pg/mL) e IL-6 ( $22,2$

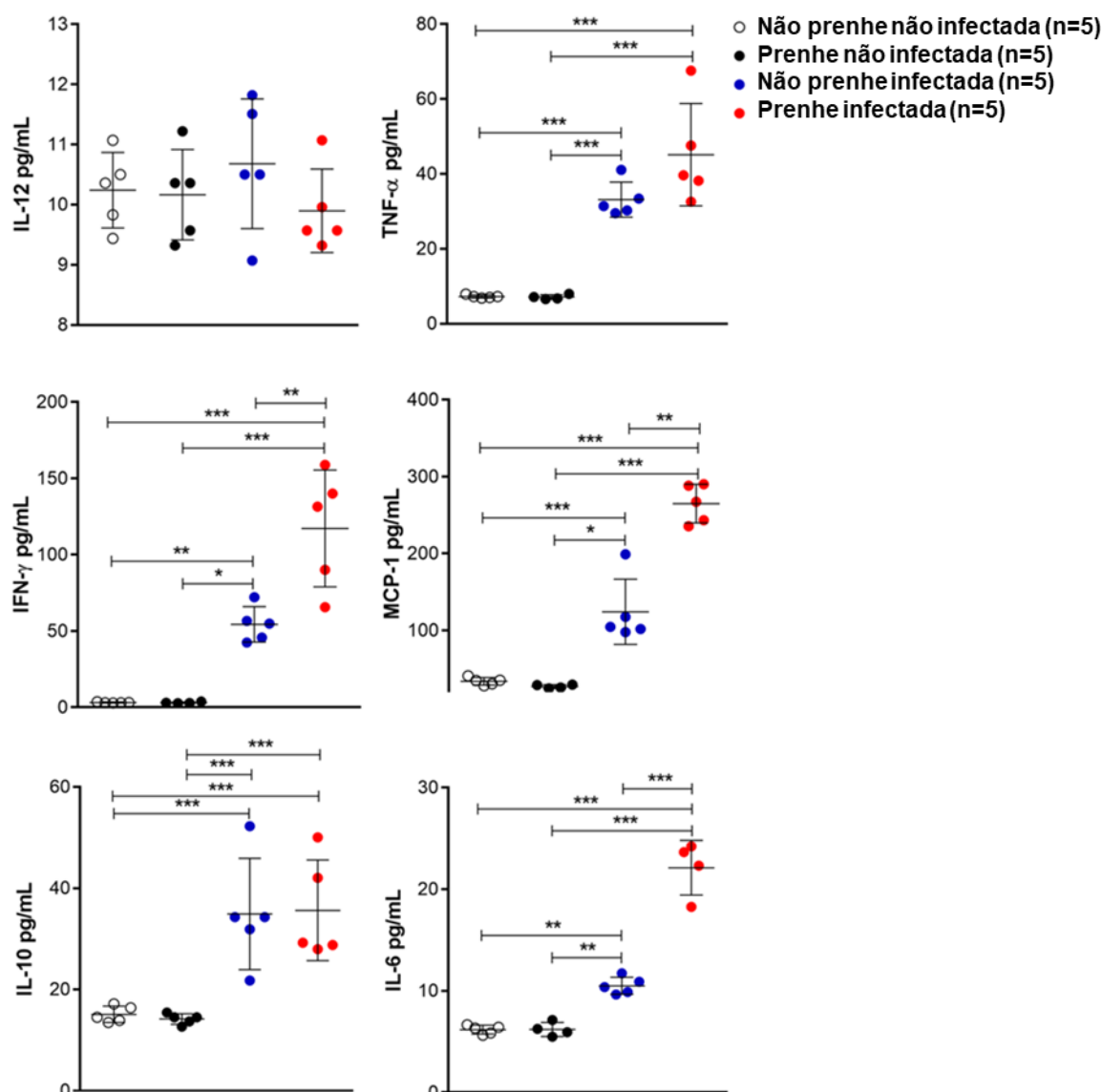
pg/mL vs. 12,4 pg/mL) (**Figura 44**). Estes resultados demonstram a acentuada resposta inflamatória induzida pelo parasito na prenhez, e pode ser um fator de destaque para justificar os efeitos deletérios da malária durante a gestação.

**Figura 43** - Efeito da malária por *P. berghei* nos camundongos prenhes e seus fetos.



Camundongos BALB/c prenhes infectados e não infectados com *P. berghei* utilizando  $10^6$  iRBC (i.v.) no 13º dia da prenhez (G13) e sacrificados no dia G19. (**A**) Parasitemia, (**B**) Peso do baço e (**C**) Peso fetal. (**D**) Análise da redução do espaço vascular em (**E**) placenta de camundongo prenhe não infectado e (**F**) camundongo prenhe infectado. Barra branca representativa a 10  $\mu$ m. Dados representativos de um único experimento expresso com média  $\pm$  DP. Para a análise foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

**Figura 44** - Perfil de citocinas no soro dos camundongos BALB/c prenhes durante a infecção.



Análise das citocinas pró- e anti-inflamatórias:  $\text{INF-}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ , MCP-1, IL-6, IL-10 e IL-12, no soro de camundongos BALB/c não prenhes não infectados, prenhes não infectados, não prenhes infectados e prenhes infectados (i.v.) utilizando  $10^6$  eritrócitos parasitados por *P. berghei* no dia 13 de prenhez (G13) e sacrificados em G19. Dados representativos de um único experimento expresso com média  $\pm$  DP. Para a análise foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.14 A prenhez modula a capacidade da fagocitose das DCs e dos macrófagos

O aumento da parasitemia durante a prenhez em comparação com os camundongos não prenhes (**Figura 43A**) pode estar associado à perda da capacidade da fagocitose das diferentes células envolvidas na resposta imunológica e na depuração do parasito. Assim, as DCs provenientes de prenhes foram avaliadas quanto à capacidade de fagocitose de iRBC em diferentes proporções. Os resultados mostraram uma diminuição significativa na frequência da fagocitose pelas DCs de camundongos prenhes em comparação com as DCs de camundongos não prenhes (**Figura 45A**) expostos a iRBC por *P. berghei* ( $4,1 \pm 0,3$  vs.

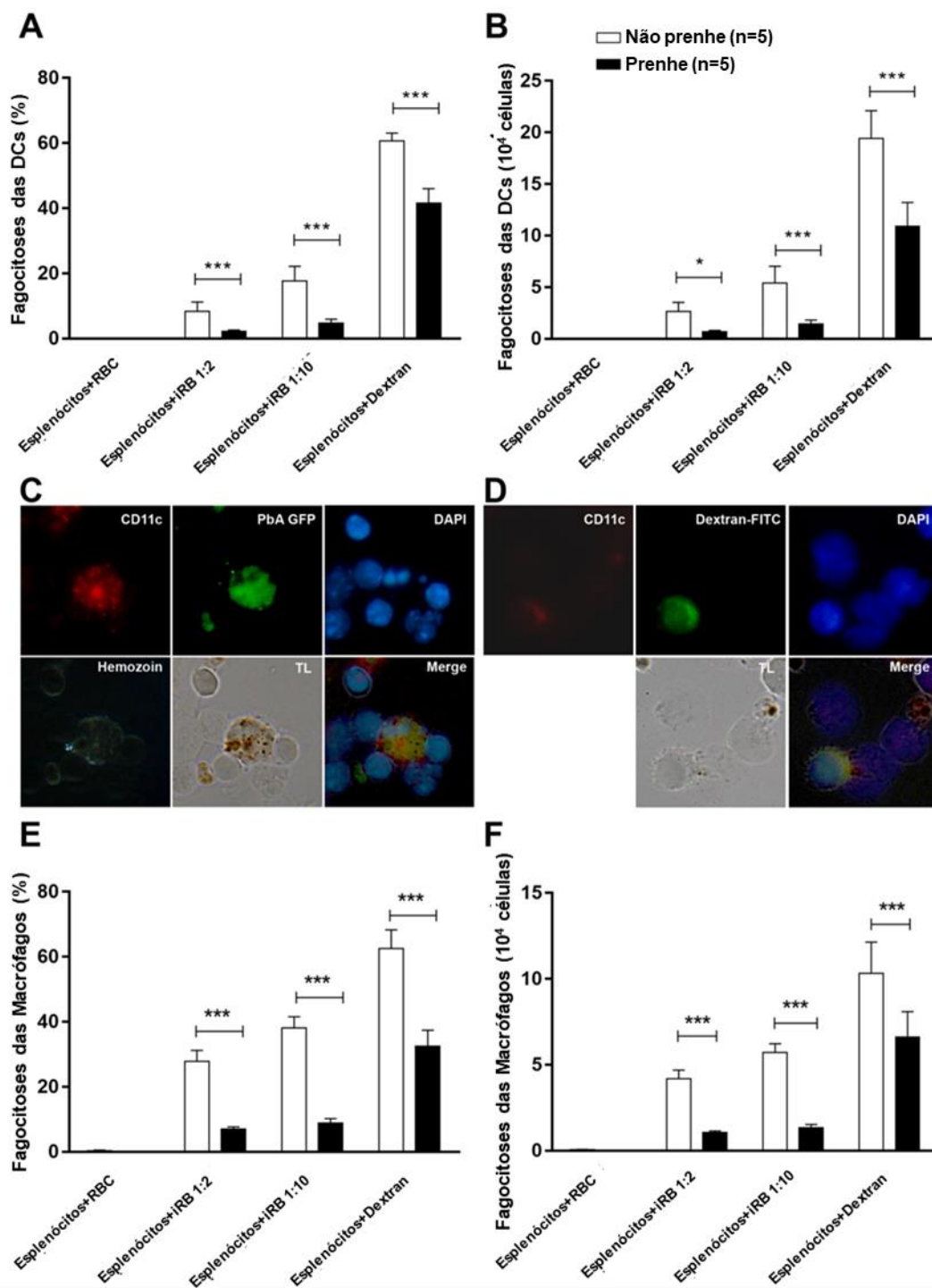
9,48±1,6% para os dados de razão 1:2 esplenócitos:parasitos ou 5,4±0,4 vs. 20,8±1,9 para a razão 1:10 esplenócitos:parasitos).

Como controle do processo de fagocitose, foram utilizadas partículas FITC-Dextran nas mesmas condições experimentais, em que foi mantido idêntico padrão observado quando utilizados eritrócitos parasitados, com diferença de 18,7% entre prenhes e não prenhes (**Figura 45A**). Quando se avaliam os números absolutos de DCs, os resultados se mostraram com o mesmo perfil visto para os números relativos (**Figura 45B**). Em conjunto, os resultados confirmam a existência de uma modulação da capacidade fagocitária das DCs durante a gestação, provavelmente, relacionado a fatores hormonais que afetam a capacidade de fagocitose destas.

Semelhante fenômeno foi evidenciado pela microscopia de fluorescência. Assim, as DCs foram purificadas a partir do baço e cocultivadas durante duas horas na presença de iRBC infectado por *P. berghei* ou partículas de FITC-Dextran. Neste ensaio, as DCs foram marcadas com PE-CD11c e DAPI. As DCs (vermelhas) mostraram ter a capacidade de fagocitar iRBC (verde-GFP) (**Figura 45C**). O ensaio de fagocitose foi também realizado utilizando o FITC-Dextran (verde) (**Figura 45D**) como um controle positivo da fagocitose.

A fim de continuar com o estudo do efeito da prenhez na fagocitose, avaliou-se a capacidade fagocitária dos macrófagos, células importantes para a depuração do parasito pelo baço (159). Assim, os esplenócitos purificados foram cocultivados durante duas horas na presença de *P. berghei* e como controle foram utilizadas partículas de dextran marcadas com FITC. Os resultados mostraram uma diminuição significativa na fagocitose dos eritrócitos parasitados com *P. berghei* por macrófagos F4/80+ provenientes de camundongos prenhes (6,8±0,3 vs. 25,4±1,1% para os dados de razão de 1:2 esplenócitos:parasitos ou 7,2±0,4 vs. 39,2±1,9% para a proporção 1:10 de esplenócitos:parasitos) (**Figura 45E**). Estes dados foram similares utilizando FITC-Dextran e o mesmo padrão foi mantido com diferenças superiores a 27%. O perfil dos resultados foi semelhante entre números relativos e números absolutos de macrófagos (**Figura 45F**).

**Figura 45** - Efeito da prenhez sobre a capacidade de fagocitose das DCs e dos macrófagos.



(A) Frequência, (B) número de células dendríticas positivas para CD11c e GFP utilizando-se eritrócitos parasitados por *P. berghei* (iRBC) e partículas de Dextran marcadas com FITC. (C) Fagocitose nas células dendríticas (CD11c+ vermelho) dos iRBC com *P. berghei* expressando GFP (verde) e com presença de hemozoina. (D) Fagocitose por células dendríticas (CD11c+ vermelho) de partículas de Dextran (FITC verde) de 70.000 kDa. (E) Frequência e (F) número de macrófagos positivos para F4/80, CD11b, Ly-6C e GFP utilizando-se eritrócitos parasitados com *P. berghei* expressando GFP. iRBC: eritrócitos infectados. RBC: glóbulos vermelhos não infectados. Dados representativos de dois experimentos independentes expressos com média  $\pm$  DP. Para a análise foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. \*  $P < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .



#### 4.15 Aumento da parasitemia modula os marcadores de ativação e fagocitose das DCs nos prenhes durante a malária

A imunidade materna tende a favorecer a manutenção da gestação e a modulação imunológica com relação ao feto semiallogênico. As DCs são críticas nesse processo, pois realizam um papel primordial no equilíbrio entre a tolerância e a imunidade específica a um determinado patógeno. Assim, nesse estágio, estudou-se o padrão de ativação das DCs do baço nos camundongos prenhes infectados. Ao analisar os marcadores de ativação: CD80, CD86, MHC-II e CD40 das DCs utilizando o modelo de infecção no dia 13 da gestação, pode ser evidenciada uma redução significativa da expressão de CD80 (MIF  $198\pm 41$  vs  $305\pm 18$ ) e CD86 (MIF  $1112\pm 11$  vs.  $1501\pm 381$ ), em camundongos prenhes infectados comparando-se com camundongos não prenhes infectados (**Figura 46**). Esses resultados indicam o efeito regulador da prenhez na expressão destas duas moléculas coestimulatórias essenciais para a ativação das DCs.

Em camundongos prenhes não infectados, a ativação de DCs mostrou uma diminuição significativa na expressão de moléculas de MCH-II em comparação com camundongos não prenhes não infectados. Simultaneamente, observou-se a tendência de manter a baixa expressão do CD80 (**Figura 46**). Isso poderia indicar que, durante a gestação, as DCs são mais inativas, o que diminuiria sua função na fagocitose, apresentação de antígenos e consequente estimulação do compartimento linfocitário. Esta condição poderia ser uma explicação razoável para o aumento da parasitemia nos camundongos prenhes (**Figura 45A**) ou nas mulheres gestantes.

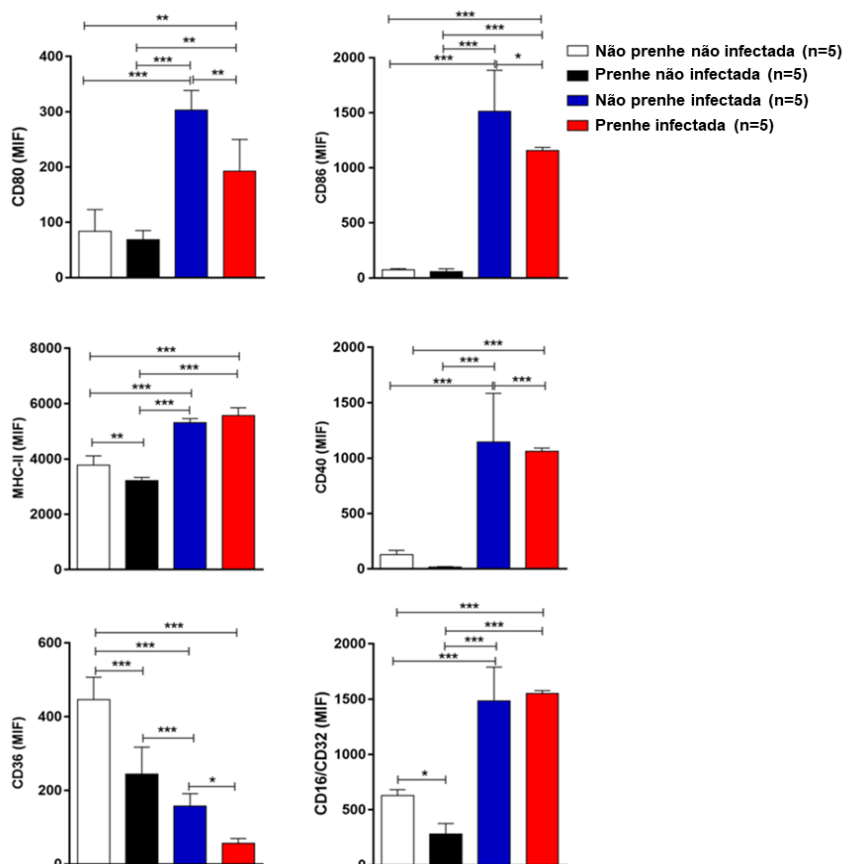
Durante a malária, a eritrofagocitose é aumentada e age para remover os eritrócitos infectados, a fim de controlar a infecção. Vários estudos já observaram a presença desses eritrócitos parasitados nos macrófagos do baço, fígado, medula óssea, e até em monócitos circulantes de pacientes infectados (160). Os receptores CD36 e CD16/CD32, podem exercer uma função importante na depuração de eritrócitos parasitados pelas DCs e pelos macrófagos esplênicos (67,109).

Neste estudo, verificou-se uma redução na expressão da molécula CD36 nos camundongos prenhes não infectados, em comparação com camundongos não prenhes não infectados (MIF  $225\pm 52$  vs.  $432\pm 36,5$ ) (**Figura 46**). Ao mesmo tempo, camundongos infectados não prenhes, também, apresentaram uma diminuição significativa em relação ao grupo dos prenhes não infectados (MIF  $176,2\pm 28,6$ ). Curiosamente, camundongos prenhes infectados tiveram uma redução ainda maior da expressão deste receptor em comparação com

camundongos não prenhes infectados (MIF  $69,4 \pm 12,6$  vs.  $176,2 \pm 28,6$ ) e camundongos prenhes não infectados (MIF  $69,4 \pm 12,6$  vs.  $225 \pm 52$ ) (**Figura 46**). Estes resultados sugerem um possível efeito da gestação no controle da expressão de CD36, o que poderia estar associado a uma diminuição na capacidade de fagocitose dos eritrócitos parasitados.

No caso do receptor CD16/CD32, observa-se uma redução significativa nos camundongos prenhes não infectados em comparação com camundongos não prenhes não infectados (MIF  $620,5 \pm 30$  vs.  $340 \pm 42$ ). (**Figura 46**). O aumento da expressão deste marcador na presença do iRBC em camundongos prenhes infectados e não prenhes infectados indica que o CD16/CD32 poderia ser fortemente estimulado pela presença do parasito. A molécula CD16 tem a função de se ligar aos imunocomplexos, e sua ligação induz funções efetoras, como a fagocitose e a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Esses complexos imunes são comuns nos episódios da malária grave, uma condição associada às frequências mais altas de monócitos CD16+ (67).

**Figura 46** - Marcadores de ativação e de fagocitose nas DCs nos camundongos prenhes com malária.



Expressão dos marcadores: CD80, CD86, MHC-II, CD40, CD36 e CD16/CD32 nos camundongos não prenhes não infectados, prenhes não infectados, não prenhes infectados e prenhes infectados no dia 13 da gestação com  $10^6$  iRBC com *P. berghei* e sacrificados em G19. Dados representativos de um único experimento expresso com média  $\pm$  DP. Para a análise foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.16 O aumento da parasitemia modula os perfis de macrófagos M1 e M2 nos camundongos prenhes durante a malária

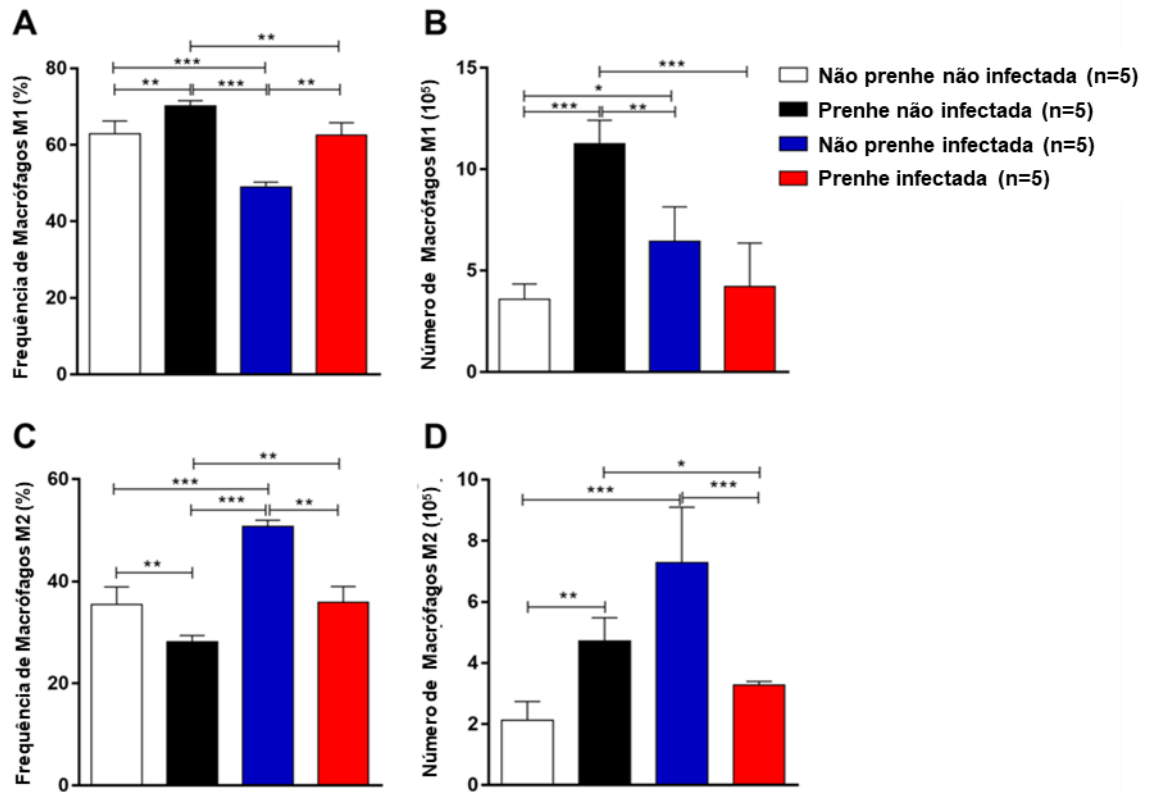
Atualmente, sabe-se que, a depender do microambiente onde estão localizados, os macrófagos vão se diferenciar em dois tipos distintos de células, M1 ou macrófagos classicamente ativados e M2 ou macrófagos ativados alternativamente. Nas infecções em que os PAMPs ativam a resposta Th1, e na presença de IFN- $\gamma$ , predominam as células pró-inflamatórias como macrófagos M1. Num microambiente onde os PAMPs ativam a resposta Th2 e a resposta Th1 é baixa, com a presença de IL-4 e IL-13, por conseguinte pode ser observado um predomínio dos macrófagos M2 os quais estariam induzindo um aumento na resposta anti-inflamatórias e manutenção do perfil Th2 (161).

Assim, considerando que os macrófagos são células essenciais para o controle do parasito durante a malária, foi realizada uma análise das subpopulações dos macrófagos M1 e M2 nos diferentes grupos estudados. Os macrófagos M1 foram caracterizados como aquelas células que possuíam o seguinte perfil: F4/80+Ly-6C+CD11bHigh, com a expressão intracelular de TNF- $\alpha$  e CD69. E os macrófagos M2 apresentaram: F4/80+Ly-6C+CD11bHigh com expressão intracelular de IL-10 e TGF- $\beta$ .

Uma vez comparados os diferentes macrófagos M1 para cada grupo (**Figura 47A e B**), camundongos prenhes não infectados mostraram um aumento significativo na frequência e no número de células M1 em comparação com camundongos não prenhes não infectados ( $71 \pm 0,4$  vs.  $62 \pm 2,4\%$ ,  $11,2 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^5$  vs.  $4,2 \times 10^5 \pm 0,4 \times 10^5$  células) e um aumento em relação aos camundongos infectados não prenhes ( $71 \pm 0,4$  vs.  $46 \pm 0,3\%$ ;  $11,2 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^5$  vs.  $6,5 \times 10^5 \pm 1,8 \times 10^5$  células). Em camundongos prenhes não infectados comparados com camundongos não prenhes infectados, foi observado um aumento na frequência e no número das células entre esses dois grupos ( $71 \pm 0,4$  vs.  $61 \pm 0,5\%$ ;  $11,2 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^5$  vs.  $4,8 \times 10^5 \pm 2,4 \times 10^5$  células), indicando um acúmulo de macrófagos M1, no baço, no momento da gestação.

No caso dos macrófagos M2, camundongos fêmeas prenhes não infectados mostraram uma diminuição significativa na frequência ( $30,4 \pm 0,2$  vs.  $37,5 \pm 0,4\%$ ) (**Figura 47C**), um aumento significativo no número de células ( $4,8 \times 10^5 \pm 0,6 \times 10^5$  vs.  $2,1 \times 10^5 \pm 0,5 \times 10^5$  células) (**Figura 47D**) e uma diminuição significativa em relação às fêmeas não prenhes infectadas ( $30,4 \pm 0,2$  vs.  $50,2 \pm 0,2\%$ ;  $4,8 \times 10^5 \pm 0,6 \times 10^5$  vs.  $7,2 \times 10^5 \pm 1,4 \times 10^5$ ). Isso poderia indicar o recrutamento dos macrófagos M1 para o baço e a manutenção dos macrófagos M2 fora deste órgão, contribuindo, assim, para a modulação do sistema imunológico na gestação.

**Figura 47** - Subpopulações de macrófagos na malária durante a prenhez.



(A) Freqüência e (B) número de macrófagos M1. (C) Freqüência e (D) número de macrófagos M2 nos camundongos não prenhes não infectados, prenhes não infectados, não prenhes infectados e infectados no 13<sup>o</sup> dia de gestação (G13) com  $1 \times 10^6$  iRBC com *P. berghei* e sacrificados em G19. Dados representativos de um único experimento expresso com média  $\pm$  DP. Para a análise foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,005.

## **5 DISCUSSÃO**

O recrudesimento da malária durante gestação é observado frequentemente em mulheres residentes em áreas onde a transmissão da doença é estável. Neste caso o indivíduo tem contato com parasito durante toda a sua vida e assim apresenta certo nível de imunidade às infecções pelo *P. falciparum* (34). A gravidade da doença é intensificada nas mulheres, sobretudo, na primeira e segunda gestação, sugerindo a existência de um forte mecanismo de proteção associado à imunidade específica contra os parasitos sequestrados na placenta.

Até o momento, os mecanismos envolvidos no aumento do risco de recrudesimento da malária durante a gravidez e o conseqüente impacto no desenvolvimento fetal são desconhecidos, sugerindo um complexo mecanismo de patogênese associado à infecção, à patologia placentária e ao desenvolvimento intrauterino (46). Entender quais os mecanismos envolvidos neste processo é de difícil observação em humanos, pois muitas vezes a recrudesência é facilmente confundida com uma re-infecção, devido a constante transmissão do parasita nessas áreas. Assim, estabelecemos um modelo experimental murino de recrudesência para compreender os mecanismos envolvidos neste fenômeno (46).

Uma característica marcante na resposta imunológica à malária é evidenciada pelo aumento do peso do baço após o início da infecção, que está associado à eliminação do parasito (162). Por essa razão, o baço revela-se como um órgão central para a remoção dos eritrócitos parasitados da circulação (159). Curiosamente, neste estudo, camundongos prenhes não recrudescentes mostraram tardiamente um aumento significativo no peso deste órgão em relação aos camundongos prenhes não infectados (**Figura 17B**), embora, não tivessem parasitemia periférica. O peso do baço pode ser utilizado indiretamente para indicar o *status* imunológico desse órgão sugerindo, neste caso, que os compartimentos linfocitários permanecem ativados mesmo na ausência de parasitemia periférica.

Neste modelo, semelhantemente ao que acontece nas zonas endêmicas (53), foi possível observar, nos animais com recrudesência durante a prenhez, uma diminuição significativa no peso do feto em comparação com camundongos prenhes não infectados (**Figura 17C**), indicando que a doença é agravada durante a gestação. Isto se deve ao processo inflamatório em curso que impacta diretamente a fisiologia da placenta. Em gestantes, o sequestro dos eritrócitos parasitados associado ao acúmulo de monócitos e hemozoína na placenta estão diretamente associados com o BPN (baixo peso ao nascer) (163,164). Neste caso, provavelmente as mudanças fisiológicas na placenta podem resultar na diminuição da eficiência no transporte de nutrientes e gases respiratórios (165,166).

No nosso caso, de forma interessante, também se observou uma redução significativa no espaço vascular da placenta nos camundongos prenhes não recrudescentes, o que corrobora

com a nossa hipótese inicial que aponta para um processo inflamatório em curso, apesar da ausência da parasitemia no sangue periférico (**Figura 18A**). Levando-se em conta que a placenta constitui um órgão importante, com uma função de interface entre o sangue materno e fetal, um processo inflamatório local induz a produção de citocinas e quimiocinas, além de gerar alterações morfológicas, como o espessamento do sincitiotrofoblasto (31). Essas alterações levam à diminuição do espaço vascular e, por conseguinte, dificulta as trocas de gases e de nutrientes induzindo restrição do crescimento intrauterino (RCIU), baixo peso ao nascer (BPN) e diminuição da viabilidade fetal (167,168).

Este fato reforça a hipótese de que os mecanismos efetores do sistema imune não são suficientemente eficientes para controlar a infecção por completo. Além disso, o plasmódio tem capacidade de gerar moléculas ativadoras, como a hemozoína, que estimula o sistema imunológico a produzir algumas citocinas como: IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-12; e quimiocinas como: MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ . Este é condição fundamental para a indução do processo inflamatório, com consequente recrutamento e a ativação de células mononucleares. Assim, a presença do parasito ou seus produtos são fatores necessários e decisivos para o agravamento da doença (165, 166).

Foi observado no grupo de animais prenhes recrudescentes, que o sistema imunológico é capaz de gerar uma resposta vigorosa contra o parasito, mesmo durante a prenhez (**Figura 18 e 19**). Deve-se levar em conta que a própria gestação cria um ambiente anti-inflamatório que propicia a proteção do feto contra a ação do sistema imunológico (171). Por outro lado, interessante, camundongos prenhes não recrudescentes e camundongos não prenhes crônicos, não apresentaram aumento no perfil inflamatório (**Figura 19**), indicando ausência da resposta, apesar da presença do parasito em diferentes tecidos, como foi demonstrado por bioluminescência (**Figura 20D-G**) e qRT-PCR (**Figura 21**).

Talvez este fato seja decorrente da baixa carga parasitária presente nestes animais e que poderia não ser um estímulo suficiente para perpetuar uma resposta imune vigorosa. Por outro lado mecanismos contraregulatórios podem ser ativados no curso da infecção. Neste sentido, foi observado um aumento significativo na produção de IL-10 nos camundongos prenhes não recrudescentes (**Figura 19**), o que coincide com os resultados mostrados por Saar et al. (2010). Estes pesquisadores demonstraram que gestantes com malária crônica acumulam pequenas quantidades de hemozoína na placenta, o que pode ser diretamente responsável pela indução do aumento nos níveis de IL-10. Além disso, sugeriram que uma carga parasitária mínima é suficiente para induzir a produção de IL-10 (172).

Os altos níveis de IL-10, observada nos camundongos prenhes não recrudescentes (**Figura 19**), pode ser indiretamente um indicador da presença do parasito em pequenas quantidades. Sabe-se que mesmo em uma infecção subclínica, a exposição prolongada a antígenos parasitários pode induzir o aumento na secreção de IL-10 por populações de células reguladoras e conseqüentemente afetar a função das DCs comprometendo a resposta imune do hospedeiro (73).

Nós detectamos nos tecidos dos grupos não prenhes crônicos e prenhes não recrudescentes a presença do parasito vivo por ensaio de bioluminescência (**Figura 20D-G**). Este resultado foi posteriormente confirmado por qRT-PCR (**Figura 21**), assim nós observamos um maior acúmulo de plasmódio no baço e no pulmão. Adicionalmente, utilizando citometria de imagem e microspia eletrônica demonstrando que as DCs são as células responsáveis por abrigar e manter o parasito vivo em seu interior (**Figura 23B**). Isto comprova a capacidade do plasmódio de escapar do reconhecimento imunológico, acumular-se e desenvolver-se em alguns tecidos (neste caso, principalmente no baço e no pulmão) e, como demonstrado por outros autores, reinfectar outros eritrócitos para gerar uma nova infecção (154). Convém ressaltar que, em humanos com infecção crônica a localização exata do parasito permanece ainda desconhecida.

Em um interessante artigo, Wykes e colaboradores demonstraram, utilizando ensaios *in vitro*, que o *P. berghei* pode não apenas sobreviver e replicar dentro das DCs, como também infectar novos eritrócitos de camundongos. Neste estudo as células pDCs, em particular aqueles que expressam o marcador inflamatório CD317, tinham a capacidade de proteger e perpetuar o parasito no seu interior (154). Como dito anteriormente, embora esta observação ainda não tenha sido demonstrada em humanos, há uma grande possibilidade de que essas células operem como verdadeiros “*cavalos de Tróia*”, abrigando e transportando parasitos para diferentes tecidos (104) e posteriormente também ser responsáveis pelo processo de recrudesimento da infecção.

Ao contrário da recrudesência que está descrita apenas nas infecções causadas por *P. falciparum*, indivíduos infectados com *P. vivax* e *P. ovale* podem vir a apresentar as chamadas “recaídas” após meses ou até anos da infecção inicial. Neste caso, em particular, devido à presença de formas dormentes no fígado chamadas de hipnozoítos (173). O *P. falciparum* pode persistir no organismo após uma infecção inicial e sem aparente parasitemia periférica (174), sugerindo que outras células, que não os hepatócitos, podem abrigar eritrócitos parasitados, impedindo-os de serem eliminados pelo sistema imunológico. Essa condição foi descrita na França, onde uma mulher apresentou um caso de recrudesência na 24<sup>a</sup> semana de



gestação, passados dois anos de um episódio de malária após uma viagem à África, a qual tinha sido tratada e controlada (45).

Nossos resultados em conjunto corroboram com o observado por Wykes e colaboradores (106,156), e sugerem fortemente que as células dendríticas estão diretamente envolvidas no processo de recrudescimento da infecção na malária experimental. De forma interessante, os ensaios de depleção das DCs em camundongos não prenhes crônicos aboliram por completo o recrudescimento durante a prenhez (**Figuras 26**). Posteriormente, foi confirmado por qRT-PCR que os parasitos foram completamente depurados de todos os tecidos (**Figura 25C**), possivelmente devido à morte das DCs decorrente de sua depleção com clodronato.

Para conseguir justificar como as DCs conseguem manter o parasito vivo no seu interior, é necessário entender que a presença do parasito nas DCs e a exposição a seus componentes pode resultar em falhas na maturação e função destas células. Falhas na maturação são também observadas nas DCs uterinas que durante uma gestação normal geram um microambiente anti-inflamatório específico na decídua, impedindo a geração e a maturação das DCs com função inflamatória. Este fenômeno é também acompanhado pela produção de IL-10 e inibição de moléculas de maturação, como: CD83, CD86 e MHC-II (175).

Na infecção por *P. yoelii*, após uma exposição prolongada ao parasita as DCs perdem a capacidade de amadurecer e responder até mesmo na presença de LPS, uma importante molécula na indução da maturação das DCs. Isto acontece mesmo em doses muito altas, onde se observa nas DCs mudanças no perfil de expressão de citocinas associado à manutenção de um fenótipo imaturo irreversível (157). Por outro lado fatores tais como a hemozoína também tem a capacidade de induzir a perda da ativação e a maturação das DCs como foi demonstrado para *P. chabaudi* (103).

Isto poderia explicar no nosso estudo a falta de um aumento na expressão de marcadores de ativação (CD80, CD86 e MHC-II) para as DCs (**Figura 28**) ou para as subpopulações de DCs (pDCs, cDC CD8, cDCs CD4+) (**Figuras 29 e Figura 30**) como observado nos grupos de camundongos não prenhes crônicos e prenhe não recrudescente comparado ao grupo prenhe não infectado. Isto tudo, mesmo apesar de ter sido confirmada a presença do parasito no interior das DCs. Assim, estes achados poderiam indicar que falhas na maturação nessas células estariam associadas à sobrevivência e evasão do parasito ao *clearance* por parte das DCs e a sua manutenção no interior destas células ou acumulado no tecido por longos períodos de tempo.

Um exemplo disto pode ser observado em infecções assintomáticas ou submicroscópicas de *P. falciparum* em países não endêmicos. Nestes casos, os parasitos podem sobreviver por mais de uma década e gerar novas infecções quando as condições forem favoráveis para o parasito, como por exemplo: nos transplantes, transfusões de sangue e até a mesma gestação (39). No caso específico da gestação, está favorece a susceptibilidade ao plamódio devido às condições imunológicas e hormonais particulares, além do tropismo do parasito pelo ambiente placentário (171,176,177). Um exemplo deste fenômeno foi observado em uma gestante do Camarões que morava na França e teve malária complicada por *P. falciparum* na gestação com confirmação de recrudescência. Esta mulher tinha apresentado sintomas de malária e foi tratada dois anos atrás em virtude de uma visita à África (45). Um caso similar também foi observado numa gestante que morava nos Estados Unidos a qual tinha visitado Gana três anos antes de engravidar (44).

Estes fatos demonstram que as condições imunológicas propícias favorecem a manutenção e retorno de uma nova parasitemia, especialmente durante a gestação. Nossos resultados corroboram com esta observação, assim quando transferimos DCs contendo o parasito vivo (CD11c+ GFP+) para camundongos prenhes *naive*, foi possível observar dias depois a geração de uma nova infecção (**Figura 27**).

Curiosamente, de todos os marcadores estudados, apenas o CD40 apresentou um aumento significativo em sua expressão em todas as subpopulações de DCs no grupo não prenhe crônico (**Figura 28**). Provavelmente este aumento pode ser atribuído à constante estimulação por componentes do parasito remanescentes nos tecidos. O CD40 é importante na maturação das DCs, na indução de respostas imunes Th1 e na geração de memória humoral e de células T (178). Nas DCs, o CD40 está associado à ativação de MAPK ou ERK, com consequente liberação de citocinas e a consequente indução de imunidade protetora contra infecções parasitárias, bacterianas e virais (179).

Para tentar entender a dinâmica de ativação ou modificação das DCs e suas subpopulações durante a infecção, nós avaliamos também os animais na fase aguda e no início da fase crônica. Foi observado uma modulação no peso e celularidade esplênica nos diferentes grupos (dia 7, dia 16, dia 22 e dia 50 pós-infecção) (**Figura 31**), característico de um processo ativo de infecção por plamódio (159). Neste caso a contínua retenção pelo baço de eritrócitos parasitados e não parasitados pode também explicar a esplenomegalia frequentemente associada à infecção (180).

Na fase crônica (dia 50 pós-infecção) os eritrócitos parasitados são neutralizados devido os altos níveis de anticorpos específicos, principalmente da subclase IgG1 e IgG2a

(corresponde a IgG3 em humanos), as quais são as responsáveis pela diminuição da carga parasitária (181). Assim, com o controle e consequente diminuição da parasitemia, é estabelecido uma infecção crônica, capaz de remodelar o baço (159), com uma redução da eritropoiese e aumento da anemia (180).

Quando avaliadas as subpopulações esplênicas, nos dias 22 e 50 pós-infecção foi identificado um aumento no número absoluto de células pDCs e cDCs CD8+ (**Figura 32**). Possivelmente este fenômeno esteja relacionado ao aumento da celularidade em virtude da constante estímulo em função da presença do parasito e também pelo recrutamento de células imunológicas (159).

Ao mesmo tempo, as diferentes subpopulações de DCs no dia 22 (agudo) e 50 (crônico) apresentaram redução ou se mantiveram similares ao controle não infectado em algumas das moléculas associadas ao perfil de maturação ou ativação (**Figura 33-36**). Isto é um indicativo da perda paulatina da ativação destas células com o decorrer da infecção. Diferentes grupos têm demonstrado problemas na ativação e maturação das DCs durante a infecção por *Plasmodium* spp. (102). Este fato, provavelmente, pode explicar as diferenças nos perfis das subpopulações de dendríticas nos diferentes momentos analisados (**Figura 33-36**). Já foi reportado que componentes do parasito, como a hemozoína pode impedir a maturação e ativação das DCs (182). Assim, a direta exposição ao parasito e seus componentes poderia interferir diretamente, tanto no funcionamento das DCs através da diminuição da expressão de moléculas de MHC-II, como em outras moléculas coestimuladoras, tais como CD80 e CD86 (104, 105).

Por outro lado, houve um aumento da expressão de CD16/CD32 com o decorrer da infecção, sendo mais evidente no dia 50 pós-infecção (**Figuras 33, 34, 35 e 36**). O CD16 também conhecido como receptor Fc $\gamma$  tipo III é o receptor para a porção Fc gama dos anticorpos, e foi descrita como uma molécula importante na indução da migração das DCs ao órgão linfoide (68). Similar ao CD32, e também chamado Receptor Fc gama tipo II, o CD16 é importante no reconhecimento da porção Fc da IgG e na internalização dos antígenos. Quando estimulado induz o aumento da produção de IL-10 e drástica redução na produção de IL-12 em DCs de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, cultivadas por longos períodos de tempo em presença de imunocomplexos (70). De forma análoga, foi observado um aumento do CD16 em monócitos humanos cultivados e estimulados com eritrócitos parasitados por *P. falciparum*. Neste caso o aumento da expressão de CD16 foi diretamente proporcional ao tempo de exposição ao parasito e resultou em uma maior capacidade de fagocitoses do parasito por parte destas células (183).

*P. falciparum*, pode ativar as DCs derivadas de monócitos, além de estimular vias de ativação alternativas por meio do CD16. Essas modificações, em conjunto com as alterações na expressão das moléculas de superfície e ativação, podem aumentar a captura de antígenos e potencializar sua apresentação e, assim, melhorar a resposta das células T contra o parasito (67). Durante infecções por *P. falciparum* observa-se um contínuo aumento dos níveis de anticorpos, dos isotipos IgG e IgM, essas diferenças foram mais evidentes com o decorrer do tempo ou a idade dos indivíduos tratados (184). O que poderia ser consistente com a hipótese de que a imunidade à malária é formada durante um longo período e com múltiplas exposições (185). Assim, no nosso modelo, o aumento da expressão de CD16/CD32 associado com a ausência da parasitemia periférica após 50 dias pós-infecção, poderia estar relacionado ao aumento dos níveis dos anticorpos específicos contra o parasito.

No caso do CD36, nós observamos que as cDCs CD8+ apresentaram um aumento na sua expressão nos dias 7, 16 e 50 pós-infecção (**Figura 34**). Neste sentido já foi descrito que o CD36 é um dos principais receptores envolvidos na aderência de EP no endotélio da microvasculatura periférica (105,106). Além disso, mutações no gene CD36 em indivíduos que vivem em zonas endêmicas têm sido relacionadas à proteção na malária grave ou susceptibilidade a múltiplas infecções (108), possivelmente, pelas características imunológicas ou genéticas do hospedeiro e a dinâmica da infecção.

Em humanos, CD36 medeia a ligação entre EP por *P. falciparum* e as DCs derivadas de monócitos sangue periférico. Como consequência desta interação, as DC secretam baixos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-12 em resposta a estimulação dos EP (109,186). No nosso caso, isto poderia explicar o fato das cDCs CD8+ apresentarem um aumento na expressão de CD36. Isto facilitaria o controle da parasitemia por conta do aumento de fagocitose, corroborando com o fato que no dia 50 pós-infecção não é mais possível observar parasitemia periférica (**Figuras 31 e 34**).

O seguinte passo foi tentar entender qual seria o efeito da gestação, na ausência de infecção, nas diferentes subpopulações de DCs. Neste sentido focamos nossos estudos em apenas dois grupos. Assim quando foram avaliados apenas os grupos de prenhes e não prenhes sem infecção, observou-se um aumento do peso e da celularidade em fêmeas prenhes quando comparadas às não prenhes (**Figura 37**). Possivelmente este fato estaria relacionado como o recrutamento de subpopulações celulares da periferia para o baço, durante a gravidez. O que sugere um aumento de determinadas populações leucocitárias deste órgão, como as células T, em especial as reguladoras (98). Já foi reportado mudanças na proporção das pDCs e cDCs no sangue periférico de gestantes saudáveis, possivelmente em função da migração

destas células para o baço ou outros órgãos linfoides (187). Esta observação também corrobora com os nossos resultados que indicam um aumento significativo das cDCs CD8+, cDCs CD4+ e cDCs CD4/CD8- no baço dos camundongos prenhes não infectados (**Figura 38**).

Por outro lado, só as pDCs e cDCs CD4+ analisadas durante a gravidez apresentaram uma diminuição na expressão de moléculas de MHC-II, (**Figura 39 e 41**). Já as cDCs CD8 apresentaram diminuição de MHC-II, CD80, CD86, (**Figura 40**). Isto se deve, provavelmente, ao estado de imunomodulação que acompanha a gestação e, que, de certa forma, protege os fetos contra ação do sistema imune materno mediante a tolerância imunológica (95).

A gestação acarreta grandes modificações no número, perfil de ativação e maturação das DCs (94). Já foi observado terceiro trimestre da gravidez um diminuição das cDCs circulantes no sangue periférico. Estas células expressavam significativamente menos CD86 e HLA-DR em comparação com mulheres não grávidas (97). Isto seria possivelmente devido as drásticas mudanças hormonais e ao conseqüente aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e M-CSF necessárias para manutenção da tolerância à presença do embrião (58).

Adicionalmente, a gestação tem a capacidade de modular e reduzir a fagocitoses em algumas células do sistema imune como monócitos (188) ou DCs (101). No caso das DCs estas alterações também afetam a sua capacidade de processar e apresentar antígenos de plasmódio (101,189). O que foi possivelmente observado em nosso modelo, com uma significativa redução de CD16/CD32 nas pDCs, cDCs CD8+ e cDCs CD4+ (Figuras **39, 40 e 41**), além da redução do CD36 nas cDCs CD8+ (**Figura 40**).

Talvez este fato esteja diretamente envolvido na redução da fagocitose observada nos nossos experimentos e também aumento exacerbado da parasitemia na prenhez (**Figura 43A**). Durante a prenhez, as DCs têm uma clara perda de eficiência para fagocitar eritrócitos parasitados ao contrário de camundongos não prenhes (**Figura 45A-D**). Curiosamente, resultado semelhante foi evidenciado em macrófagos (**Figura 45E e F**), os quais possuem alta atividade fagocítica e antimicrobiana e têm grande capacidade de induzir uma resposta Th1.

Diferentes grupos de pesquisadores têm mostrado problemas na ativação e maturação de DCs durante a infecção por *P. falciparum* (103), o que provavelmente explica as diferenças nos perfis de subpopulações de DCs nos diferentes momentos analisados. Por outro lado, fatores como o aumento dos níveis de alguns hormônios característicos da gestação podem afetar a maturação e ativação de macrófagos (190) e das DCs (191).

Embora seja conhecido que a gravidez gere condições imunológicas para manutenção da tolerância contra o feto (58,192). Interessantemente, na presença da infecção ativa as DCs mostraram uma aumento significativa na expressão de moléculas de ativação MHC-II, CD80, CD86 e CD40 nos camundongos prenhes infectados (**Figura 46**), em relação ao grupo controle. Assim, a presença do parasita e seus componentes poderia induzir um padrão de resposta Th1 (46,146) e assim, ser responsável pelos efeitos deletérios durante a prenhez observados no nosso modelo

Também foi identificado, uma sensível diminuição na expressão de CD36 no grupo de camundongos prenhes infectados comparado aos camundongos prenhez não infectados (**Figura 46**). Considerando que o CD36, é responsável pelo sequestro do *Plasmodium* na microvasculatura (16), e o controle do parasito pela fagocitoses e *clearance* dos iRBC (195). Assim a redução da sua expressão, possivelmente seria devido a sua internalização após a interação como os eritrócitos parasitados. Tal fenômeno já foi demonstrado em infecções por *P. berghei* onde se evidenciou uma redução expressiva dos níveis de CD36 (105).

O CD32 é importante para migração das DCs para órgão linfoides secundários (66) e também para sua maturação (70). Também quando expresso em DCs sanguíneas pode realizar um papel relevante na captação de partículas estranhas e macromoléculas antes da apresentação para células T (69). Nossos resultados corroboram com esta ideia, assim observamos um aumento significativo na expressão de CD16/CD32 nas DCs do animais prenhes infectados (**Figura 46**).

Considerando o importante papel dos macrófagos no *clearance* do parasito, nós identificamos um aumento no número absoluto de macrófagos M1 do baço de camundongos prenhes não infectados (**Figura 47A-B**). Este dado foi contrário daquele obtido com camundongos prenhes infectados no G13, onde o número de macrófagos M1 e M2 foram reduzidos (**Figura 47C-D**). Este cenário associado a uma perda da capacidade de fagocitose (**Figura 45E, F**), também observado nas DCs, pode indicar que gravidez afeta diretamente a capacidade de fagocitose do sistema imunológico como um todo. É interessante indicar que os macrófagos M2 estão geralmente associados à resolução da inflamação e eliminação de células apoptóticas, portanto, associado a um perfil anti-inflamatório (196).

Também observamos um acentuado aumento no perfil inflamatório, evidenciado pelo aumento nos níveis periféricos de TNF-a, IFN-g, MCP-1 e IL-6, em camundongos prenhes infectados no dia G13 e analisados 7 dias após a infecção (G19) (**Figuras 44**). Ao contrário do esperado, foi identificado um perfil intermediário em relação aos camundongos não

prenhes infectados (**Figura 44**). Esse resultado pode ser explicado pelos altos níveis de parasitemia vistos nos camundongos prenhes infectados.

Isso poderia justificar a polarização para um perfil Th1. Curiosamente, na presença de infecção ativa durante a prenhez, o perfil de citocinas parece ser pró-inflamatório, o que pode explicar os efeitos deletérios do sistema imune sobre o desenvolvimento fetal e a capacidade do parasito de induzir um padrão de resposta Th1 (146,177).

Os dados do presente estudo mostram pela primeira vez, em um modelo *in vivo*, que o baço e os pulmões são dois importantes reservatórios para o *P. berghei*. Além disto, demonstrou-se o importante papel das DCs na manutenção e proteção do parasito frente a ação do sistema imune, e como esta célula é a responsável direta pela geração da recrudescência na prenhez. Ressaltando-se que, a prenhez é uma condição obrigatória para que este parasito, que se encontra em uma condição latente, gere uma nova infecção. Entretanto desconhecemos os mecanismos envolvidos na sobrevivência e manutenção destes parasitos dentro da DCs. Este estudo abre uma importante perspectiva, no sentido do entendimento dos mecanismos envolvidos no recrudescimento da malariae durante a gestação.

## **6 CONCLUSÕES**



O conjunto de resultados obtidos nesse trabalho trazem contribuições para o entendimento dos mecanismos envolvidos na recrudescência da malária gestacional. Dessa forma, as principais conclusões obtidas foram:

1) O *eritrócitos parasitados por Plasmodium berghei* são sequestrados preferencialmente no baço e nos pulmões, especialmente na fase crônica da infecção.

2) As células dendríticas estão envolvidas na manutenção do *Plasmodium berghei* em seu interior.

3) Na fase crônica, a depleção das DCs juntamente com outros fagócitos inibe por completo o recrudescimento da infecção durante a prenhez.

4) A prenhez é uma condição necessária para que o parasito seja liberado e gere uma nova infecção.

5) Camundongos não prenhes crônicos apresentam uma perda do perfil de ativação, diretamente associada à superexposição ao parasito.

6) As DCs do baço dos camundongos prenhes não infectadas mostraram uma diminuição do perfil de ativação e dos marcadores de fagocitose CD36 e CD16/CD32.

7) A capacidade de fagocitose das DCs e dos macrófagos é diminuída com a prenhez.

## **REFERÊNCIAS**

1. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M, et al. A global map of dominant malaria vectors. *Parasit Vectors* [Internet]. 2012;5(January 2008):69.
2. WHO. WORLD MALARIA REPORT 2015 [Internet]. 2015.
3. WHO. Malaria in pregnancy, WHO Evidence Review Group meeting report [Internet]. Geneva, Switzerland; 2015.
4. WHO. World malaria report 2014 [Internet]. Switzerland; 2014.
5. SVS/MS. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. *Bol Epidemiol.* 2015;46:43–2015.
6. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. *Lancet* [Internet]. 2014 Feb 22;383(9918):723–35.
7. Bartoloni A, Zammarchi L. Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2012;4(1):e2012026.
8. Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SHI, Alonso PL, Collins FH, et al. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest.* 2008;118(4):1266–76.
9. Simpson J a, Aarons L, Collins WE, Jeffery GM, White NJ. Population dynamics of untreated *Plasmodium falciparum* malaria within the adult human host during the expansion phase of the infection. *Parasitology.* 2002;124(Pt 3):247–63.
10. Curtis N, Finn A, Pollard A. Hot Topics in Infection and Immunity in Children IX [Internet]. Curtis N, Finn A, Pollard AJ, editors. New York, NY, NY: Springer New York; 2013. 241-250 p. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 764).
11. Gachot B, Ringwald P. Severe Malaria. *Trop Med Int Heal* [Internet]. 2014 Sep 1;19(3):7–131.
12. Dondorp AM, Ince C, Charunwatthana P, Hanson J, van Kuijen A, Faiz MA, et al. Direct in vivo assessment of microcirculatory dysfunction in severe *falciparum* malaria. *J Infect Dis* [Internet]. 2008;197(1):79–84.
13. Aird WC, Mosnier LO, Fairhurst RM. *Plasmodium falciparum* picks (on) EPCR. *Blood.* 2014;123(2):163–7.
14. Fried M, Duffy PE. Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science.* 1996;272(5267):1502–4.
15. Rogerson SJ, Chaiyaroj SC, Ng K, Reeder JC, Brown GV. Chondroitin sulfate A is a cell surface receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Exp Med.* Rockefeller Univ Press; 1995;182(1):15–20.
16. Baruch D, Gormely J. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion. *Proc.* 1996;93(8):3497–502.
17. Treutiger CJ, Heddini A, Fernandez V, Muller WA, Wahlgren M. PECAM-1/CD31, an endothelial receptor for binding *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Nat Med.* 1997;3(12):1405–8.
18. Gazzinelli RT, Kalantari P, Fitzgerald K a, Golenbock DT. Innate sensing of malaria parasites. *Nat Rev Immunol.* 2014 Oct;14(11):744–57.
19. Gupte S. Recent Advances in Pediatrics - Special Volume 22 - Immunology, Infections

- and Immunization. 1st ed. Gupte S-B, Gupte M, editors. New Delhi: JP Medical Ltd; 2013. 325 p.
20. Gallego-Delgado J, Ty M, Orengo JM, van de Hoef D, Rodriguez A. A surprising role for uric acid: the inflammatory malaria response. *Curr Rheumatol Rep*. 2014;16(2):401.
  21. Stanistic DI, Cutts J, Eriksson E, Fowkes FJI, Rosanas-Urgell A, Siba P, et al.  $\gamma\delta$  T cells and CD14+ monocytes are predominant cellular sources of cytokines and chemokines associated with severe malaria. *J Infect Dis*. 2014 Jul;210(2):295–305.
  22. Brabin BJ, Romagosa C, Abdelgalil S, Menéndez C, Verhoeff FH, McGready R, et al. The sick placenta-the role of malaria. *Placenta*. 2004 May;25(5):359–78.
  23. Dellicour S, Tatem AJ, Guerra CA, Snow RW, Ter Kuile FO. Quantifying the number of pregnancies at risk of malaria in 2007: A demographic study. *PLoS Med*. 2010;7(1):1–10.
  24. Rogerson SJ, Mwapasa V, Meshnick SR. Malaria in pregnancy: linking immunity and pathogenesis to prevention. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2007 Dec;77(6 Suppl):14–22.
  25. Takem EN, D'Alessandro U. Malaria in pregnancy. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2013;5(1).
  26. WHO. World Malaria Report 2013 [Internet]. WHO. 2013 Aug.
  27. Ladeia-Andrade S, Ferreira MU, Carvalho ME de, Curado I, Coura JR. Age-dependent acquisition of protective immunity to malaria in riverine populations of the Amazon Basin of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2009 Mar;80(3):452–9.
  28. Fried M, Nosten F, Brockman A, Brabin BJ, Duffy PE. Maternal antibodies block malaria. *Nature*. 1998 Oct 29;395(6705):851–2.
  29. Rogerson SJ, Boeuf P. New approaches to pathogenesis of malaria in pregnancy. *Parasitology*. 2007;134(Pt 13):1883–93.
  30. Lucchi NW, Peterson DS, Moore JM. Immunologic activation of human syncytiotrophoblast by *Plasmodium falciparum*. *Malar J*. 2008;7:42.
  31. Ismail MR, Ordi J, Menendez C, Ventura PJ, Aponte JJ, Kahigwa E, et al. Placental pathology in malaria: a histological, immunohistochemical, and quantitative study. *Hum Pathol*. 2000 Jan;31(1):85–93.
  32. Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol*. 2005 Sep;5(9):722–35.
  33. Saxena N, Murthy PSR. Hydrolytic enzyme activity in rhesus monkey placenta during early gestational malaria: histochemical studies. *J Vector Borne Dis* [Internet]. 2005 Dec;42(4):135–40.
  34. Nosten F, Rogerson SJ, Beeson JG, McGready R, Mutabingwa TK, Brabin B. Malaria in pregnancy and the endemicity spectrum: what can we learn? *Trends Parasitol*. 2004;20(9):425–32.
  35. Hulden L, Hulden L. Activation of the hypnozoite: a part of *Plasmodium vivax* life cycle and survival. *Malar J* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2011 Jan [cited 2012 Nov 5];10(1):90.
  36. Thanapongpichat S, McGready R, Luxemburger C, Day NP, White NJ, Nosten F, et al. Microsatellite genotyping of *Plasmodium vivax* infections and their relapses in

- pregnant and non-pregnant patients on the Thai-Myanmar border. *Malar J*. 2013;12(1):1–9.
37. Imwong M, Boel ME, Pagornrat W, Pimanpanarak M, McGready R, Day NPJ, et al. The First *Plasmodium vivax* Relapses of Life Are Usually Genetically Homologous. *J Infect Dis* [Internet]. 2012 Feb 15;205(4):680–3.
  38. van Zon AA, Eling WM, Hermsen CC. Pregnancy-induced recrudescences strengthen malarial immunity in mice infected with *Plasmodium berghei*. *Parasitology* [Internet]. 1985 Aug [cited 2012 Nov 5];91 (Pt 1):9–17.
  39. Ashley EA, White NJ. The duration of *Plasmodium falciparum* infections. *Malar J* [Internet]. 2014;13(1):500.
  40. Bidegain F, Berry A, Alvarez M, Verhille O, Huguët F, Brousset P, et al. Acute *Plasmodium falciparum* Malaria Following Splenectomy for Suspected Lymphoma in 2 Patients. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2005 Jun 1;40(11):e97–100.
  41. Howden BP, Vaddadi G, Manitta J, Grayson ML. Chronic *falciparum* malaria causing massive splenomegaly 9 years after leaving an endemic area. *Med J Aust* [Internet]. 2005 Feb 21;182(4):186–8.
  42. Moussiliou A, Sissinto-Savi De Tove Y, Doritchamou J, Luty AJ, Massougbdji A, Alifrangis M, et al. High rates of parasite recrudescence following intermittent preventive treatment with sulphadoxine-pyrimethamine during pregnancy in Benin. *Malar J* [Internet]. *Malaria Journal*; 2013;12(1):195.
  43. Laochan N, Zaloumis SG, Imwong M, Lek-Uthai U, Brockman A, Sriprawat K, et al. Intervals to *Plasmodium falciparum* recurrence after anti-malarial treatment in pregnancy: A longitudinal prospective cohort. *Malar J* [Internet]. 2015;14(1):1–9.
  44. Al Hammadi A, Mitchell M, Abraham GM, Wang JP. Recrudescence of *Plasmodium falciparum* in a Primigravida after Nearly 3 Years of Latency. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2017 Jan 2;96(3):16-0803.
  45. Malvy D, Torrentino-Madamet M, L'Ollivier C, Receveur M-C, Jeddi F, Delhaes L, et al. *Plasmodium falciparum* Recrudescence Two Years after a First Treated Uncomplicated Infection without Return in a Malaria Endemic Area. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2017 Dec 11;(December):AAC.01892-17.
  46. Marinho CRF, Neres R, Epiphanyo S, Gonçalves L a, Catarino MB, Penha-Gonçalves C. Recrudescence *Plasmodium berghei* from pregnant mice displays enhanced binding to the placenta and induces protection in multigravida. *PLoS One*. 2009 Jan;4(5):e5630.
  47. Baruch D, Pasloske B, Singh H, Bi X. Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell*. 1995;82(1):77–87.
  48. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo O. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. 2002 Feb;415(6872):673–9.
  49. Beeson JG, Duffy PE. The immunology and pathogenesis of malaria during pregnancy. *Curr Top Microbiol Immunol* [Internet]. 2005;297:187–227.
  50. Fievet N, Moussa M, Tami G, Maubert B, Cot M, Deloron P, et al. *Plasmodium falciparum* induces a Th1/Th2 disequilibrium, favoring the Th1-type pathway, in the human placenta. *J Infect Dis* [Internet]. 2001 May 15;183(10):1530–4.
  51. Ordi J, Menendez C, Ismail MR, Ventura PJ, Palacín A, Kahigwa E, et al. Placental malaria is associated with cell-mediated inflammatory responses with selective absence

- of natural killer cells. *J Infect Dis*. 2001 Apr 1;183(7):1100–7.
52. Abrams ET, Brown H, Chensue SW, Turner GDH, Tadesse E, Lema VM, et al. Host response to malaria during pregnancy: placental monocyte recruitment is associated with elevated beta chemokine expression. *J Immunol*. 2003 Mar 1;170(5):2759–64.
  53. Umbers AJ, Aitken EH, Rogerson SJ. Malaria in pregnancy: small babies, big problem. *Trends Parasitol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011 Apr;27(4):168–75.
  54. Umbers AJ, Boeuf P, Clapham C, Stanisic DI, Baiwog F, Mueller I, et al. Placental Malaria-Associated Inflammation Disturbs the Insulin-like Growth Factor Axis of Fetal Growth Regulation. *J Infect Dis* [Internet]. 2011 Feb 15;203(4):561–9.
  55. Conroy AL, Silver KL, Zhong K, Rennie M, Ward P, Sarma JV, et al. Complement activation and the resulting placental vascular insufficiency drives fetal growth restriction associated with placental malaria. *Cell Host Microbe* [Internet]. Elsevier; 2013;13(2):215–26.
  56. Elliott SR, Spurck TP, Dodin JM, Maier AG, Voss TS, Yosaatmadja F, et al. Inhibition of dendritic cell maturation by malaria is dose dependent and does not require *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1. *Infect Immun*. 2007;75(7):3621–32.
  57. Aldebert D, Diallo M, Niang M, Sarr D, Cisse C, Moreau JC, et al. Differences in circulating dendritic cell subtypes in peripheral, placental and cord blood in African pregnant women. *J Reprod Immunol* [Internet]. 2007 Feb [cited 2012 Oct 29];73(1):11–9.
  58. Diallo M, Aldebert D, Moreau J-C, Ndiaye M, Jambou R. Decrease of lymphoid dendritic cells in blood from malaria-infected pregnant women. *Int J Parasitol*. Australian Society for Parasitology Inc.; 2008 Nov;38(13):1557–65.
  59. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y-J, et al. Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2000 Apr [cited 2013 Jul 30];18(1):767–811.
  60. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1973;137(5):1142–62.
  61. Lambrecht BN, Salomon B, Klatzmann D, Pauwels RA. Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice. *J Immunol* [Internet]. 1998 Apr 15 [cited 2014 Dec 10];160(8):4090–7.
  62. Bigley V, Haniffa M, Doulatov S, Wang X-N, Dickinson R, McGovern N, et al. The human syndrome of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *J Exp Med* [Internet]. 2011 Feb 14 [cited 2014 Dec 10];208(2):227–34.
  63. Belz GT, Nutt SL. Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2012 Feb [cited 2014 Jul 22];12(2):101–13.
  64. Ganguly D, Haak S, Sisirak V, Reizis B. The role of dendritic cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013 Aug [cited 2013 Aug 7];13(8):566–77.
  65. Reis e Sousa C, Stahl PD, Austyn JM. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J Exp Med*. 1993;178(2):509–19.
  66. Bharadwaj D, Mold C, Markham E, Du Clos TW. Serum amyloid P component binds

- to Fc gamma receptors and opsonizes particles for phagocytosis. *J Immunol*. 2001;166(11):6735–41.
67. Teirlinck AC, Roestenberg M, Bijker EM, Hoffman SL, Sauerwein RW, Scholzen A. Plasmodium falciparum infection of human volunteers activates monocytes and CD16+ dendritic cells and induces up-regulation of CD16 and CD1c expression. *Infect Immun* [Internet]. 2015;2(July):IAI.00473-15.
  68. Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Liebman RM, Schäkel K. The CD16 + (FcγRIII + ) Subset of Human Monocytes Preferentially Becomes Migratory Dendritic Cells in a Model Tissue Setting. *J Exp Med* [Internet]. 2002 Aug 19;196(4):517–27.
  69. Fanger NA, Wardwell K, Shen L, Tedder TF, Guyre PM. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol*. 1996;157(2):541–8.
  70. Banki Z, Kacani L, Mullauer B, Wilflingseder D, Obermoser G, Niederegger H, et al. Cross-Linking of CD32 Induces Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells Via NF- B Signaling Pathway. *J Immunol* [Internet]. 2003;170(8):3963–70.
  71. El Khoury JB, Moore KJ, Means TK, Leung J, Terada K, Toft M, et al. CD36 mediates the innate host response to beta-amyloid. *J Exp Med*. 2003;197(12):1657–66.
  72. Franke-Fayard B, Janse CJ, Cunha-Rodrigues M, Ramesar J, Büscher P, Que I, et al. Murine malaria parasite sequestration: CD36 is the major receptor, but cerebral pathology is unlinked to sequestration. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2005;102(32):11468–73.
  73. Urban BC, Mwangi T, Ross A, Kinyanjui S, Mosobo M, Kai O, et al. Peripheral blood dendritic cells in children with acute Plasmodium falciparum malaria. *Blood* [Internet]. 2001 Nov 1 [cited 2012 Oct 29];98(9):2859–61.
  74. Stefania and Matzinger PG. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2001 Feb;13(1):114–9.
  75. Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2011 Jan [cited 2014 Oct 15];29:163–83.
  76. Liu Y-J. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2005 Jan [cited 2014 Dec 11];23:275–306.
  77. Dalod M, Salazar-Mather TP, Malmgaard L, Lewis C, Asselin-Paturel C, Brière F, et al. Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J Exp Med*. 2002;195(4):517–28.
  78. Gilliet M, Cao W, Liu Y-J. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2008 Aug [cited 2014 Oct 16];8(8):594–606.
  79. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2014 Jul 9];31:563–604.
  80. Beauchamp NM, Yammani RD, Alexander-Miller M a. CD8 Marks a Subpopulation of Lung-Derived Dendritic Cells with Differential Responsiveness to Viral Infection and Toll-Like Receptor Stimulation. *J Virol*. 2012;86(19):10640–50.
  81. den Haan JM, Lehar SM, Bevan MJ. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime

- cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* [Internet]. 2000 Dec 18 [cited 2014 Dec 10];192(12):1685–96.
82. Qiu C-H, Miyake Y, Kaise H, Kitamura H, Ohara O, Tanaka M. Novel subset of CD8 $\alpha$ + dendritic cells localized in the marginal zone is responsible for tolerance to cell-associated antigens. *J Immunol*. 2009;182(7):4127–36.
  83. Dunne PJ, Moran B, Cummins RC, Mills KHG. CD11c+CD8 $\alpha$ + dendritic cells promote protective immunity to respiratory infection with *Bordetella pertussis*. *J Immunol*. 2009;183(1):400–10.
  84. Pascual DW, Wang X, Kochetkova I, Callis G, Riccardi C. The absence of lymphoid CD8+ dendritic cell maturation in L-selectin-/- respiratory compartment attenuates antiviral immunity. *J Immunol*. 2008;181(2):1345–56.
  85. Allenspach EJ, Lemos MP, Porrett PM, Turka LA, Laufer TM. Migratory and lymphoid-resident dendritic cells cooperate to efficiently prime naive CD4 T cells. *Immunity* [Internet]. 2008 Nov 14 [cited 2014 Dec 10];29(5):795–806.
  86. Naik SH, Metcalf D, van Nieuwenhuijze A, Wicks I, Wu L, O’Keeffe M, et al. Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol* [Internet]. 2006 Jun [cited 2014 Dec 11];7(6):663–71.
  87. Ginhoux F, Liu K, Helft J, Bogunovic M, Greter M, Hashimoto D, et al. The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *J Exp Med* [Internet]. 2009 Dec 21 [cited 2014 Dec 10];206(13):3115–30.
  88. Lewis KL, Caton ML, Bogunovic M, Greter M, Grajkowska LT, Ng D, et al. Notch2 receptor signaling controls functional differentiation of dendritic cells in the spleen and intestine. *Immunity* [Internet]. 2011 Nov 23 [cited 2014 Dec 11];35(5):780–91.
  89. Langlet C, Tamoutounour S, Henri S, Luche H, Ardouin L, Grégoire C, et al. CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization. *J Immunol* [Internet]. 2012 Feb 15 [cited 2014 Dec 1];188(4):1751–60.
  90. Cheong C, Matos I, Choi J-H, Dandamudi DB, Shrestha E, Longhi MP, et al. Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* [Internet]. 2010 Oct 29 [cited 2014 Dec 11];143(3):416–29.
  91. Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G-I, De los Santos K, Sparwasser T, et al. In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* [Internet]. 2002 Aug [cited 2014 Dec 11];17(2):211–20.
  92. Ginhoux F, Merad M. Ontogeny and homeostasis of Langerhans cells. *Immunol Cell Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2010 [cited 2014 Dec 11];88(4):387–92.
  93. Chaouat G, Ledée-Bataille N, Dubanchet S, Zourbas S, Sandra O, Martal J. Th1/Th2 paradigm in pregnancy: Paradigm lost? Cytokines in pregnancy/early abortion: Reexamining the Th1/Th2 paradigm. *Int Arch Allergy Immunol*. 2004;134(2):93–119.
  94. Darmochwal-Kolarz D, Rolinski J, Tabarkiewicz J, Leszczynska-Gorzela B, Buczkowski J, Wojas K, et al. Myeloid and lymphoid dendritic cells in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol*. 2003 May;132(2):339–44.
  95. Blois SM, Alba Soto CD, Tometten M, Klapp BF, Margni R a, Arck PC. Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy. *Biol Reprod*. 2004 Apr;70(4):1018–23.



96. Maldonado-López R, De Smedt T, Michel P, Godfroid J, Pajak B, Heirman C, et al. CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med*. 1999;189(3):587–92.
97. Bachy V, Williams DJ, Ibrahim M a a. Altered dendritic cell function in normal pregnancy. *J Reprod Immunol*. 2008 Jun;78(1):11–21.
98. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol*. 2004 Mar;5(3):266–71.
99. Darmochwal-Kolarz D, Kludka-Sternik M, Kolarz B, Chmielewski T, Tabarkiewicz J, Rolinski J, et al. The expression of B7-H1 and B7-H4 co-stimulatory molecules on myeloid and plasmacytoid dendritic cells in pre-eclampsia and normal pregnancy. *J Reprod Immunol* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2013;99(1–2):33–8.
100. Ing R, Segura M, Thawani N, Tam M, Stevenson MM. Interaction of Mouse Dendritic Cells and Malaria-Infected Erythrocytes: Uptake, Maturation, and Antigen Presentation. *J Immunol* [Internet]. 2006;176(1):441–50.
101. Seixas E, Moura Nunes JF, Matos I, Coutinho A. The interaction between DC and Plasmodium berghei/chabaudi-infected erythrocytes in mice involves direct cell-to-cell contact, internalization and TLR. *Eur J Immunol* [Internet]. 2009 Jul [cited 2014 Oct 27];39(7):1850–63.
102. Otti O, Sadd BM. Parental guidance? Trans-generational influences on offspring life history in mosquitoes. *Trends Parasitol*. 2008 May;24(5):197–9.
103. Millington OR, Di Lorenzo C, Phillips RS, Garside P, Brewer JM. Suppression of adaptive immunity to heterologous antigens during Plasmodium infection through hemozoin-induced failure of dendritic cell function. *J Biol*. 2006 Jan;5(2):5.
104. Wykes MN, Horne-Debets J. Dendritic cells: the Trojan horse of malaria? *Int J Parasitol*. Australian Society for Parasitology Inc.; 2012 May 15;42(6):583–7.
105. Gowda NM, Wu X, Kumar S, Febbraio M, Gowda DC. CD36 contributes to malaria parasite-induced pro-inflammatory cytokine production and NK and T cell activation by dendritic cells. *PLoS One* [Internet]. 2013 Jan [cited 2014 Oct 27];8(10):e77604.
106. Yipp BG, Hickey MJ, Andonegui G, Murray AG, Looareesuwan S, Kubes P, et al. Differential Roles of CD36, ICAM-1, and P-selectin in Plasmodium falciparum Cytoadherence In Vivo. *Microcirculation* [Internet]. 2007 Jan [cited 2012 Oct 30];14(6):593–602.
107. Omi K, Ohashi J, Patarapotikul J, Hananantachai H, Naka I, Looareesuwan S, et al. CD36 polymorphism is associated with protection from cerebral malaria. *Am J Hum Genet*. 2003;72(2):364–74.
108. Aitman TJ, Cooper LD, Norsworthy PJ, Wahid FN, Gray JK, Curtis BR, et al. Malaria susceptibility and CD36 mutation. *Nature*. 2000;405(6790):1015–6.
109. Urban BC, Willcox N, Roberts DJ. A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 17;98(15):8750–5.
110. Othoro C, Moore JM, Wannemuehler KA, Moses S, Lal A, Otieno J, et al. Elevated gamma interferon-producing NK cells, CD45RO memory-like T cells, and CD4 T cells are associated with protection against malaria infection in pregnancy. *Infect Immun*. 2008 Apr;76(4):1678–85.
111. Mendelson CR. Minireview: fetal-maternal hormonal signaling in pregnancy and labor. *Mol Endocrinol* [Internet]. 2009;23(7):947–54.

112. Giannoni E, Guignard L, Reymond MK, Perreau M, Roth-Kleiner M, Calandra T, et al. Estradiol and progesterone strongly inhibit the innate immune response of mononuclear cells in newborns. *Infect Immun*. 2011;79(7):2690–8.
113. Nair RR, Verma P, Singh K. Immune-endocrine crosstalk during pregnancy. *Gen Comp Endocrinol* [Internet]. 2017 Feb;242:18–23.
114. Huck B, Steck T, Habersack M, Dietl J, Kämmerer U. Pregnancy associated hormones modulate the cytokine production but not the phenotype of PBMC-derived human dendritic cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet]. 2005 Sep;122(1):85–94.
115. Faas MM, Spaans F, De Vos P. Monocytes and macrophages in pregnancy and pre-eclampsia. *Front Immunol*. 2014;5(JUN):1–11.
116. Brown MB, von Chamier M, Allam AB, Reyes L. M1/M2 Macrophage Polarity in Normal and Complicated Pregnancy. *Front Immunol* [Internet]. 2014 Nov 24;5(NOV):1–10.
117. Cervar M, Blaschitz A, Dohr G, Desoye G. Paracrine regulation of distinct trophoblast functions in vitro by placental macrophages. *Cell Tissue Res* [Internet]. 1999 Feb;295(2):297–305.
118. Hunt JS, Miller L, Platt JS. Hormonal Regulation of Uterine Macrophages. *Dev Immunol* [Internet]. 1998;6(1–2):105–10.
119. Nair RR, Sinha P, Khanna A, Singh K. Reduced Myeloid-derived Suppressor Cells in the Blood and Endometrium is Associated with Early Miscarriage. *Am J Reprod Immunol* [Internet]. 2015 Jun;73(6):479–86.
120. Dilek N, de Silly RV, Blanco G, Vanhove B. Myeloid-derived suppressor cells: Mechanisms of action and recent advances in their role in transplant tolerance. *Front Immunol*. 2012;3(JUL):1–9.
121. Laskarin G, Tokmadzić VS, Strbo N, Bogović T, Szekeres-Bartho J, Randić L, et al. Progesterone induced blocking factor (PIBF) mediates progesterone induced suppression of decidual lymphocyte cytotoxicity. *Am J Reprod Immunol* [Internet]. 2002;48(4):201–9.
122. Hao S, Zhao J, Zhou J, Zhao S, Hu Y, Hou Y. Modulation of 17 $\beta$ -estradiol on the number and cytotoxicity of NK cells in vivo related to MCM and activating receptors. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2007 Dec;7(13):1765–75.
123. Kammerer U, Rieger L, Honig A. Characterization of Human Dendritic Cells at the Maternal-Fetal Interphase. In: Landes Bioscience., editor. *Madame Curie Bioscience Database* [Internet] Austin (TX): Landes Bioscience [Internet]. 2000.
124. Xu Y, He H, Li C, Shi Y, Wang Q, Li W, et al. Immunosuppressive effect of progesterone on dendritic cells in mice. *J Reprod Immunol* [Internet]. 2011 Aug;
125. Xiu F, Anipindi VC, Nguyen P V., Boudreau J, Liang H, Wan Y, et al. High physiological concentrations of progesterone reverse estradiol-mediated changes in differentiation and functions of bone marrow derived dendritic cells. *PLoS One*. 2016;11(4):1–20.
126. Cordeau M, Herblot S, Charrier E, Audibert F, Cordeiro P, Harnois M, et al. Defects in CD54 and CD86 up-regulation by plasmacytoid dendritic cells during pregnancy. *Immunol Invest* [Internet]. 2012;41(5):497–506.
127. Schumacher A, Brachwitz N, Sohr S, Engeland K, Langwisch S, Dolaptchieva M, et al. Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal-maternal

- interface during early human pregnancy. *J Immunol*. 2009;182(9):5488–97.
128. Chien EJ, Chang C-P, Lee W-F, Su T-H, Wu C-H. Non-genomic immunosuppressive actions of progesterone inhibits PHA-induced alkalization and activation in T cells. *J Cell Biochem [Internet]*. 2006 Sep 1;99(1):292–304.
  129. Rolle L, Memarzadeh Tehran M, Morell-García A, Raeva Y, Schumacher A, Hartig R, et al. Cutting Edge: IL-10-Producing Regulatory B Cells in Early Human Pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2013;70(6):448–53.
  130. Miyaura H, Iwata M. Direct and Indirect Inhibition of Th1 Development by Progesterone and Glucocorticoids. *J Immunol [Internet]*. 2002;168(3):1087–94.
  131. SundarRaj S, Mukhopadhyay D, Karande AA. Glycodelin A triggers mitochondrial stress and apoptosis in T cells by a mechanism distinct and independent of TCR signaling. *Mol Immunol*. 2008;45(8):2391–400.
  132. Solano ME, Kowal MK, O'Rourke GE, Horst AK, Modest K, Plösch T, et al. Progesterone and HMOX-1 promote fetal growth by CD8+ T cell modulation. *J Clin Invest [Internet]*. 2015 Apr 1;125(4):1726–38.
  133. Rogerson SJ, Hviid L, Duffy PE, Leke RF, Taylor DW. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(2):105–17.
  134. Van Zon AA, Termaat RM, Schetters TP, Eling WM. *Plasmodium berghei*: reduction of the mouse's specific lymphoproliferative response in relation to corticosterone and pregnancy. *Exp Parasitol [Internet]*. 1986 Aug;62(1):71–8.
  135. Vleugels MP, Brabin B, Eling WM, de Graaf R. Cortisol and *Plasmodium falciparum* infection in pregnant women in Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg [Internet]*. 1989;83(2):173–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2692225>
  136. Bouyou-Akotet MK, Issifou S, Meye JF, Kombila M, Ngou-Milama E, Luty AJF, et al. Depressed Natural Killer Cell Cytotoxicity against *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes during First Pregnancies. *Clin Infect Dis [Internet]*. 2004;38(3):342–7.
  137. Bouyou-Akotet MK, Adegnika A a, Agnandji ST, Ngou-Milama E, Kombila M, Kremsner PG, et al. Cortisol and susceptibility to malaria during pregnancy. *Microbes Infect [Internet]*. 2005 [cited 2012 Dec 16];7(11–12):1217–23.
  138. Bayoumi NK, Elhassan EM, Elbashir MI, Adam I. Cortisol, prolactin, cytokines and the susceptibility of pregnant Sudanese women to *Plasmodium falciparum* malaria. *Ann Trop Med Parasitol [Internet]*. 2009 Mar;103(2):111–7.
  139. Watkinson M, Rushton DI, Lunn PG. Placental malaria and foetoplacental function: low plasma oestradiols associated with malarial pigmentation of the placenta. *Trans R Soc Trop Med Hyg [Internet]*. 1985;79(4):448–50.
  140. Schumacher A, Costa S-D, Zenclussen AC. Endocrine Factors Modulating Immune Responses in Pregnancy. *Front Immunol [Internet]*. 2014 May 8;5(May):1–12.
  141. Klein PW, Easterbrook JD, Lalime EN, Klein S. Estrogen and Progesterone Affect Responses to Malaria Infection in Female C57BL / 6 Mice. *Gend Med [Internet]*. Excerpta Medica Inc. All rights reserved.; 2008;5(4):423–33.
  142. Lopes LN, Folha Santos FA, Marques Oliveira LC, Ferreira Araujo MT, Sequeira CG, Libonati RMF, et al. An analysis of the influence of sex hormones on Balb/c mice infected with *Plasmodium berghei*. *Microb Pathog*. 2016;90:7–12.
  143. Dinny Graham J, Clarke CL. Physiological action of progesterone in target tissues.

- Endocr Rev. 1997;18(4):502–19.
144. Joachim R, Zenclussen AC, Polgar B, Douglas AJ, Fest S, Knackstedt M, et al. The progesterone derivative dydrogesterone abrogates murine stress-triggered abortion by inducing a Th2 biased local immune response. *Steroids*. 2003;68(10–13):931–40.
  145. Megnekou R, Tenou S, Bigoga JD, Djontu JC, Medou FM, Lissom A. Placental malaria and modulation of immune and hormonal responses in Cameroonian women. *Acta Trop* [Internet]. 2015 Jul;147:23–30.
  146. Neres R, Marinho CRF, Gonçalves L a, Catarino MB, Penha-Gonçalves C. Pregnancy outcome and placenta pathology in *Plasmodium berghei* ANKA infected mice reproduce the pathogenesis of severe malaria in pregnant women. *PLoS One*. 2008 Jan;3(2):e1608.
  147. Pereira K, Marinho CRF. Estudo dos mecanismos imunológicos envolvidos na recrudescência da malária experimental durante a gravidez. [Sao Paulo]; 2012.
  148. Kumar S, Gowda NM, Wu X, Gowda RN, Gowda DC. CD36 modulates proinflammatory cytokine responses to *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositols and merozoites by dendritic cells. *Parasite Immunol* [Internet]. 2012 Jul [cited 2012 Oct 29];34(7):372–82.
  149. Rezende E, Bradaschia-Correa V, Siviero F, Ambrosio LMB, Arana-Chavez VE. Effects of bisphosphonates on osteogenesis and osteoclastogenesis signaling during the endochondral ossification of growing rats. *Cell Tissue Res. Cell and Tissue Research*; 2017;368(2):287–300.
  150. Kim MG, Su Boo C, Sook Ko Y, Young Lee H, Yong Cho W, Kyu Kim H, et al. Depletion of kidney CD11c+ F4/80+ cells impairs the recovery process in ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(9):2908–21.
  151. Lepique AP, Daghasanli KRP, Cuccovia I, Villa LL. HPV16 tumor associated macrophages suppress antitumor T cell responses. *Clin Cancer Res*. 2009;15(13):4391–400.
  152. Cumming G, Fidler F, Vaux DL. Error bars in experimental biology. *J Cell Biol*. 2007 Apr;177(1):7–11.
  153. Malhotra I, Mungai P, Muchiri E, Ouma J, Sharma S, Kazura JW, et al. Distinct Th1- and Th2-Type prenatal cytokine responses to *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion ligands. *Infect Immun* [Internet]. 2005 Jun [cited 2012 Oct 31];73(6):3462–70.
  154. Wykes MN, Kay JG, Manderson A, Liu XQ, Brown DL, Richard DJ, et al. Rodent blood-stage *Plasmodium* survive in dendritic cells that infect naive mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jul 5;108(27):11205–10.
  155. Wykes MN. Are plasmacytoid dendritic cells the misguided sentinels of malarial immunity? *Trends Parasitol* [Internet]. 2012 May [cited 2013 Aug 14];28(5):182–6.
  156. Loughland JR, Minigo G, Sarovich DS, Field M, Tipping PE, Montes De Oca M, et al. Plasmacytoid dendritic cells appear inactive during sub-microscopic *Plasmodium falciparum* blood-stage infection, yet retain their ability to respond to TLR stimulation. *Sci Rep. Springer US*; 2017;7(1):1–11.
  157. Orengo JM, Wong K a, Ocaña-Morgner C, Rodriguez A. A *Plasmodium yoelii* soluble factor inhibits the phenotypic maturation of dendritic cells. *Malar J* [Internet]. 2008 Jan

- [cited 2012 Oct 29];7:254.
158. Fitri LE, Sardjono TW, Rahmah Z, Siswanto B, Handono K, Dachlan YP. Low Fetal Weight is Directly Caused by Sequestration of Parasites and Indirectly by IL-17 and IL-10 Imbalance in the Placenta of Pregnant Mice with Malaria. *Korean J Parasitol* [Internet]. 2015 Apr 22;53(2):189–96.
  159. Del Portillo HA, Ferrer M, Brugat T, Martin-Jaular L, Langhorne J, Lacerda MVG. The role of the spleen in malaria. *Cell Microbiol* [Internet]. 2012 Mar;14(3):343–55.
  160. Chua CLL, Brown G, Hamilton J a, Rogerson S, Boeuf P. Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology? *Trends Parasitol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012 Nov 8 [cited 2012 Nov 14];1–9.
  161. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2009;27:451–83.
  162. Quinn TC, Wyler DJ. Intravascular Clearance of Parasitized Erythrocytes in Rodent Malaria. *J Clin Invest*. 1979;63(6):1187–94.
  163. Rogerson SJ, Pollina E, Getachew A, Tadesse E, Lema VM, Molyneux ME. Placental monocyte infiltrates in response to *Plasmodium falciparum* malaria infection and their association with adverse pregnancy outcomes. *Am J Trop Med Hyg*. 2003/01/31. *ASTMH*; 2003;68(1):115–119.
  164. Muehlenbachs A, Fried M. A novel histological grading scheme for placental malaria applied in areas of high and low malaria transmission. *J Infect*. 2010;202(10):1608–16.
  165. Chandrasiri UP, Chua CLL, Umbers AJ, Chaluluka E, Glazier JD, Rogerson SJ, et al. Insight into the pathogenesis of fetal growth restriction in placental malaria: Decreased placental glucose transporter isoform 1 expression. *J Infect Dis*. 2014;209(10):1663–7.
  166. Jauniaux E, Poston L, Burton GJ. Placental-related diseases of pregnancy : involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Hum Reprod Updat* [Internet]. 2006;12(6):747–55.
  167. Steketee RW, Nahlen BL, Parise ME, Menendez C. The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;64(1–2 Suppl):28–35.
  168. Zohdi V, Sutherland MR, Lim K, Gubhaju L, Zimanyi MA, Black MJ. Low birth weight due to intrauterine growth restriction and/or preterm birth: Effects on nephron number and long-term renal health. *Int J Nephrol*. 2012;2012.
  169. Pichyangkul S, Saengkrai P, Webster HK. *Plasmodium falciparum* pigment induces monocytes to release high levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1994 Oct;51(4):430–5.
  170. Sherry BA, Alava G, Tracey KJ, Martiney J, Cerami A, Slater AF. Malaria-specific metabolite hemozoin mediates the release of several potent endogenous pyrogens (TNF, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta) in vitro, and altered thermoregulation in vivo. *J Inflamm* [Internet]. 1995;45(2):85–96.
  171. Rogerson SJ, Hviid L, Duffy PE, Leke RFG, Taylor DW. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet Infect Dis*. 2007 Feb;7(2):105–17.
  172. Sarr D, Aldebert D, Marrama L, Frealle E, Gaye A, Brahim HO, et al. Chronic infection during placental malaria is associated with up-regulation of cyclooxygenase-2. *Malar J* [Internet]. 2010;9(1):45. 475-2875-9-45
  173. Franke-Fayard B, Trueman H, Ramesar J, Mendoza J, Van Der Keur M, Van Der

- Linden R, et al. A *Plasmodium berghei* reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle. *Mol Biochem Parasitol*. 2004;137(1):23–33.
174. Pineli LL, Caetano A, Schoepfer DA, Veiga D. Malária por *Plasmodium falciparum* . Análise quadrienal , durante 12 anos , da eficácia do tratamento com quinino *Falciparum* malária . Quadrennial analysis , during 12 years of the quinine treatment efficacy. 1999;32(3):241–5.
  175. Segerer SE, Staib C, Kaemmerer U, Frambach T, Honig A, Dietl J, et al. Dendritic cells: elegant arbiters in human reproduction. *Curr Pharm Biotechnol* [Internet]. 2012 Jun;13(8):1378–84.
  176. Kabyemela ER, Muehlenbachs A, Fried M, Kurtis JD, Mutabingwa TK, Duffy PE. Maternal peripheral blood level of IL-10 as a marker for inflammatory placental malaria. *Malar J* [Internet]. 2008;7:26.
  177. Hviid L, Marinho CRF, Staalsoe T, Penha-Gonçalves C. Of mice and women: rodent models of placental malaria. *Trends Parasitol*. 2010 Aug;26(8):412–9.
  178. Grewal IS, Flavell RA. Cd40 and Cd154 in Cell-Mediated Immunity. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 1998;16(1):111–35.
  179. Mukherjee P, Chauhan VS. *Plasmodium falciparum*-free merozoites and infected RBCs distinctly affect soluble CD40 ligand-mediated maturation of immature monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2008;84(1):244–54.
  180. Buffet P a, Safeukui I, Milon G, Mercereau-Puijalon O, David PH. Retention of erythrocytes in the spleen: a double-edged process in human malaria. *Curr Opin Hematol* [Internet]. 2009;16(3):157–64.
  181. Stanisic DI, Richards JS, McCallum FJ, Michon P, King CL, Schoepflin S, et al. Immunoglobulin G subclass-specific responses against *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness. *Infect Immun*. 2009;77(3):1165–74.
  182. Millington OR, Gibson VB, Rush CM, Zinselmeyer BH, Phillips RS, Garside P, et al. Malaria impairs T cell clustering and immune priming despite normal signal 1 from dendritic cells. *PLoS Pathog*. 2007 Oct 12;3(10):1380–7.
  183. Zhou J, Feng G, Beeson J, Hogarth PM, Rogerson SJ, Yan Y, et al. CD14hiCD16+ monocytes phagocytose antibody-opsonised *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes more efficiently than other monocyte subsets, and require CD16 and complement to do so. *BMC Med* [Internet]. *BMC Medicine*; 2015 Dec 7;13(1):154.
  184. Nebie I, Diarra A, Ouedraogo A, Soulama I, Bougouma EC, Tiono AB, et al. Humoral Responses to *Plasmodium falciparum* Blood-Stage Antigens and Association with Incidence of Clinical Malaria in Children Living in an Area of Seasonal Malaria Transmission in Burkina Faso, West Africa. *Infect Immun* [Internet]. 2008 Feb 1;76(2):759–66.
  185. Cherif MK, Ouédraogo O, Sanou GS, Diarra A, Ouédraogo A, Tiono A, et al. Antibody responses to *P. falciparum* blood stage antigens and incidence of clinical malaria in children living in endemic area in Burkina Faso. *BMC Res Notes*. *BioMed Central*; 2017;10(1):1–10.
  186. Elliott SR, Spurck TP, Dodin JM, Maier AG, Voss TS, Yosaatmadja F, et al. Inhibition of dendritic cell maturation by malaria is dose dependent and does not require *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1. *Infect Immun*.

- 2007;75(7):3621–32.
187. Ueda Y, Hagihara M, Okamoto A, Higuchi A, Tanabe A, Hirabayashi K, et al. Frequencies of dendritic cells (myeloid DC and plasmacytoid DC) and their ratio reduced in pregnant women: comparison with umbilical cord blood and normal healthy adults. *Hum Immunol* [Internet]. 2003 Dec;64(12):1144–51.
  188. Neppert J, Pohl E, Mueller-Eckhardt C. Inhibition of immune phagocytosis by human sera with HLA A, B, C and DR but not with DQ or EM type reactivity. *Vox Sang*. 1986;51(2):122–6.
  189. Ing R, Segura M, Thawani N, Tam M, Stevenson MM. Interaction of Mouse Dendritic Cells and Malaria-Infected Erythrocytes: Uptake, Maturation, and Antigen Presentation. *J Immunol* [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2014 Oct 27];176(1):441–50.
  190. Menzies FM, Henriquez FL, Alexander J, Roberts CW. Selective inhibition and augmentation of alternative macrophage activation by progesterone. *Immunology*. 2011;134(3):281–91.
  191. Butts CL, Bowers E, Horn JC, Shukair SA, Belyavskaya E, Tonelli L, et al. Inhibitory effects of progesterone differ in dendritic cells from female and male rodents. *Gend Med* [Internet]. 2008 Dec;5(4):434–47.
  192. Nair RR, Verma P, Singh K. Immune-endocrine crosstalk during pregnancy. *Gen Comp Endocrinol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2017 Feb;242:18–23.
  193. Fievet N, Varani S, Ibitokou S, Briand V, Louis S, Perrin RX, et al. Plasmodium falciparum exposure in utero, maternal age and parity influence the innate activation of foetal antigen presenting cells. *Malar J*. 2009;8(1):1–12.
  194. Ibitokou S, Oesterholt M, Brutus L, Borgella S, Agbowai C, Ezinmègnon S, et al. Peripheral Blood Cell Signatures of Plasmodium falciparum Infection during Pregnancy. *PLoS One*. 2012;7(12).
  195. Erdman LK, Cosio G, Helmers AJ, Gowda DC, Grinstein S, Kain KC. CD36 and TLR interactions in inflammation and phagocytosis: implications for malaria. *J Immunol* [Internet]. 2009 Nov 15 [cited 2012 Oct 30];183(10):6452–9.
  196. Abumaree MH, Al Jumah M a., Kalionis B, Jawdat D, Al Khaldi A, Abomaray FM, et al. Human Placental Mesenchymal Stem Cells (pMSCs) Play a Role as Immune Suppressive Cells by Shifting Macrophage Differentiation from Inflammatory M1 to Anti-inflammatory M2 Macrophages. *Stem Cell Rev Reports* [Internet]. 2013 Oct;9(5):620–41.

## **APÊNDICES**





Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000  
 Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.058.2017

São Paulo, 14 de junho de 2017.

Prezado(a) Professor(a),

Informo que o projeto intitulado "*Caracterização do papel das células dendríticas no recrudescimento da malária na gestação*", registrado sob o protocolo nº **073/2013** e aprovado em 18/06/2013 que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, foi **prorrogado até 18/06/2021**.

Diante desta prorrogação e da declaração de que não houve alteração da metodologia e das técnicas descritas na licença inicial para o uso de animais, autorizo a inclusão das espécies e quantidades descritas abaixo para continuidade ao referido projeto:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade/Peso	Quantidade por ano
Camundongo	Balb/c	Ambos	6-8 semanas	1º: 60 2º: 40
Camundongo	C57BL/6J	Ambos	6-8 semanas	1º: 60 2º: 60

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA-ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**  
 Coordenador - CEUA-ICB/USP

Prof.(a) Dr.(a) **Cláudio Romero Farias Marinho**  
 Departamento de **Parasitologia**  
 Instituto de Ciências Biomédicas - USP