

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
Centro de Biociências e Biotecnologia

Subpopulação positiva para fosfatidilserina de *Plasmodium chabaudi* modula negativamente a produção de óxido nítrico em macrófagos ativados

Pedro Souto Rodrigues

Fevereiro de 2016

Subpopulação positiva para fosfatidilserina de *Plasmodium chabaudi* modula negativamente a produção de óxido nítrico em macrófagos ativados

PEDRO SOUTO RODRIGUES

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia sob a orientação do Prof. Dr. Sergio Henrique Seabra.

Coorientador: Renato Augusto DaMatta

Orientador: Sergio Henrique Seabra

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
2016

Subpopulação positiva para fosfatidilserina de *Plasmodium chabaudi* modula negativamente a produção de óxido nítrico em macrófagos ativados

PEDRO SOUTO RODRIGUES

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia sob a orientação do Prof. Dr. Sergio Henrique Seabra.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2016:

Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro (Examinador)

Prof. Dr. Clóvis de Paula Santos (Examinador)

Prof^ª. Dr^ª. Jessica Many Bittencourt Dias Vieira (Examinador)

Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta (Coorientador)

Prof. Dr. Sergio Henrique Seabra (Orientador)

Dedico esta monografia ao meu pai, Pedro Rodrigues da Silva Jr.,
in memoriam, por ter sido, desde o momento de meu nascimento,
exemplo para minha vida e principalmente por ter depositado em
mim a sua confiança, possibilitando a concretização dos meus
sonhos.

*Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível.*
Charles Chaplin

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, que escrevendo certo por linhas tortas me guiou até aqui.

Ao meu Pai, Pedro (*in memorian*), que apesar de não poder estar comigo nesse momento me apoiou em todos os momentos da minha vida e sem o qual eu não seria nada que sou hoje.

A minha mãe que acredita no meu potencial e me apoia de todas as formas possíveis.

Ao meu irmão Daniel, que também é meu melhor amigo, por toda ajuda no inglês dos artigos.

A John (*in memorian*), meu grande amigo que se foi muito cedo. Com você aqui tenho certeza que toda essa jornada teria sido muito mais divertida.

Agradeço a Amanda, que me apoiou desde o dia em que ficamos juntos até o dia que nos separamos, e que apesar de não ter dado certo ainda é a minha amiga. Mesmo que hoje em dia seja diferente, não poderia deixar de agradecer uma pessoa que fez da minha graduação e parte do mestrado uma época tão feliz.

Ao Thiago, Felipe, Pedro e Yago que fizeram o dia a dia do laboratório uma experiência descontraída e divertida.

Ao professor Sergio, quem me orientou e me ajudou na construção deste trabalho e tem me acompanhando desde a iniciação científica.

Ao professor Renato DaMatta, que sem o qual a realização desse trabalho não teria sido possível e que sempre me ajudou em todos os aspectos, seja com idéias ou puxões de orelha.

Resumo

A malária é uma das doenças parasitárias mais prevalentes nos países tropicais, especialmente na África Ocidental, Sudeste Asiático e América Latina. A enfermidade causa a morte anual de aproximadamente um milhão de indivíduos. O estudo da malária humana apresenta empecilhos, portanto, o uso de modelos experimentais tem gerado inúmeras contribuições para a compreensão da biologia do parasito e da doença. A infecção de camundongos por *Plasmodium chabaudi* é um dos modelos mais próximos da doença humana causada pelo *P. falciparum*. Óxido nítrico é um mediador inflamatório com efeito microbicida produzido por macrófagos ativados. Um mecanismo evasivo que inibe a produção de óxido nítrico de macrófagos foi demonstrado nos protozoários parasíticos *Leishmania amazonensis*, *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi*. Tal mecanismo consiste na exposição de fosfatidilserina (PS), fosfolipídeo presente na membrana plasmática que normalmente está voltado para o meio intracelular, e é o principal ligante envolvido no reconhecimento de células apoptóticas nas quais fica exposto. Devido a exposição da PS, células apoptóticas geram resposta anti-inflamatória em macrófagos quando são fagocitadas. A exposição da PS por tais protozoários consiste em um mecanismo de evasão denominado “mimetismo apoptótico”. Para verificar se esse mecanismo ocorre em *P. chabaudi*, esse parasito foi usado para infectar macrófagos peritoneais de camundongo ativados *in vitro* e camundongos. Cerca de 90% da população eritrocítica de *P. chabaudi* expõem PS levando a inibição total da produção de óxido nítrico em 48 h de interação com macrófagos. Ademais a infecção causa retração citoplasmática e formação de *blebs* nos macrófagos. Camundongos não desenvolveram parasitemia e não morreram quando foram infectados com parasitos com a PS bloqueada por anexina-V, diferente da infecção com parasitos expondo PS que resultou em alta parasitemia e morte dos animais. Nossos resultados sugerem que *P. chabaudi* realiza o “mimetismo apoptótico”, reforçando a hipótese de que tal mecanismo é comum a diversos protozoários parasitos indicando que a exposição da PS possui papel fundamental no processo infectivo de protozoários parasitos.

Palavras-chave: *Plasmodium chabaudi*, Fosfatidilserina, Oxido Nítrico, Macrófagos, Camundongos.

Abstract

Malaria is one of the most prominent parasitic diseases in the tropical countries, especially in West Africa, Southeast Asia and Latin America. The illness is responsible for the annual death of approximately 1 million people worldwide. Studying human malaria implies some adversities, thus, the utilization of experimental models has contributed deeply to the comprehension of the parasite's biology and of the disease itself. The *Plasmodium chabaudi* infection of mice is one of the models most similar to the human disease caused by *P. falciparum*. Nitric oxide is an inflammatory mediator with microbicidal effect produced by activated macrophages. An evasive mechanism that inhibits the nitric oxide production by macrophages was demonstrated in *Leishmania amazonensis*, *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. Such mechanism consists in the phosphatidylserine (PS) exposition, a phospholipid present in the plasmatic membrane that is usually directed to the inside of the cell and is the major binder involved in the recognition of apoptotic cells in which it is exposed. Apoptotic cells generate an anti-inflammatory response in macrophages when phagocytosed due to PS. The PS exposure by such protozoa consists in an evasive mechanism entitled "apoptotic mimicry". To verify if the mechanism occurs in *P. chabaudi*, this parasite was used to infect mice peritoneal activated macrophages *in vitro* and mice. About 90% of the *P. chabaudi* erythrocytic population exposes PS leading to the complete inhibition of the nitric oxide production in 48 h of interaction with macrophages. In addition, infection caused cytoplasmic retraction and *blebs* formation of macrophages. Mice did not develop parasitemia and did not die when infected with parasites which PS was blocked with annexine-V, in contrast to the infection with parasites exposing PS that resulted in high parasitemia and death of the animals. Our results suggest that *P. chabaudi* performs "apoptotic mimicry", reinforcing the hypothesis that such mechanism is commonly present in many protozoa parasite, suggesting that PS exposure hold a crucial role in the parasite infective process.

Keywords: *Plasmodium chabaudi*, Phosphatidylserine, Nitric Oxide, Macrophage

Lista de Esquemas e Figuras

Esquema 1 - Áreas mundiais (vermelho) endêmicas da malária. OMS (2014).....	1
Esquema 2 - Mimetismo apoptótico em amastigotas de <i>Leishmania amazonenses</i>	3
Esquema 3 - Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i> spp.....	9
Esquema 4 - Sinalização que ativa macrófago (Mø) levando a produção de óxido nítrico	11
Esquema 5 - Membrana de células eucarióticas.....	13
Esquema 6 - Identificação de células expondo fosfatidilserina (apoptóticas) através de marcação usando anexina-v.....	17
Tabela 1 - Comparação da patogenicidade de <i>Plasmodium chabaudi</i> de camundongos e infecções causadas por <i>Plasmodium</i> de humanos.....	7
Figura 1 - A população de <i>Plasmodium chabaudi</i> isolada de eritrócitos expõe fosfatidilserina.....	25
Figura 2 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura da interação de <i>Plasmodium</i> <i>chabaudi</i> com macrófagos ativados após 1, 24 e 48 h.....	27
Figura 3 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos ativados após interação com <i>Plasmodium chabaudi</i>	28
Figura 4 - Dosagem de nitrito em sobrenadante de cultura de macrófagos ativados após interações de populações de <i>Plasmodium chabaudi</i> fosfatidilserina positiva e de fosfatidilserina bloqueada.....	29
Figura 5 - Análise da expressão de iNOS por imunofluorescência e DIC de macrófagos ativados após interação de 1, 24 e 48 h com <i>Plasmodium chabaudi</i>	31
Figura 6 - Curva de sobrevivência de camundongos após infecção com parasitos expondo fosfatidilserina (PS) ou bloqueada.....	32

Figura 7 - Imagens por microscopia de campo claro de esfregações sanguíneas de camundongos infectados com parasitos fosfatidilserina positivos ou bloqueada após 4 e 7 dias.....34

Lista de abreviações

- **INF** – Interferon
- **TNF** – Fator de Necrose Tumoral
- **TGF- β** – Factor de crescimento transformante do tipo β
- **LPS** – Lipopolissacarídeo
- **BSA** - Soro Albumina Bovina
- **DMEM** – Meio Eagle Modificado por Dulbeccus
- **DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- **ELISA** – Enzyme Linked Immunosorbent Assay
- **eNOS** – Óxido Nítrico Sintase Endotelial
- **iNOS** – Óxido Nítrico Sintase Indusível
- **NOS** – Óxido Nítrico Sintase
- **nNOS** – Óxido Nítrico Sintase Neuronal
- **PBS** – Tampão Fosfato-Salino
- **PHEM** – Pipes Hepes EGTA MgCl₂
- **PI** – Iodeto de Propídio
- **PS** – Fosfatidilserina
- **SFB** – Soro Fetal Bovino

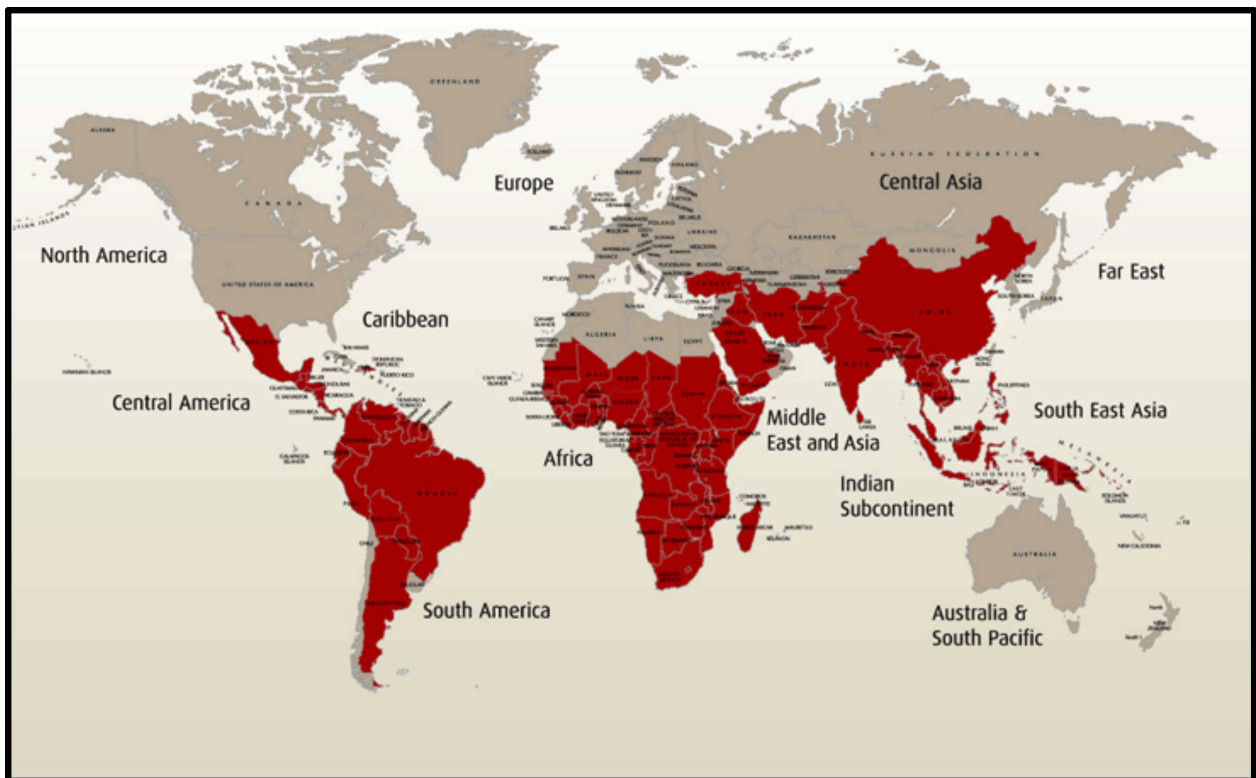
Sumario

1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura.....	5
2.1. Malária.....	5
2.2. Macrófago.....	10
2.3. iNOS e o Óxido Nítrico.....	12
2.4. Fosfatidilserina e Interação Parasito-Célula.....	13
2.5. Óxido nítrico e a malária murina causada por <i>P. chabaudi</i>	15
2.6. Apoptose e Autofagia.....	16
3. Objetivos.....	19
3.1. Objetivos gerais.....	19
3.2. Objetivos específicos.....	19
4.1. Obtenção de formas eritrocíticas de <i>Plasmodium chabaudi</i>	20
4.2. Isolamento das subpopulações de parasitos PS+ e PS-.....	20
4.3. Avaliação da exposição da fosfatidilserina por citometria de fluxo.....	21
4.4. Obtenção de macrófagos peritoneais.....	21
4.5. Ativação de macrófagos peritoneais e interação com parasitos.....	21
4.6. Microscopia eletrônica de varredura.....	21
4.7. Microscopia eletrônica de transmissão.....	22
4.9. Avaliação da expressão de iNOS em macrófagos infectados com <i>Plasmodium chabaudi</i>	23
4.10. Infecção in vivo.....	23
4.11. Microscopia óptica de campo claro.....	24
5. Resultados.....	25

5.1. Análise da expressão de PS pela população eritrocítica de <i>Plasmodium chabaudi</i>	25
5.2. Microscopia eletrônica de varredura de <i>Plasmodium chabaudi</i> com macrófagos peritoneais de camundongos ativado.....	27
5.3. Microscopia eletrônica de transmissão de <i>Plasmodium chabaudi</i> com macrófagos peritoneais de camundongo ativado.....	28
5.4. Produção de óxido nítrico no sobrenadante de cultura após interações de <i>Plasmodium chabaudi</i> com macrófagos ativados.....	29
5.5. Expressão da iNOS após interação de <i>Plasmodium chabaudi</i> com macrófagos ativados.....	31
5.6. Curva de sobrevivência de camundongos após infecção com subpopulações de parasitos fosfatidilserina positiva e bloqueada com anexina-V	32
5.7. Análise da infecção in vivo através de microscopia de campo claro.....	33
6. Discussão.....	35
7. Conclusões.....	39
8. Referências bibliográficas.....	40

1. Introdução

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a malária é uma das doenças parasitárias mais prevalentes nos países tropicais, especialmente na África Ocidental, Sudeste Asiático e América Latina (Esquema 1). Essa enfermidade causa a morte anual de aproximadamente 1 milhão de indivíduos. Essa doença é causada por protozoários intracelulares, pertencentes ao gênero *Plasmodium*. Cerca de 30 espécies de *Plasmodium* são capazes de infectarem primatas, excluindo o ser humano (BAIRD, 2009). Apenas cinco espécies de *Plasmodium* afetam humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malarie*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (RICHARDS & BEESON, 2009).



Esquema 1 – Áreas mundiais (vermelho) endêmicas da malária (SNOW *et al.*, 2014).

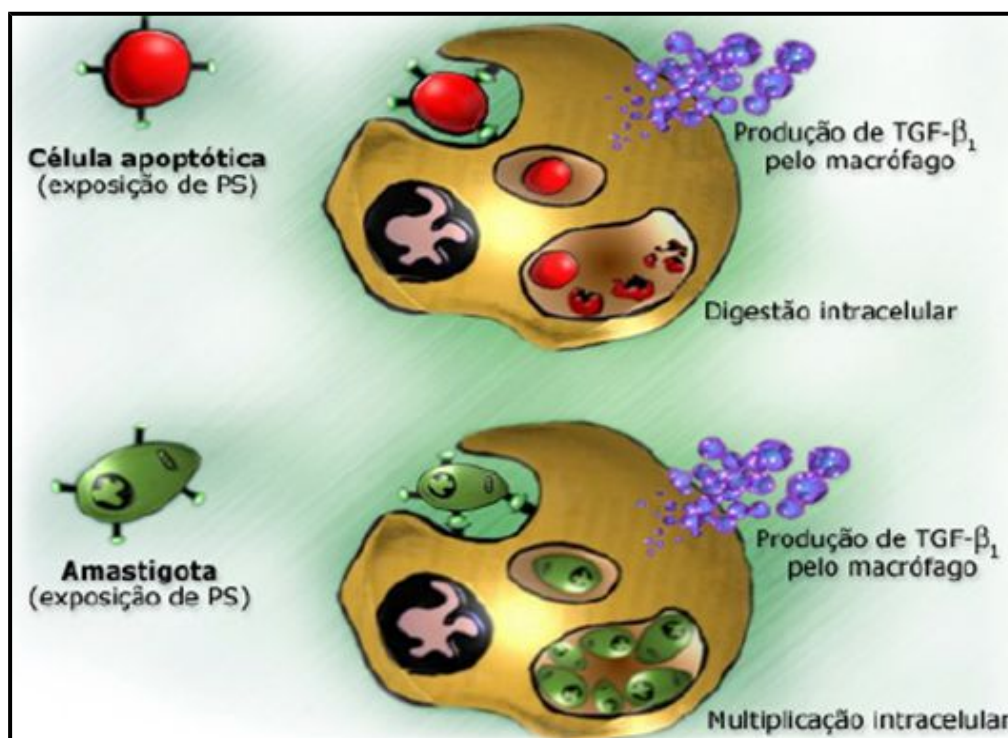
O trabalho com a malária humana é de difícil experimentação. Com isso, modelos experimentais são cruciais e têm gerado inúmeras contribuições para a

compreensão da doença. Entre estes modelos, a infecção por *P. chabaudi* em camundongos parece ser aquela que mais se aproxima da doença humana causada pelo *P. falciparum* (COX *et al.*, 1987).

Existem diversas hipóteses para explicar os mecanismos envolvidos na patogenicidade da malária. Legorreta-Herrera *et al.* (2011) demonstraram em um modelo experimental com camundongos que em uma infecção por *P. chabaudi* os níveis de óxido nítrico (NO) não estão associados com a eliminação dos estágios sanguíneos do parasito *in vivo*. Além disso, ocorre aumento da taxa de apoptose de células T CD8+ e da expressão de Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α e interferon (IFN)- γ quando a enzima NO sintase induzível (iNOS) é inibida por aminoguanidina. Isso sugere que NO poderia estar envolvido na ativação de células efetoras do sistema imune. Em macrófagos, a produção de NO é catalisada pela iNOS (GREGORY & OLIVIER, 2005), sendo o IFN- γ o principal sinal para ativação de macrófagos (MUÑOZ-FERNÁNDEZ, 1992). Macrófagos peritoneais de camundongo tratados com IFN- γ expressam iNOS (STUEHR & MARLETTA, 1987) e, conseqüentemente, produzem altos níveis de NO. A produção de NO de macrófagos ativados é um mediador inflamatório com efeito microbicida contra patógenos (VESPA *et al.*, 1994).

Um mecanismo evasivo que inibe a produção de NO por macrófagos ativados foi demonstrado em *Leishmania amazonensis* (BALANCO *et al.*, 2001), *Toxoplasma gondii* (SEABRA *et al.*, 2004) e *Trypanosoma cruzi* (DAMATTA *et al.*, 2007). Tal mecanismo consiste na exposição de fosfatidilserina (PS), um fosfolípídeo da membrana plasmática que normalmente está voltado para o meio intracelular. No entanto, quando células entram em morte celular por apoptose expõem PS na monocamada externa da membrana plasmática (FADOK *et al.*, 1992). A exposição de PS é o principal ligante envolvido no reconhecimento de células apoptóticas (FADOK *et al.*, 2001). De acordo com Fadok *et al.* (1998), a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos gera resposta anti-inflamatória devido à exposição de PS. A exposição deste fosfolípídeo por tais protozoários consiste em um mecanismo de evasão, denominado “mimetismo apoptótico” (BALANCO *et al.*, 2001; BARCINSKI *et al.*, 2003). Esse mecanismo é

ilustrado no esquema 2, na qual amastigotas de *L. amazonensis* conseguem evadir de macrófagos através da exposição de PS assim como células apoptóticas induzem resposta anti-inflamatória.



Esquema 2 – Mimetismo apoptótico em amastigotas de *Leishmania amazonenses*. Quando macrófago encontra célula apoptótica (vermelho) a PS exposta gera uma resposta não inflamatória através da produção de TGF- β que por sinalização autócrina inibe a via de ativação de óxido nítrico sintase induzida e, conseqüentemente, inibe a produção de NO. Amastigotas (verde) de *L. amazonenses* externalizam PS “mimetizando” a resposta anti-inflamatória baseada na produção de TGF- β levando ao maior crescimento do parasito. (COSTA *et al.*, 2009).

Integrando as análises obtidas deste trabalho com dados da literatura, acreditamos ter contribuído um pouco mais para o entendimento do processo de infecção do parasito causador da malária. Demonstramos que PS possui papel vital para o processo infectivo de *P. chabaudi*, e possivelmente para outros protozoários

parasitos. Esse achado permitiu o melhor entendimento da biologia do parasito além de criar um novo caminho para o desenvolvimento de novas terapias. Além disso, pela primeira vez foi demonstrado que a população PS+ de *P. chabaudi* é capaz de modular negativamente a expressão de iNOS, regulando a produção de NO.

2. Revisão de Literatura

2.1. Malária

A malária é causada por protozoários intracelulares, pertencentes ao filo Apicomplexa, ordem *Eucoccidiida*, família *Plasmodiidae* e gênero *Plasmodium*. Existem cerca de 200 espécies de *Plasmodium*, porém somente cinco espécies causam a doença em humanos: *P. falciparum* (sendo a mais importante), *P. vivax*, *P. malarie*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (RICHARDS & BEESON, 2009).

Devido a impossibilidades éticas de se experimentar durante a doença humana, a infecção de camundongos por parasitos de roedores tem sido usada como um dos modelos experimentais de malária, originando inúmeras contribuições para a compreensão da doença. Entre estes modelos, a infecção por *P. chabaudi* em camundongos parece ser aquela que mais se aproxima da doença humana causada por *P. falciparum* (COX *et al.*, 1987). Outras espécies de *Plasmodium* spp. que infectam roedores são: *P. berghei*, *P. vinckei* e *P. yoelii* (RICHARDS & BEENSON, 2009).

Camundongos infectados com *P. chabaudi* apresentam uma série de sintomas alguns já no início da fase aguda da doença (CROSS & LANGHORNE, 1998). A patogênese da infecção por malária em humanos depende de diversos fatores, mas gera uma resposta imune não-apropriada no hospedeiro (PANG *et al.*, 2016), sendo centrado na ocorrência de três eventos primordiais: anemia malarial grave, induzida pela resposta imune (LAMIKANRA, *et al.*, 2007), sequestro de eritrócitos infectados para células endoteliais ativadas (HEDDINI, *et al.*, 2001) e acidose metabólica (MACKINTOSH, *et al.*, 2004). Em contraste com a malária em humanos, onde a esquizogonia leva à febre, camundongos infectados por *P. chabaudi* desenvolvem hipotermia (STEPHENS *et al.*, 2012). Anemia ocorre em indivíduos infectados com malária devido a uma combinação de morte dos eritrócitos infectados, supressão da eritropoiese, depuração de eritrócitos não infectados por fagocitose e desenvolvimento anormal de eritrócitos (LAMIKANRA, *et al.*, 2007). Esses mesmos processos têm sido mostrados em camundongos infectados por *P. chabaudi* (MOHAN & STEVENSON, 1998; BELYAEV *et al.*, 2010), tornando este um bom modelo para estudar a malária

humana.

Em 2012, Stephens *et al.* compilaram informações da patogenicidade de *P. chabaudi* em camundongos com *P. vivax* e *P. falciparum* em humanos, ambos sendo os principais causadores da malária em humanos. Tais informações estão relacionadas na tabela 1.

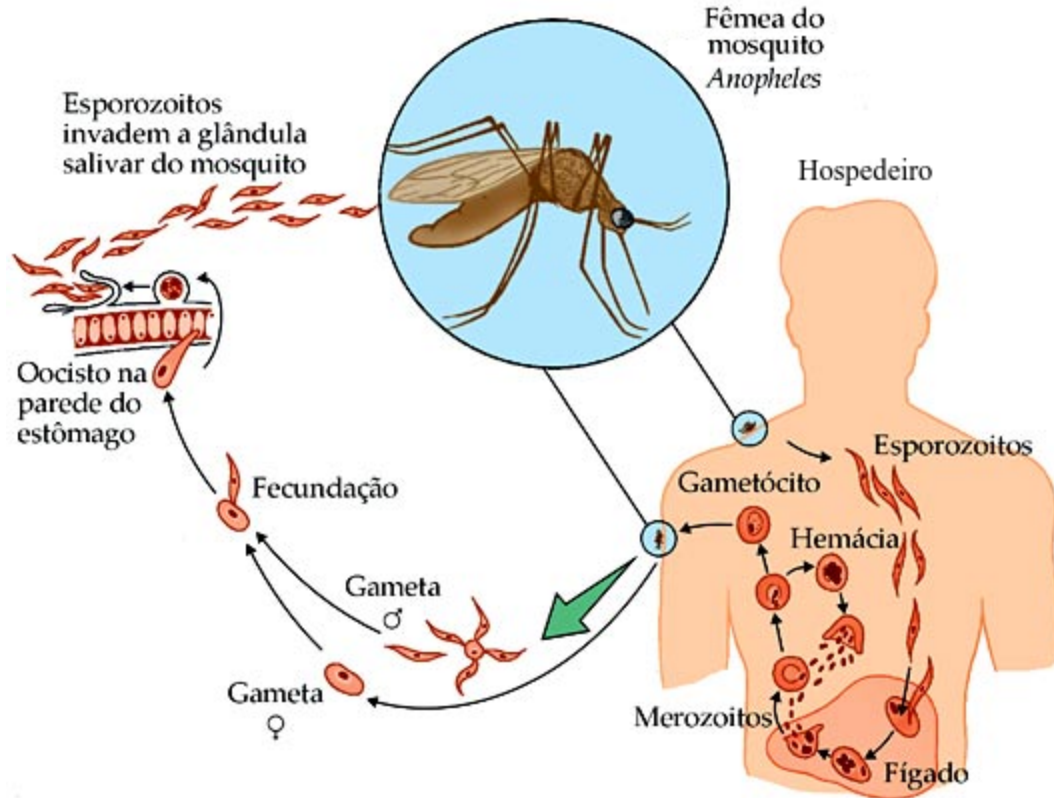
Tabela 1 - Comparação da patogenicidade de *Plasmodium chabaudi* de camundongos e infecções causadas por *Plasmodium* de humanos (STEPHENS et al., 2012).

Patogênese	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. chabaudi</i>
Febre	Picos constantes, ou irregulares de febre, muitas vezes seguido por um padrão cíclico de 36-48 h.	Febre ocorre a cada 48 h.	Camundongos infectados desenvolvem hipotermia gradualmente.
Anemia e Trombocitopenia	Desenvolvimento de anemia grave com eritrofagocitose e supressão da hematopoiese; desenvolvimento de trombocitopenia.	Igual a <i>P. falciparum</i> .	Desenvolvimento de anemia grave com eritrofagocitose e supressão da hematopoiese. Indução de trombocitopenia, com recuperação após o pico da parasitemia.
Malaria cerebral	Relacionada com edema cerebral, hemorragia, inflamação e bloqueio do fluxo sanguíneo.	Geralmente não apresenta, mas alguns casos foram descritos na literatura.	Geralmente não apresenta, mas sintomas cerebrais foram observados em certos camundongos.
Esplenomegalia	Esplenomegalia presente.	Esplenomegalia presente.	Esplenomegalia presente após o quinto dia de infecção.
Hipoglicemia	Infecção induz hipoglicemia.	Igual a <i>P. falciparum</i> .	Igual a <i>P. falciparum</i> .
Dificuldades respiratórias e acidose metabólica	Aumento da letalidade da síndrome de dificuldades respiratória aguda. A indução de acidose metabólica contribui para o surgimento da síndrome.	Induz lesões aos pulmões e dificuldades respiratórias. Menos grave do que a infecção por <i>P. falciparum</i> . Ocorre a indução de acidose metabólica levando a desconforto respiratório.	Cepas mais virulentas causam dificuldades respiratórias. Algumas espécies mais suscetíveis de camundongos desenvolvem dificuldades respiratórias. O nível de acidose não é conhecido.
Malária placentária	Causa nascimento com baixo peso aumentando risco de morte perinatal.	Causa nascimento com baixo peso.	Inflamação placentária e aborto.

A malária é transmitida exclusivamente através da picada de mosquitos do gênero *Anopheles*. O ciclo de vida deste protozoário envolve dois hospedeiros. O ciclo sexuado ocorre no mosquito que é, portanto, o hospedeiro definitivo. O ciclo assexuado ocorre no hospedeiro vertebrado (BLACKMAN, 2004).

De acordo com Greenwood (2009), a infecção malárica inicia-se durante um repasto sanguíneo infectante, no qual esporozoítos são inoculados sob a pele do hospedeiro e em seguida ganham a corrente sanguínea. Os esporozoítos são móveis, apesar de não apresentarem cílios ou flagelos. Tal motilidade está intimamente associada à reorientação de proteínas na superfície do parasito sendo essenciais para a adesão e invasão às células hospedeiras. Esporozoítos de *Plasmodium* spp. podem invadir células sem necessariamente se desenvolverem nas mesmas, o que propicia a sua migração por diferentes células, antes que ocorra resposta inflamatória. Após invadir o hepatócito, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos pré-eritrocíticos. Esta primeira etapa é denominada fase pré-eritrocítica ou tissular. Estes se multiplicam por reprodução assexuada do tipo esquizogonia, dando origem aos esquizontes teciduais. Posteriormente, os hepatócitos infectados se rompem e liberam vesículas denominadas merossomas na corrente sanguínea, contendo agregados de merozoítos em seu interior. Os merozoítos rompem os merossomas e invadem rapidamente os eritrócitos, dando início ao ciclo eritrocítico. O desenvolvimento do parasito se dá por esquizogonia, com formação de merozoítos que invadirão outros eritrócitos. Alternativamente, alguns merozoítos se diferenciam em gametócitos masculinos e femininos e são ingeridos pelo mosquito, dando origem a fase sexuada do ciclo (GOOD & DOOLAN, 1999).

No intestino do mosquito, onde a temperatura é mais baixa, os gametas femininos e masculinos emergem das hemáceas infectadas, o que é seguido pela fertilização, gerando zigotos. Estes se desenvolvem em oocistos, dando início à esporogonia. Quando o oocisto se rompe, há liberação de esporozoítas que se deslocam até à glândula salivar do mosquito, onde se hospedam e de onde são liberados durante a alimentação da fêmea, e desta forma, o ciclo reinicia (GOOD *et al.*, 2005). O esquema 3 ilustra o ciclo de vida de *Plasmodium* spp.

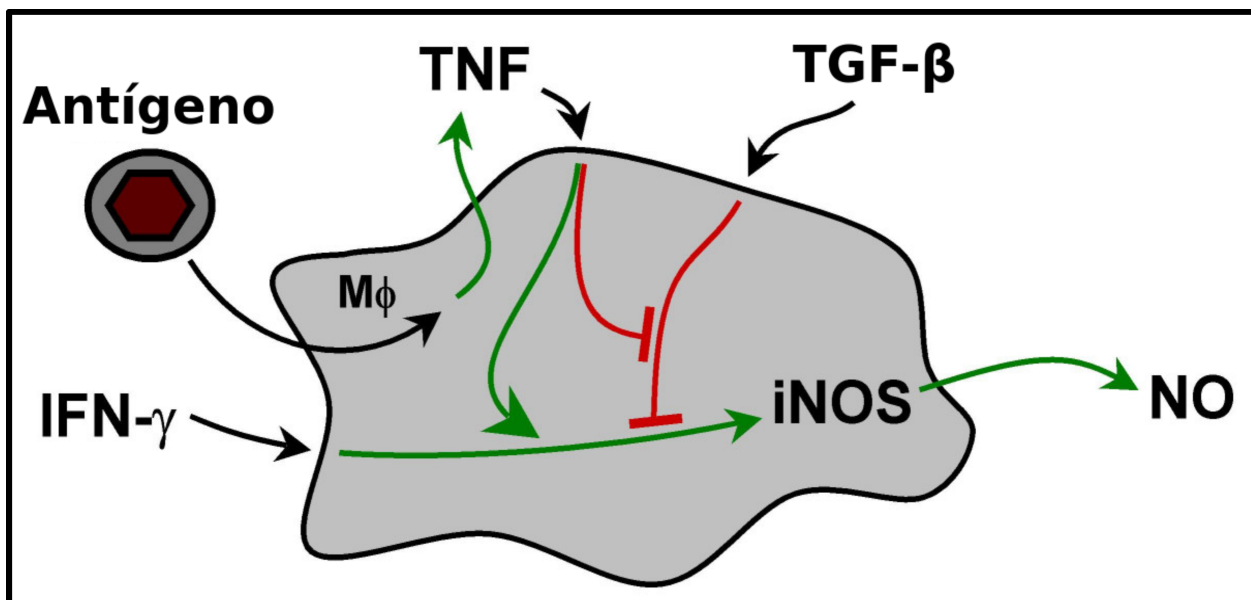


Esquema 3 – Ciclo biológico de *Plasmodium* spp. Quando um mosquito do gênero *Anopheles* spp. fêmea pica o hospedeiro os esporozoítos existentes em suas glândulas salivares caem no tecido da pele e seguem para a corrente sanguínea. No fígado, infectam hepatócitos e se reproduzem assexuadamente. Posteriormente, estas células se rompem e liberam merozoítos que infectam eritrócitos, onde novamente se reproduzem assexuadamente. Após este processo, rompem a membrana celular e infectam outros eritrócitos em um ciclo regular. O ciclo se completa quando o sangue do hospedeiro é sugado por um mosquito não infectado, que suga os gametas do protozoário que se unem no tubo digestório do mosquito onde ocorre reprodução sexuada. No estômago do inseto ainda acontece reprodução assexuada e os parasitos resultantes, migram para as glândulas salivares do inseto de onde irão para a corrente sanguínea do próximo hospedeiro picado. Obtido de <http://rei.biblioteca.ufpb.br/>

2.2. Macrófago

Macrófagos possuem papel essencial no sistema imune, fagocitando e apresentando antígenos, liberando citocinas e interagindo com outras células de defesa (MURPHY *et al.*, 1994; VAZQUEZ–TORRES & BALISH, 1997; MARODI *et al.*, 1998) e desempenham um papel importante na regulação da inflamação. As respostas inflamatórias são iniciadas através da secreção de citocinas pró-inflamatórias e resolvidas através da fagocitose de células apoptóticas e necróticas. Muitas moléculas de sinalização, como TNF e TGF- β , estão envolvidas no processo de fagocitose de macrófagos (FENG & MAO, 2012). Na fagocitose, após a adesão da partícula à superfície do macrófago, ocorre a ingestão e formação do vacúolo fagocítico que, em geral, se funde com lisossomos. Enzimas lisossomais degradam o que se encontra no interior do fagolisossoma (BUCHI & DE SOUZA, 1993).

A ativação de macrófagos pode ser definida como sendo a aquisição de novas moléculas e capacidades celulares que são requeridas na execução das complexas funções associadas à ativação (OHMORI & HAMILTON, 1994), funções essas que o macrófago residente não realiza. Normalmente, a ativação de macrófagos é uma propriedade adquirida por essas células após a exposição a um estímulo, como interferon-gamma (INF- γ) em conjunto com lipopolissacarídeo (LPS). Até tempo atrás, macrófagos ativados eram definidos como sendo células que secretavam mediadores inflamatórios e eliminavam patógenos intracelulares. Atualmente, macrófagos ativados podem ser determinados como um grupo de células bem mais heterogêneo, com fisiologias diferentes e que executam funções imunológicas distintas (MOSSER, 2003). O esquema 4 demonstra como funciona a sinalização para a ativação de macrófagos.



Esquema 4 – Sinalização que ativa macrófago (Mφ) levando a produção de óxido nítrico (NO). Quando Mφ residente é ativado com IFN-γ ocorre expressão da NO sintase induzida (iNOS) responsável pela produção de NO. Quando Mφ ativado entra em contato com antígeno, produz TNF que por sinalização autócrina colabora com a ativação de Mφ que causa expressão de iNOS e inibe a via de TGF-β que, por sua vez, inibe a expressão de iNOS (adaptado de ELLERMANN-ERIKSEN, 2005).

A morfologia celular do macrófago varia conforme os diferentes estados funcionais. Após o processo de ativação, ocorre mudança na morfologia de macrófagos, adquirindo núcleo maior e eucromático, habilidades para aderir e espalhar-se em substratos, aumento da capacidade de proliferação, de fagocitose, de fusão de lisossomos com vacúolos endocíticos (NORTH, 1978) e de produção de NO, que está diretamente relacionado com a expressão da iNOS (VESPA *et al.*, 1994). Sabe-se também que a ativação dos macrófagos está relacionada à resposta imunológica inata ou específica, na qual o antígeno é apresentado a linfócitos T que secretam citocinas, como IFN-γ, que estimulam os macrófagos a ativar o arsenal antimicrobiano (BORDEN *et al.*, 2007).

2.3. iNOS e o Óxido Nítrico

Os radicais livres gasosos compõem um grupo de agentes intracelulares que têm sido relacionados a vários processos fisiológicos. Dentre eles está o NO, um gás de meia-vida curta, menos de 30 segundos, produzido pela atividade de enzimas denominadas sintases do NO (NOS) que podem ser classificadas em três tipos: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) ou induzível (iNOS) (ROSSELLI *et al.*, 1998).

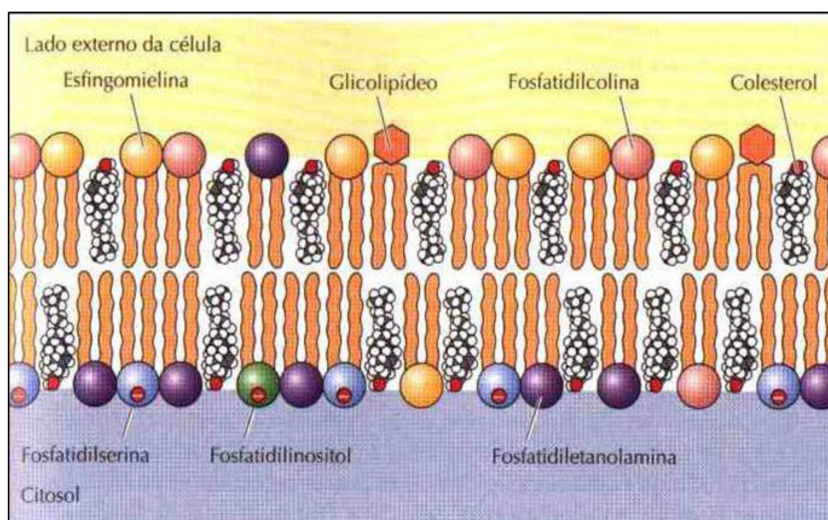
O NO é um gás inorgânico que foi identificado inicialmente como um poluente atmosférico. No entanto, estudos posteriores demonstraram que esse gás é solúvel em água e capaz de se difundir através de membranas biológicas (IGNARRO, 2000), tornando esta molécula um interessante alvo de estudos. Alguns dos primeiros relatos do NO na fisiologia provêm de estudos com o endotélio vascular, nos quais se demonstrou que este radical era o responsável pela dilatação dos vasos sanguíneos (PALMER *et al.*, 1987).

Atualmente, o NO é descrito como uma das principais moléculas de sinalização extra e intercelular presentes no organismo (IGNARRO, 2000). Tanto o NO quanto as espécies reativas do oxigênio geradas a partir desse radical livre reagem com uma variedade de biomoléculas como o ácido desoxirribonucleico (DNA), fatores de transcrição, enzimas, citocinas e receptores de membrana, exercendo ou mediando uma variedade de funções fisiológicas e patológicas (ROSSELLI *et al.*, 1998). Dentre algumas das funções atribuídas ao NO, inclui-se sua participação no sistema imunológico, no qual a alta produção de NO e derivados tem papel fundamental na destruição de agentes patológicos (WEI, 1995).

A identificação das enzimas ativas produtoras de NO, no ambiente celular significou um avanço extremamente importante para a comprovação dos efeitos biológicos exercidos pelo NO. Macrófagos de camundongo ativados com IFN- γ em combinação com LPS expressam a enzima iNOS (STUEHR & MARLETTA, 1987). O NO é uma molécula muito instável e gera como produto final íons nitrito e nitrato que quando quantificados refletem a taxa de produção de NO (MOSHAGE, 1995).

2.4. Fosfatidilserina e Interação Parasito-Célula

PS é um fosfolipídio constituinte de diversos tipos de membranas celulares e em células de mamíferos representa de 2 a 10% do total de fosfolipídios de membrana (WEI, 1995). Esta porcentagem varia de acordo com o tecido e tipo celular (VANCE & STEENBERGEN, 2005). Em células normais, esta molécula está voltada para a face interna da bicamada lipídica (Esquema 5), enquanto que durante a morte celular por apoptose a PS é translocada para a parte extracelular da bicamada lipídica (MARTIN *et al.*, 1995).



Esquema 5 – Membrana de células eucarióticas. Normalmente fosfatidilserina está voltada para o lado interno da célula e quando externalizado indica morte celular. Obtido de <http://www.institutounipac.com.br/>

A exposição da PS na superfície da membrana plasmática é o principal evento indicador de apoptose. Esta exposição está envolvida na sinalização de TGF- β e indução à resposta anti-inflamatória durante a fagocitose de células apoptóticas (FREY & GAJPL, 2011). Ao expor PS alguns parasitos se utilizam de um mecanismo denominado “mimetismo apoptótico”, reproduzindo assim a sinalização empregada por células em processo de apoptose, inibindo a resposta inflamatória do macrófago (BARCINSKI *et al.*, 2003).

Amastigotas (BALANCO *et al.*, 2001; WANDERLEY *et al.*, 2006) e promastigotas (TRIPATHI & GUPTA, 2003; WANDERLEY *et al.*, 2009) de *L. amazonensis* expõem PS do lado externo da membrana plasmática mimetizando célula apoptótica, induzindo a produção de mediadores anti-inflamatórios possibilitando a sobrevivência do parasito dentro da célula hospedeira. Em 1996, Moreira *et al.*, demonstraram que promastigotas de *L. amazonensis* sofrem apoptose ao sofrerem choque térmico e devido a este choque, apresentam atributos de uma célula em apoptose, tais como fragmentação da cromatina e clivagem de DNA. Além disso, amastigotas de *L. amazonensis* isoladas de lesões cutâneas de camundongos expõem PS na sua superfície e ainda sim, se apresentam viáveis e infectivos, o que sugere que não estão em processo apoptótico (BALANCO *et al.*, 2001). Essa exposição é fundamental para garantir que tais parasitos consigam utilizar macrófagos como células hospedeiras e assim, se proliferar durante o processo infectivo (LÜDER *et al.*, 2010).

A exposição de PS na superfície celular de *L. amazonensis* é considerado um fator de virulência, pois é fundamental para o reconhecimento destes parasitos por macrófagos e o bloqueio de PS nesse parasito reduz a internalização e multiplicação intracelular (BALANCO *et al.*, 2001). Outros protozoários parasitos também já foram descritos como possuindo tal mecanismo, como tripomastigotas (a forma infectiva do parasito) de *Trypanosoma cruzi* (DAMATTA *et al.*, 2007) e taquizoítos de *T. gondii* (SEABRA *et al.*, 2004). Tripomastigotas são a única forma de *T. cruzi* que expõe PS em sua superfície (DAMATTA *et al.*, 2007), isso reforça a provável importância de PS para o processo infectivo, uma vez que o reconhecimento deste fosfolípídeo também está relacionado à inibição da produção de NO em macrófagos, durante infecção por *T. cruzi*.

Dos Santos *et al.*, 2011 demonstraram que ambas as populações PS+ e PS- de *T. gondii* são necessárias para garantir a sobrevivência do hospedeiro e o sucesso da infecção, uma vez que apenas a população PS+ inibe a produção de NO e invade o macrófago através de penetração ativa, enquanto a população PS- invade o macrófago

através de mecanismos fagocíticos e em infecções com as populações isoladas, os hospedeiros morreram mais rapidamente.

Macrófagos de camundongos ativados com IFN- γ e LPS e infectados com taquizoítos de *T. gondii* têm a produção de NO inibido devido à redução da expressão da iNOS, via produção de TGF- β (SEABRA *et al.*, 2004). A possível exposição de PS na superfície de outros protozoários parasitos e seu efeito desativador em macrófagos por indução de TGF- β indica que este mecanismo de evasão pode ser uma característica comum de protozoários intracelulares.

2.5. Óxido nítrico e a malária murina causada por *P. chabaudi*

Os mecanismos do sistema imune que o hospedeiro utiliza para eliminar formas eritrocíticas do parasito da malária ainda necessitam de ser completamente elucidados. Apesar de mecanismos da imunidade, inata e adaptativa, parecerem envolvidos, existe a necessidade de mais esclarecimentos sobre o seu funcionamento (TAYLOR-ROBINSON *et al.*, 1993; FRITSCHÉ *et al.*, 2001). Alguns desses mecanismos regulatórios incluem a ativação de moléculas efetoras como o NO, que tem papel ativo na patogênese da malária, embora seu mecanismo de ação durante a doença ainda seja controverso (CLARK & COWDEN, 2003). Ainda de acordo com Clark & Cowden (2003), apesar da polêmica inicial sobre as múltiplas funções do NO de fagócitos humanos *versus* murinos, tem sido constatado que os genes e regiões promotoras da iNOS são extremamente semelhantes (CHARTRAIN, *et al.*, 1994; MACMICKING, *et al.*, 1997). Foi proposto que o NO produzido em excesso durante infecção por parasitos do gênero *Plasmodium* tem um efeito direto no controle da parasitemia por meio de danos oxidativos (MOHAN & STEVENSON, 1998).

Altos níveis dessa molécula durante infecção por *P. chabaudi* em camundongos também foram correlacionados com proteção contra a infecção (TAYLOR-ROBINSON *et al.*, 1993; STEVENSON, *et al.*, 2004). Embora não haja dúvida de que o NO é produzido durante a infecção por *Plasmodium*, o papel exato desse gás durante a fase eritrocítica tem sido questionado (TAYLOR-ROBINSON & SMITH, 1999; VAN DER

HEYDE, *et al.*, 2000). Ademais, dados que apoiam a ação de eliminação do parasito por essa molécula são frequentemente conflitantes (MOHAN & STEVENSON, 1998). Essa molécula tem importante papel imunorreguladora e está diretamente envolvida na patogênese da malária, por exemplo, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (MOHAN & STEVENSON, 1998).

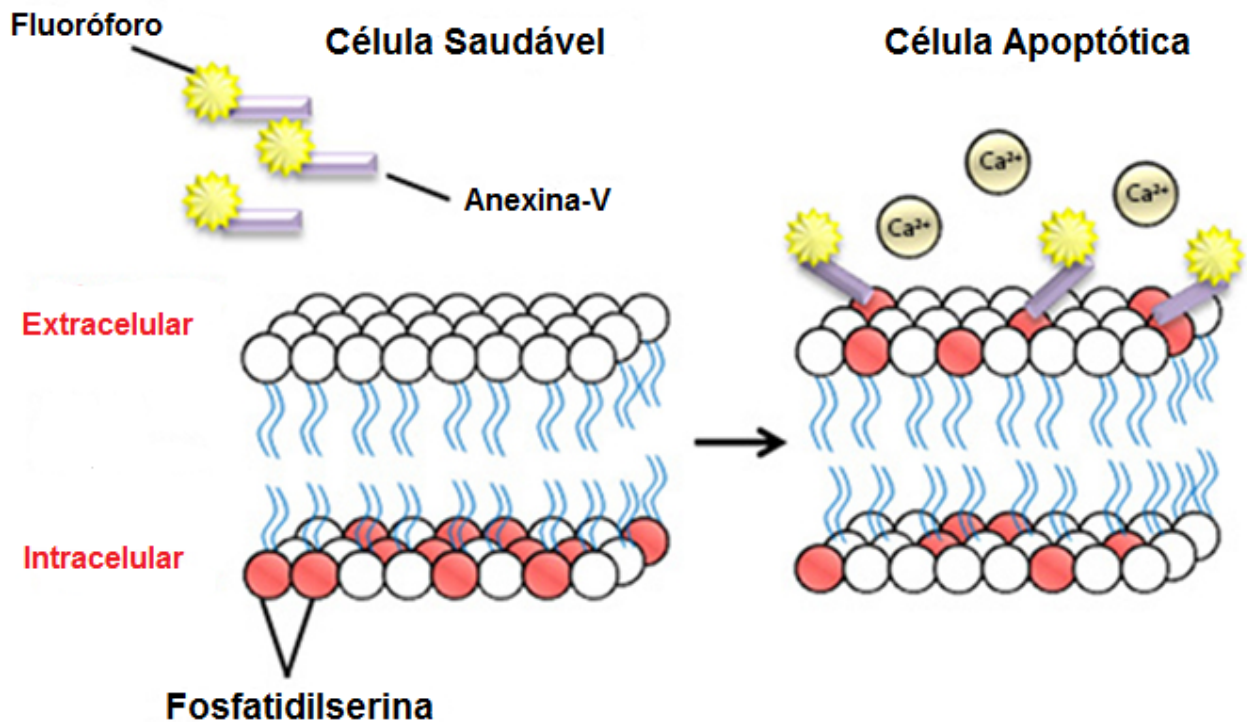
Estudos demonstraram que os níveis de NO não tem efeito na eliminação de formas eritrocíticas de *P. chabaudi* (STEVENSON, *et al.*, 1995; YONETO, *et al.*, 1999; VAN DER HEYDE, *et al.*, 2000), contrastando com resultados de Taylor-Robinson *et al.* (1993). Legorreta-Herrera *et al.* (2011) sugerem que tais resultados controversos se devem, provavelmente, ao uso de diferentes linhagens de camundongos para estudo da patologia.

2.6. Apoptose e Autofagia

A morte celular por apoptose foi definida em 1972 por apresentar morfologia distinta da morte celular por necrose (KERR *et al.*, 1972). A morte celular por apoptose é morfologicamente caracterizada pela diminuição do tamanho celular, condensação da cromatina com posterior fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos que mantêm a integridade de membrana, impedindo o extravasamento de proteínas e exposição de PS consequentemente evitando a inflamação (PLATT *et al.*, 1998).

As células apoptóticas normalmente exibem modificações bioquímicas. Um fator característico de apoptose é a hidrólise das proteínas envolvendo a ativação de vários membros de uma família de cisteíno-proteases chamadas caspases. Caspases ativadas clivam proteínas celulares vitais, afetando o citoesqueleto (ISRAELS & ISRAELS, 1999). Além disso, as caspases ativam endonucleases, que são enzimas que degradam o DNA. Durante a apoptose a externalização de PS é crucial para o reconhecimento precoce das células apoptóticas por macrófagos e células vizinhas, resultando na fagocitose antes da liberação dos conteúdos celulares que induzem inflamação (PLATT *et al.*, 1998). O esquema 6 mostra que a PS exposta pode ser identificado por citometria de fluxo pela marcação com Anexina-V na presença de cálcio

(KOOPMAN *et al.*, 1994).



Esquema 6 – Identificação de células expondo fosfatidilserina (apoptóticas) através de marcação usando anexina-v. A anexina-v, quando em tampão contendo cálcio, tem forte afinidade por fosfatidilserina. Usando anexina-v conjugada com um fluoróforo é possível determinar células que estão expondo esse fosfolípídeo. Traduzido de Rieger *et al.* (2005).

A autofagia é um processo catabólico conservado evolutivamente de degradação e reciclagem de componentes celulares (LEVINE & DERETIC, 2007). Ainda de acordo com Levine e Deretic (2007), a autofagia é descrita como sendo induzida devido à falta de nutrientes e oxigênio. Entretanto, podem haver a ocorrência de outros sinais pró-autofágicos como a presença de toxinas extracelulares, compostos citotóxicos, presença de organelas ou proteínas danificadas e proteínas de longa vida (CLARK & COWDEN, 2003). A autofagia é um processo nos quais materiais citoplasmáticos intracelulares são transportados envoltos por membranas autofagossômicas aos

lisossomas para degradação (LEVINE & DERETIC, 2007). Estudos têm sido realizados com a finalidade de desvendar os processos relacionados aos mecanismos de evasão de diversos parasitos protozoários, e entender a sua interação com as células hospedeiras. Muitos parasitos do filo apicomplexa como *T. gondii* (SEABRA, *et al.*, 2004) têm mecanismos similares de fuga do sistema imune.

3. Objetivos

3.1. Objetivos gerais

Analisar a interação das subpopulações PS+ e PS- de *P. chabaudi* separadamente *in vitro* em macrófagos peritoneais de camundongo ativados, verificando a ocorrência ou não do mecanismo de evasão “mimetismo apoptótico” nesse parasito.

3.2. Objetivos específicos

- Realizar a análise morfológica de macrófagos ativados após interação com subpopulações PS mistas e isoladas de *P. chabaudi*;
- Avaliar a expressão da enzima iNOS durante a interação de macrófagos ativados com as subpopulações isoladas de *P. chabaudi*;
- Avaliar o tipo de morte celular que macrófagos ativados sofrem durante a interação com subpopulações mistas e isoladas de *P. chabaudi*.

4. Materiais e métodos

4.1. Obtenção de formas eritrocíticas de *Plasmodium chabaudi*

Os parasitos intraeritrocíticos de *P. chabaudi* (cepa AJ) foram mantidos por inoculação de 1×10^3 parasitos na cavidade peritoneal de camundongos Balb/c durante período de 5 dias. Após este período, a parasitemia era de cerca de 80%. O sangue foi retirado dos animais por punção cardíaca usando seringa de 1 ml com 0,2 ml de citrato de sódio a 3,7% em água, obtendo um volume final de 0,8 ml por animal. Os parasitos foram purificados adaptando protocolo descrito por Orjih (2008). O sangue retirado de quatro animais foi centrifugado a 500g por 10 min, sobrenadante descartado e ao precipitado foi adicionado 5 ml de 0,015% de saponina (Sigma-Aldrich) em tampão fosfato-salino, pH 7.2, (PBS) e incubados por 30 min em gelo. A solução foi centrifugada a 800g por 10 min, e ao precipitado adicionado solução de saponina; esse processo se repetiu por mais 2 vezes. O precipitado final foi lavado 3 vezes com meio Eagle modificado por Dulbeccus (DMEM). Após esse processo obteve-se parasitos purificados dos eritrócitos.

4.2. Isolamento das subpopulações de parasitos PS+ e PS-

As subpopulações PS+ de formas sanguíneas de *P. chabaudi* foram obtidas adaptando o protocolo para taquizoitos de *T. gondii* (Dos Santos *et al.*, 2011). Os parasitos foram incubados com anexina-v conjugada com microesferas magnéticas (Milteyi Biotec) em tampão de cálcio (10 mM Hepes, 140mM NaCl, 5mM CaCl_2). Depois de 40 min a temperatura ambiente, a suspensão de células foi adicionada a uma coluna magnética, que reteve a subpopulação PS+, a coluna foi lavada com tampão de cálcio, removendo a população PS- e, logo após, retirada do campo magnético proporcionado pelo ímã e novamente eluído com tampão de cálcio removendo a subpopulação PS+. As duas subpopulações foram coletadas separadamente e preservadas. Devido à alta

taxa de parasitos PS+ essa subpopulação teve a PS bloqueada com anexina-v mimetizando a população PS-.

4.3. Avaliação da exposição da fosfatidilserina por citometria de fluxo

As subpopulações dos parasitos isoladas foram incubadas por 30 min com Anexina V-Alexa Fluor 488 ($1 \mu\text{g}/10^5$ células) e iodeto de propídio (PI) ($1 \mu\text{l}$ de solução a $10 \mu\text{g}/\text{ml}$). Depois da incubação, foi realizada a leitura no citômetro de fluxo FACScalibur. Os resultados foram analisados no programa WinMdi.

4.4. Obtenção de macrófagos peritoneais

Macrófagos foram obtidos por lavagem peritoneal de camundongos Balb/c com 5 ml de DMEM acidificado ($\text{pH}=4$). Os macrófagos foram contados em câmara de Neubauer e 1×10^4 plaqueados sobre lamínulas de vidro em placas de 24 poços. Após 1 h de aderência a 37°C , as células foram lavadas com PBS a 37°C e cultivadas com DMEM contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) a 37°C , em atmosfera com 5% de CO_2 .

4.5. Ativação de macrófagos peritoneais e interação com parasitos

Macrófagos foram ativados com 50 U/ml de INF- γ recombinante de camundongo (Sigma-Aldrich). Logo após a aderência, os macrófagos foram ativados e 24 h depois usados para as interações. As células foram lavadas e os parasitos purificados colocados na proporção de 10:1 parasitos por macrófago durante 1, 24 e 48 h de interação sem lavagem. O sobrenadante do cultivo foi coletado para análise dos níveis de NO após 24 e 48 h.

4.6. Microscopia eletrônica de varredura

Após 1, 24 e 48 h de interação, as lamínulas contendo as células foram submetidas ao fixador Karnovsky (formaldeído nascente 4%, glutaraldeído 2,5%,

tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7.4), lavadas com tampão cacodilato de sódio, pós-fixadas em solução contendo 1% de tetróxido de ósmio em tampão cacodilato de sódio e desidratadas com acetona, em concentrações seriadas de 30%, 40%, 50%, 70% e 100%. Após desidratação as amostras foram secas pelo método do ponto crítico e recobertas com ouro através de metalização (25 nm). As amostras foram observadas no microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6490LV na UEZO.

4.7. Microscopia eletrônica de transmissão

Macrófagos de 4 animais foram cultivados usando garrafa de cultura de 25 cm² como acima, sendo posteriormente plaqueados em lamínulas de vidro em placa de 24 poços. A infecção foi feita na mesma proporção de parasitos por macrófago e mesmo tempo descrito acima. A fixação foi realizada como no item 4.6. As amostras foram lavadas com tampão cacodilato de sódio e pós-fixadas por 1 h com solução contendo 1% de tetróxido de ósmio, 1,6% de ferricianeto de potássio e 5mM de cloreto de cálcio em tampão cacodilato de sódio. As amostras foram desidratadas com acetona, em concentrações seriadas de 30%, 40%, 50%, 70% e 100%. A inclusão foi feita com resina epóxi que foi polimerizada por 48 h a 60° C. Seções de 80 nm de espessura foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão FEI SPIRIT 120 Kvolts na UEZO.

4.8. Avaliação da produção de óxido nítrico

A produção de NO foi avaliada indiretamente pela leitura colorimétrica do nitrito nos diferentes sobrenadantes das culturas através do reagente de Griess. Os sobrenadantes foram misturados na proporção de 1:1 com o reagente de Griess (1 volume de 1 % de sulfanilamida em 5 % de ácido ortofosfórico em água deionizada com volume igual de 0,1 % de N-[1-Naphthyl] Ethylenediamina em água deionizada). Após 10 min, a mistura foi analisada em leitor de microplaca a 540 nm de absorbância e a quantificação da produção de NO baseada nas leituras da curva padrão que foi feita com quantidades de nitrito de sódio definidas diluídas em DMEM.

4.9. Avaliação da expressão de iNOS em macrófagos infectados com *Plasmodium chabaudi*

Após interações de subpopulações de *P. chabaudi* PS+ por anexina-v com macrófagos ativados a expressão da iNOS foi avaliada por imunofluorescência. As células foram fixadas com formaldeído 4% em tampão PHEM (60 mM Pipes, 20 mM Hepes, 10 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 70 mM KCl), pH 7.2, permeabilizadas com 5% de Triton X-100 em PHEM, incubadas com cloreto de amônio 50mM e com 3% de Soro Albumina Bovina (BSA) em tampão PHEM. As células foram incubadas com o anticorpo anti-iNOS feito em coelho (diluição 1:100 em PHEM contendo BSA), por 1 h, lavadas 3 vezes com PHEM e incubadas com anticorpo secundário anti-rabbit conjugado com Alex 488 (Molecular probes) por 1 h, as células foram lavadas com tampão PHEM e montadas com ProlongGold com DAPI (Invitrogen) e observadas no microscópio óptico confocal a laser (LSM 710 Quasar Zeiss) da UEZO.

4.10. Infecção in vivo

Parasitos PS+ foram separados em dois grupos com a mesma quantidade. O primeiro grupo foi incubado com tampão de cálcio em temperatura ambiente durante 1 h, enquanto o segundo grupo foi incubado com tampão de cálcio e anexina-v (1µg/10⁵ células) pelo mesmo tempo bloqueando a PS desse grupo. Cada camundongo Balb/c foi inoculado com 10³ parasitos em tampão de cálcio na cavidade peritoneal. Foram utilizados 5 camundongos para cada grupo de parasito. Esse projeto foi submetido ao Comitê de Ética da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro em 18 de dezembro de 2015, ID 645487.

4.11. Microscopia óptica de campo claro

Após 4 e 7 dias pós-infecções, 20 µl de sangue de cada camundongo foi retirado da cauda e realizado esfregaço sanguíneo em lâmina de vidro. O esfregaço foi corado com panótico rápido e observado em microscópio óptico Axioplan – ZEISS na UEZO.

5. Resultados

5.1. Análise da expressão de PS pela população eritrocítica de *Plasmodium chabaudi*

Cerca de 90% da população eritrocítica de *P. chabaudi* purificada com saponina expõe PS (Figura 1 A, B, C). Essa subpopulação não marcou com PI indicando que os parasitos estavam viáveis (Figura 1 B, C).

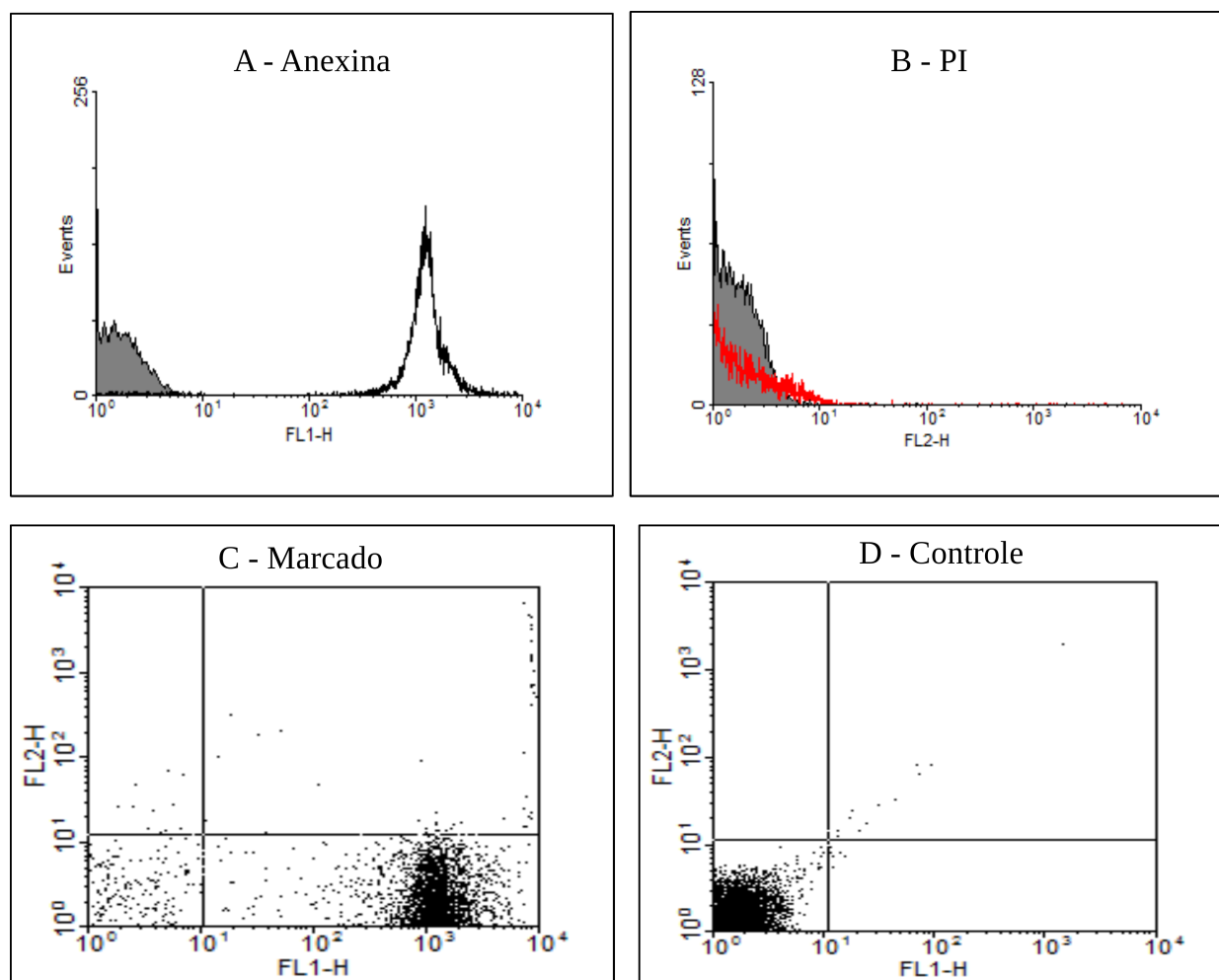


Figura 1 – A população de *Plasmodium chabaudi* isolada de eritrócitos expõe fosfatidilserina. A. Histograma mostrando marcação com anexina-v (eixo x) de parasitos; 90% da população de *P. chabaudi* expõe PS. B. Viabilidade dos parasitos através de marcação com iodeto de propídio (PI). C. Dot plot dos parasitos mostrando marcação por anexina v (eixo x) e PI (eixo y). Note a alta exposição de PS pelos

parasitos e a grande viabilidade. D. População de parasitos não marcados com anexina-V e PI (controle).

5.2. Microscopia eletrônica de varredura de *Plasmodium chabaudi* com macrófagos peritoneais de camundongos ativado

Análise ultraestrutural mostrou que após 1 h da interação (Figura 2 A, B) foi possível visualizar o parasito fora do vacúolo parasitóforo. Depois de 24 h (Figura 2 C, D) e 48 h (Figura 2 E, F) de interação com o parasito foi possível notar retração citoplasmática dos macrófagos e em 48 h evidentes protuberâncias arredondadas (blebs) na superfície das células (Figura 2 E, F).

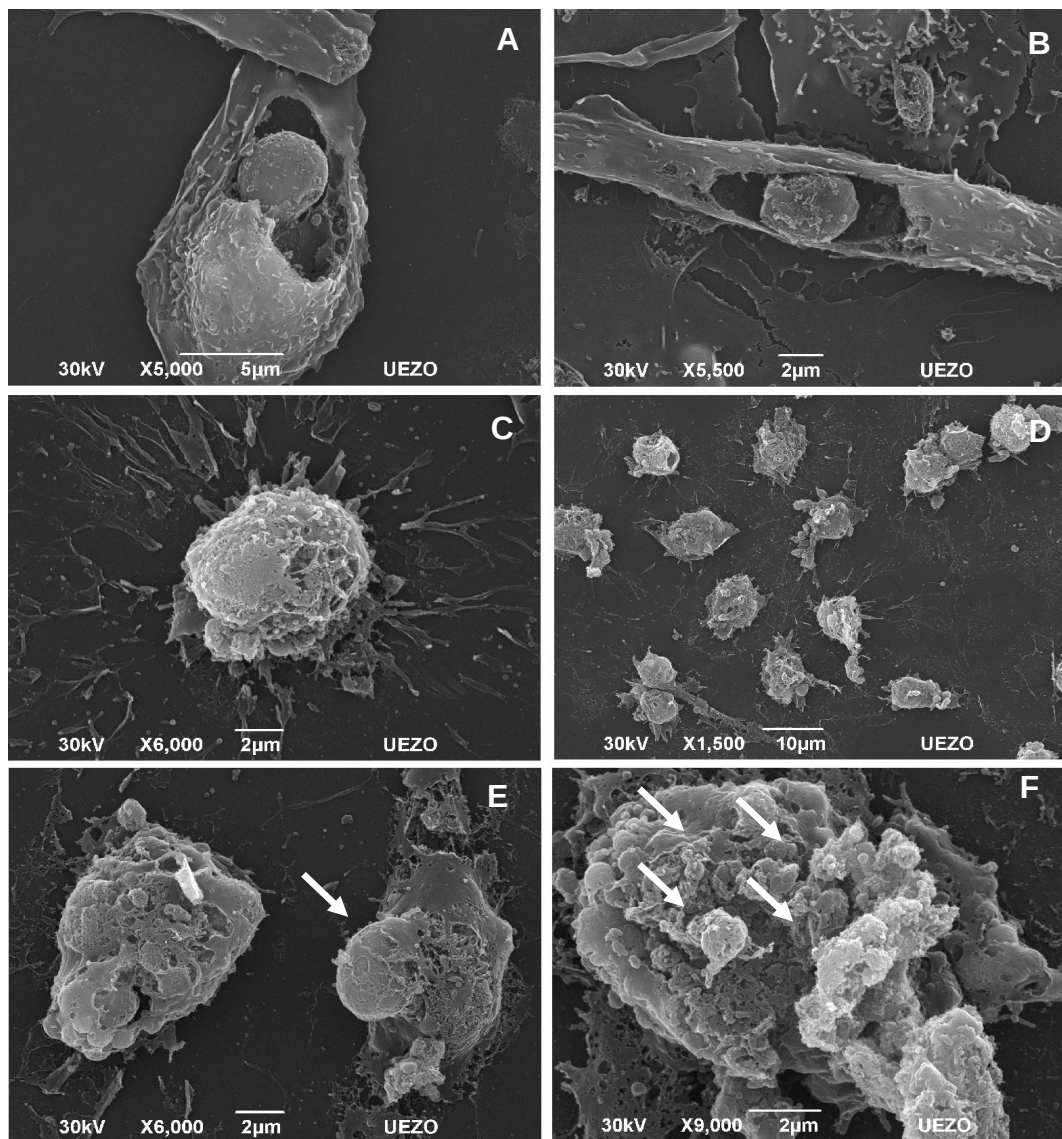


Figura 2 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura da interação de *Plasmodium chabaudi* com macrófagos ativados após 1, 24 e 48 h. A e B. Imagens após 1 h de interação. Pode-se notar que o parasito se encontra fora do vacúolo parasitóforo. Em C e D (24 h) e E e F (48 h) nota-se retração citoplasmática dos macrófagos e em E e F protuberâncias arredondadas (setas).

5.3. Microscopia eletrônica de transmissão de *Plasmodium chabaudi* com macrófagos peritoneais de camundongo ativados

A análise da interação protozoário-célula com 24 h mostrou a presença de vesículas lipídicas e figuras de mielina no citoplasma de macrófagos (Figura 3).

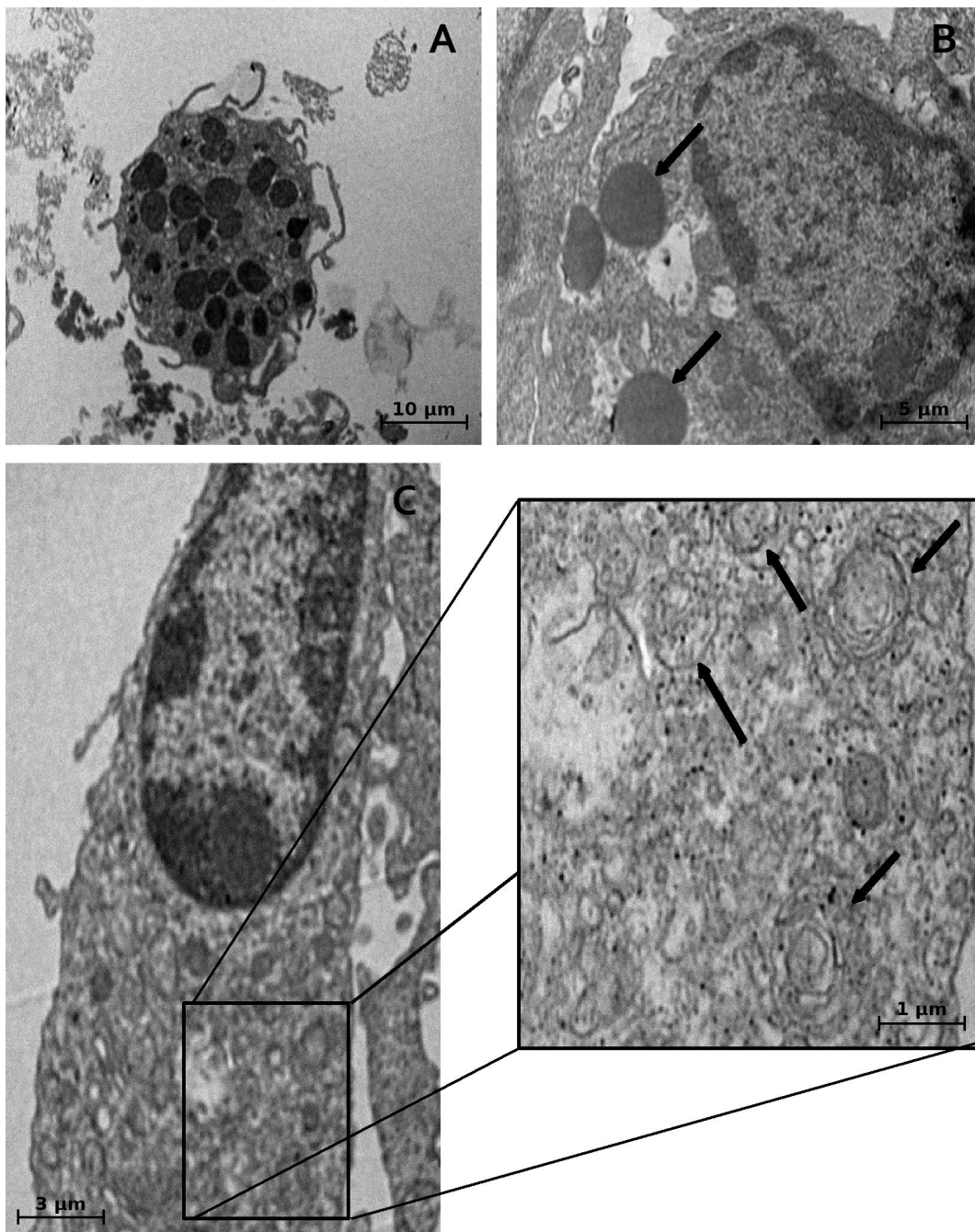


Figura 3 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos ativados após interação com *Plasmodium chabaudi*. A e B. Vesículas lipídicas foram observadas no macrófago (setas). C. Estruturas similares a figuras de mielina (*insert*, setas) podem ser vistas nos macrófagos.

5.4. Produção de óxido nítrico no sobrenadante de cultura após interações de *Plasmodium chabaudi* com macrófagos ativados

Análise da quantidade de nitrito presente nos sobrenadantes de macrófagos ativados não infectados (controle) mostrou alta produção de NO após 24 e 48 h de cultivo (Figura 4). Após 24 h de interação com o parasito houve redução drástica de produção de NO de macrófagos infectados sendo praticamente total com 48 h (Figura 4). A interação de macrófagos ativados com *P. chabaudi* com PS bloqueado por anexina-V apresentou produção de NO similar ao controle (Figura 4).

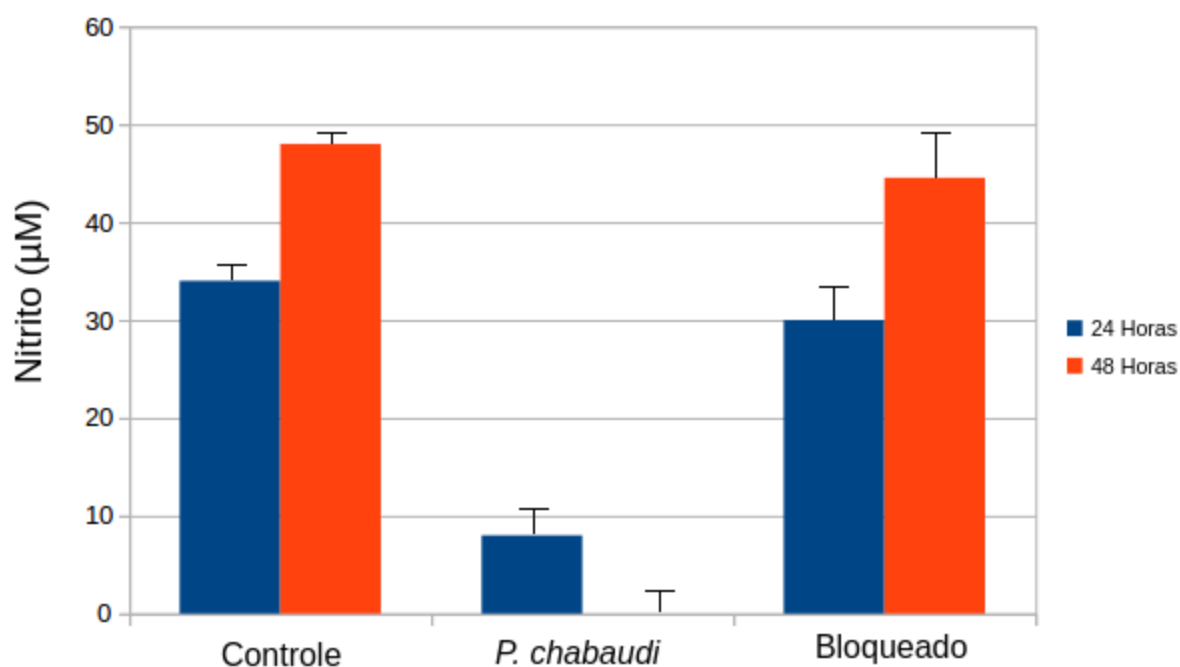


Figura 4 – Dosagem de nitrito em sobrenadante de cultura de macrófagos ativados após interações de populações de *Plasmodium chabaudi* fosfatidilserina positiva e de fosfatidilserina bloqueada. Controle. Níveis de nitrito produzido por

macrófagos sem interação com parasito. *P. chabaudi*. Níveis de nitrito produzido por macrófagos após 24 e 48 h de interação. Clara inibição da produção de nitrito pôde ser detectada após 24 h e inibição total após 48 h. Bloqueado. Níveis de nitrito de macrófagos que interagiram com *P. chabaudi* com a PS exposta bloqueada com anexina-v. Note que os níveis de nitrito produzidos são similares ao controle.

5.5. Expressão da iNOS após interação de *Plasmodium chabaudi* com macrófagos ativados

A análise da expressão da enzima iNOS durante interação de *P. chabaudi* com macrófagos ativados mostrou que após 1 h (Figura 5 A, B) de interação com o parasito macrófagos apresentaram alta expressão de iNOS (verde). Após 24 h de interação (Figuras 5 C, D) ocorreu clara diminuição da expressão de iNOS que se manteve após 48 h (Figuras 5 E, F).

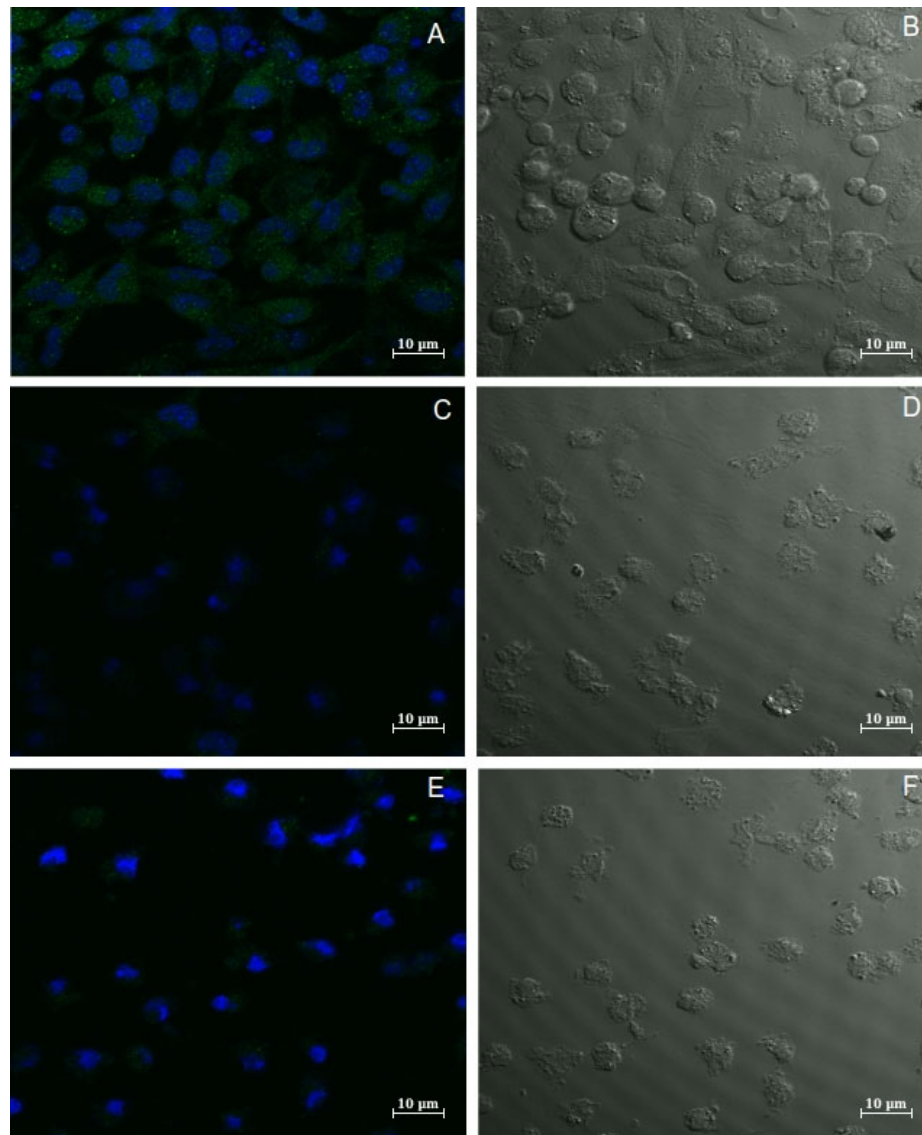


Figura 5 – Análise da expressão de iNOS por imunofluorescência e DIC de

macrófagos ativados após interação de 1, 24 e 48 h com *Plasmodium chabaudi*. A e B. Macrófagos ativados após interação de 1 h com *P. chabaudi*. Note expressão de iNOS. C e D. Macrófagos ativados após 24 h de interação com *P. chabaudi*. Note redução da expressão de iNOS. E e F. Macrófagos ativados após 48 h de interação com *P. chabaudi*. Note que a redução da expressão de iNOS persiste. Note que através de DIC (B, D e F), podemos notar retração citoplasmática nos macrófagos em tempos de 24 e 48 h, ao compararmos com o tempo de 1 h.

5.6. Curva de sobrevivência de camundongos após infecção com subpopulações de parasitos fosfatidilserina positiva e bloqueada com anexina-V

Animais infectados com o grupo de parasitos que tiveram PS bloqueada por anexina-v sobreviveram após 10 dias de infecção (Figura 6). Animais infectados com o grupo controle de parasitos (incubados apenas com tampão de cálcio) começaram a morrer com 5 dias e não sobreviveram por mais de 9 dias (Figura 6).

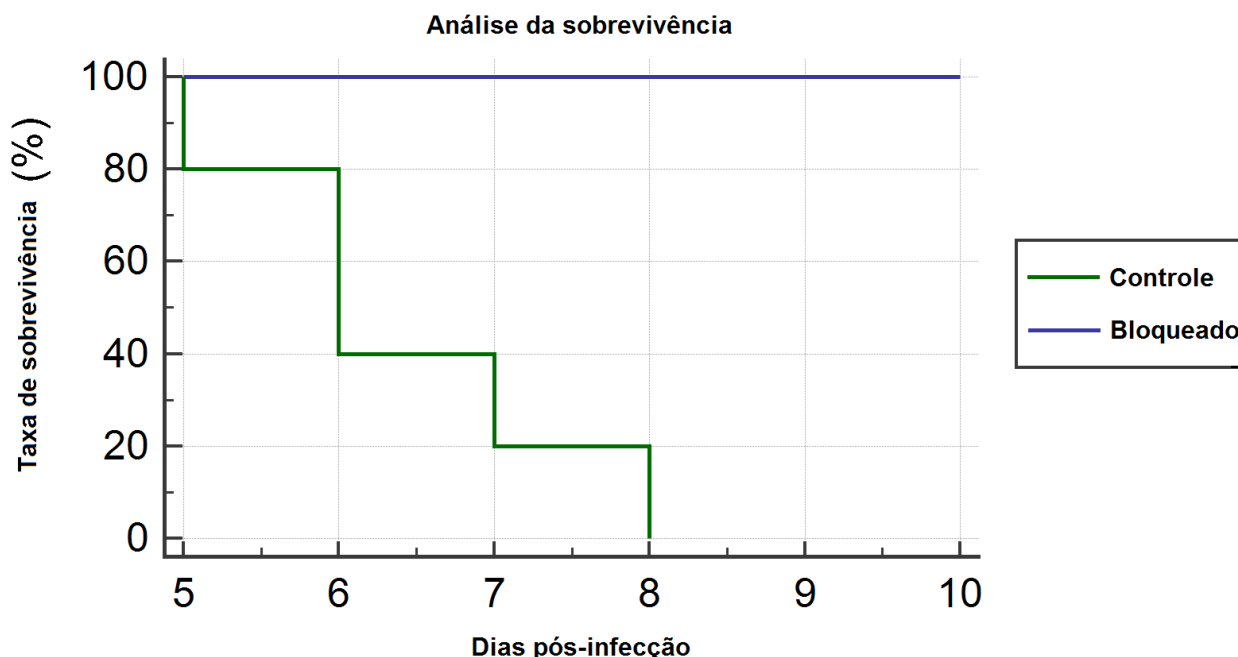


Figura 6 – Curva de sobrevivência de camundongos após infecção com parasitos

expondo fosfatidilserina (PS) ou bloqueada. Parasitos expondo PS purificados de eritrócitos foram divididos em dois grupos: um foi incubado com anexina-v em tampão de cálcio (bloqueado) e o outro (controle) apenas em tampão de cálcio. A infecção foi realizada em camundongos e a sobrevivência observada por 10 dias. Somente camundongos que receberam a subpopulação expondo PS (controle) morreram no período analisado.

5.7. Análise da infecção in vivo através de microscopia de campo claro

Esfregaços sanguíneos de camundongos infectados por 4 e 7 dias com a população de *P. chabaudi* que teve a PS bloqueada não apresentou sinais de parasitemia (Figura 7 A, B). Por outro lado, esfregaços sanguíneos de camundongos infectados por 4 e 7 dias com a população de *P. chabaudi* que não teve PS bloqueado apresentou parasitemia crescente (Figura 7 C, D).

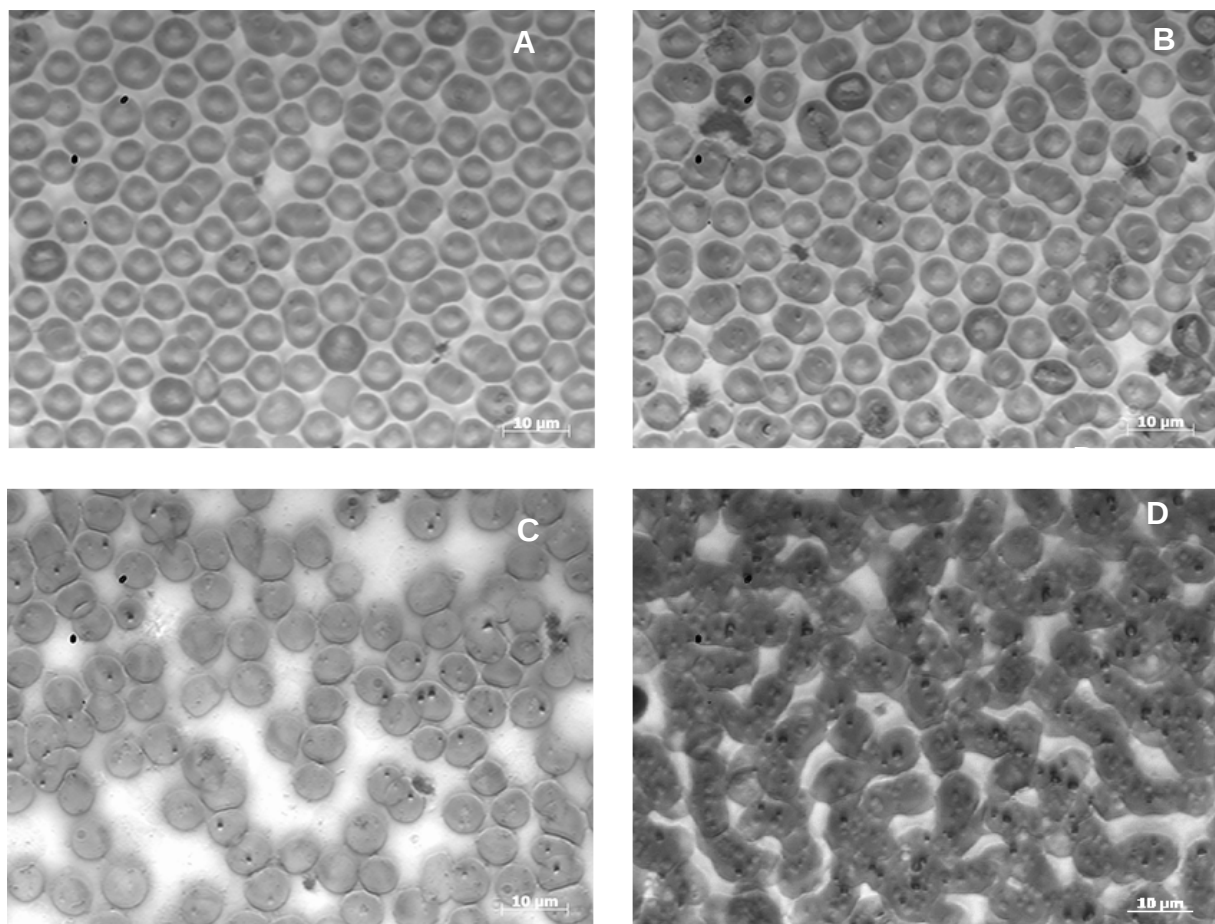


Figura 7 – Imagens por microscopia de campo claro de esfregações sanguíneas de camundongos infectados com parasitos fosfatidilserina positivos ou bloqueada após 4 e 7 dias. Parasitos expondo PS foram divididos em dois grupos: incubado com anexina-v em tampão de cálcio (bloqueado) e outro apenas em tampão de cálcio (controle). As duas subpopulações foram usadas para infectar camundongos. A e B. Esfregaços com parasitos PS bloqueada. C e D. Esfregaços com parasitos PS positivos. Avaliação da parasitemia após 4 dias (A e C) e 7 dias (B e D). Note que não são encontrados eritrócitos infectados em A e B e o aumento da parasitemia em C e D é evidente.

6. Discussão

A malária é importante problema de saúde pública para as nações em desenvolvimento (SNOW *et al.*, 2005), afetando mais de 100 países com aproximadamente 40% da população mundial exposta a infecção. *P. chabaudi* é excelente modelo para o estudo da malária humana, pois o mecanismo de infecção e os sintomas manifestados são similares. A alteração da composição de fosfolipídeos da capa lipídica da membrana celular durante apoptose é associada com a exposição de PS. A exposição de PS por parasitos viáveis e que não sofrem morte celular foi demonstrada em algumas espécies, incluindo *L. amazonensis* (BALANCO *et al.*, 2001; WANDERLEY *et al.*, 2006; 2009), *T. gondii* (DOS SANTOS *et al.*, 2011) e *T. cruzi* (DAMATTA *et al.*, 2007), o que nos leva a crer que o mimetismo apoptótico pode ser um mecanismo comum a diversos protozoários parasitos. Aqui, formas eritrocíticas de *P. chabaudi* foram purificadas e apresentaram alto grau de exposição de PS. Esses parasitos foram capazes de inibir a produção de NO e induzir morte celular em macrófagos após infecção *in vitro*. O bloqueio da PS dos parasitos reverteu a inibição de NO. Camundongos infectados com parasitos expondo PS morrem rapidamente, mas os infectados com parasitos com a PS bloqueada sobrevivem e apresentam parasitemia mínima ou inexistente. Coletivamente, esses resultados indicam que a PS exposta por *P. chabaudi* pode ter importante papel durante a infecção.

Adaptando o protocolo descrito por Orjih (2008) conseguimos isolar formas de *P. chabaudi* de eritrócitos de camundongos infectados. Diferentemente de outros trabalhos, usamos camundongos com altas taxas de infecção, pois com parasitemia elevada ocorre aumento da frequência de eritrócitos lisados pelo parasito. Os eritrócitos contendo os parasitos foram lisados com saponina e depois de lavagens foi possível isolar apenas o parasito. Este processo permitiu os estudos da exposição de PS e infecção subsequentes e, no futuro, auxiliará a determinação da exposição de PS dos diferentes estágios de *P. chabaudi* e de outras espécies de *Plasmodium*.

Foi determinado que 90% da população de *P. chabaudi* expôs PS mantendo a membrana plasmática íntegra indicando que os parasitos estavam vivos. Esse achado

aponta a possibilidade da ocorrência do mecanismo de mimetismo apoptótico por esse parasito, colocando mais um protozoário na lista dos que usam esse mecanismo. Esse processo é citado como sendo uma estratégia para evitar resposta imune e inflamatória do hospedeiro (BALANCO *et al.*, 2001; SEABRA *et al.*, 2004; WANDERLEY *et al.*, 2006; DOS SANTOS *et al.*, 2011). Em outros protozoários parasitos, no entanto, a relação entre a população PS+ e PS- costuma ser equilibrada, o que não ocorre com *P. chabaudi*. Tal ocorrência provavelmente garante alto índice de infectividade por *P. chabaudi*, e por isso, assim como em *L. amazonensis*, existe a possibilidade que a exposição de PS possa estar relacionada com a virulência da cepa analisada. É importante que a exposição de PS seja analisada em outra cepa desse parasito e em outras espécies, extendendo possivelmente o mimetismo apoptótico a outras espécies do gênero *Plasmodium*. Essa ação garantirá que o resultado descrito aqui não foi um artefato causado pelo processo de purificação que poderia induzir a exposição ou aumentar a exposição não pelo parasito em si, mas pela PS dos eritrócitos que podem ser captadas pelo parasito.

Neste trabalho, a fim de avaliar os efeitos da infecção *in vivo* com apenas uma das subpopulações de PS de *P. chabaudi* e devido a baixa quantidade de parasitos PS- realizamos o bloqueio da PS da subpopulação PS+ com anexina-v, mimetizando parasitos PS-. Em experimentos com a subpopulação PS+ (sem bloqueio) foi mostrado que *P. chabaudi* tem a capacidade de modular negativamente a produção de NO inibindo a expressão da iNOS nos macrófagos. Mecanismo semelhante já havia sido descrito em *T. gondii* (SEABRA *et al.*, 2004; DOS SANTOS *et al.*, 2011), no entanto, não havia sido demonstrado em *P. chabaudi*. Nos experimentos em que os parasitos tiveram PS bloqueado tal modulação não ocorreu, evidenciando o papel de PS no processo infectivo. Seabra *et al.* (2004) encontraram resultados similares estudando *T. gondii*, nos quais taquizoitos PS+ são capazes de modular a produção de NO e reduzir a expressão de iNOS, mas essa modulação não ocorre da mesma forma com taquizoitos PS-. Os resultados de inibição de NO apresentados aqui são reforçados pela expressão de iNOS. Em tempos de 1 h de interação a iNOS continua expressa. No

entanto, essa expressão foi modulada negativamente por *P. chabaudi* em tempos de 24 e 48 h. Esses resultados demonstram a capacidade de *P. chabaudi* purificado de eritrócito de regular a produção de NO em macrófagos via degradação de iNOS. Como 90% da população de *P. chabaudi* expôs PS, possivelmente macrófagos reconhecem esses parasitos como células mortas e induzem a produção de mediadores anti-inflamatórios, reduzindo a expressão de iNOS e produção de NO, possibilitando o sucesso da infecção.

Através da microscopia eletrônica de varredura foi possível observar após 1 h de interação o parasito fora do vacúolo parasitóforo, sugerindo evasão do processo de fagocitose dos macrófagos ativados. Após 24 h de interação observou-se retração citoplasmática nos macrófagos. Além disso, após 48 h de interação, foi possível observar protuberâncias arredondadas (*blebs*) na superfície das células. Durante a apoptose o citoesqueleto da célula é degradado por caspases (GRIVICICH *et al.*, 2007) possibilitando a geração de protuberâncias na membrana celular. Tais protuberâncias se separam da célula, levando uma porção do citoplasma e geralmente parte do núcleo e são conhecidas como “corpos apoptóticos” (WICKMAN *et al.*, 2013). As células vizinhas e as fagocíticas profissionais internalizam os corpos apoptóticos reciclando seus componentes (VERMEULEN, *et al.*, 2005). Tanto a retração citoplasmática como a geração das protuberâncias da membrana são indicadores de morte celular programada por apoptose (GRIVICICH *et al.*, 2007), o que indica que os macrófagos estão possivelmente sofrendo esse tipo de morte celular induzida pela infecção do parasito purificado. No entanto, imagens de corpos de mielina no citoplasma dos macrófagos foram observadas por microscopia eletrônica de transmissão. Corpos mielínicos indicam autofagia (LIU *et al.*, 2015). Portanto, esse tipo de morte celular pode estar sendo induzida também pela infecção dos parasitos. Análises quantitativas de morte celular serão feitas para determinar qual tipo de morte celular é induzida por essa infecção.

A fim de verificar a importância de PS no processo infectivo *in vivo* parasitos tiveram esse fosfolípido bloqueado. Camundongos foram infectados com parasitos com

a PS bloqueada e livre e a sobrevivência avaliada. Camundongos infectados com parasitos expondo PS morreram entre 5 e 8 dias e apresentaram altas parasitemias. No entanto, camundongos que foram inoculados com parasitos com a PS bloqueada não desenvolveram parasitemia e não morreram mesmo após 10 dias de infecção. Tal resultado reforça a importância de PS no processo infectivo de *P. chabaudi*. Possivelmente os parasitos PS+ inoculados no peritônio dos camundongos foram avidamente fagocitados e escaparam da ação microbicida dos macrófagos, perpetuando a infecção e levando a alta parasitemia e morte dos camundongos. Já os parasitos com a PS bloqueada foram fagocitados e, devido a PS bloqueada, não escaparam da ação microbicida dos macrófagos, sendo, possivelmente, destruídos logo no início da infecção. Uma cinética da infecção analisando a morfologia das células do lavado peritoneal pode revelar se houve de fato destruição da subpopulação de parasitos com a PS bloqueada ainda nos macrófagos do peritônio; uma análise das citocinas presentes no lavado peritoneal também auxiliará na interpretação desse resultado.

7. Conclusões

Plasmodium chabaudi foi capaz de induzir morte celular em macrófagos, inibir a expressão da enzima iNOS e consequentemente, modular a produção de NO de macrófagos em experimentos *in vitro*. Somente a subpopulação PS+ do parasito foi capaz de realizar tal modulação, o que leva a crer que tal habilidade está intimamente relacionada com a exposição de PS. A análise *in vivo* da infecção mostrou que PS possivelmente foi essencial para o processo infectivo do parasito, uma vez que após seu bloqueio houve redução drástica da parasitemia e os animais sobreviveram pelo tempo de 10 dias. Esse trabalho suporta que o conceito de mimetismo apoptótico se aplica em *P. chabaudi*, sugerindo que PS é uma molécula essencial para garantir a infecção do parasito nos hospedeiros sendo peça-chave, pois possivelmente induz no sistema imune do hospedeiro resposta anti-inflamatória, desabilitando a capacidade microbicida de macrófagos.

8. Referências bibliográficas

- BAIRD, J.K. Resistance to therapies for infection by *Plasmodium vivax*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 22, n. 3, p. 508-534, 2009.
- BALANCO, J.M.F., MOREIRA, M.E.C., BONOMO, A.C., BOZZA, P.T., AMARANTE-MENDES, G., PITMEZ, C., BARCINSKI, M.A. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. **Curr. Biol.**, v. 11, n. 23, p. 1870-1873, 2001.
- BARCINSKI, M.A., MOREIRA, M.E.C., BALANCO, J.M.F., WANDERLEY, J.L.M., BONOMO, A.C. The role of apoptotic mimicry in host-parasite interplay: is death the only alternative for altruistic behavior? **Kinetop. Biol. Dis.**, v. 2, n.1, p. 6, 2003.
- BELIAEV, N.N., BROWN, D.E., DIAZ, A.I., RAE, A., JARRA, W., THOMPSON, J., LANGHORNE, J., POTOCHNIK, A.J. Induction of an IL7-R(+)c-Kit(hi) myelolymphoid progenitor critically dependent on IFN-gamma signaling during acute malaria. **Nat. Immunol.**, v. 11, n. 6, p. 477-485, 2010.
- BLACKMAN, M. J. Proteases in host cell invasion by the malaria parasite. **Cell Microbiol.**, v. 6, n. 10, p. 893-903, 2004.
- BORDEN, E. C., SEN, G. C., UZE, G., SILVERMAN, R. H., RANSOHOFF, R. M., FOSTER, G. R., STARK, G.R. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. **Nat. Rev. Drug. Discov.** v. 6, n. 12, p. 975-990, 2007.
- BUCHI, D. F. & DE SOUZA, W. Internalization of surface components during Fc-receptor mediated phagocytosis by macrophages. **Cell Struct. Func.** v. 18, p.

399-407, 1993.

COSTA, J. F., WANDERLEY, J. L. M., COSTA, J. M. L., BARCINSKI, M. A., BARRAL, A., BORGES, V. M. Mimetismo apoptótico como possível mecanismo imunopatogênico da Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD). **Gaz. Med. da Bahia**. v. 79, n. 3, p. 40-44, 2009.

COX, J., SEMOFF, S. & HOMMEL, M. *Plasmodium chabaudi*: a rodent malaria model for in-vivo and in-vitro cytoadherence of malaria parasites in the absence of knobs. **Parasite Immunol.**, v. 9, n. 5, p. 543-561, 1987.

CROSS, C.E., LANGHORNE, J. *Plasmodium chabaudi chabaudi* (AS): inflammatory cytokines and pathology in an erythrocytic-stage infection in mice. **Exp. Parasitol.** v. 90, n. 3, p. 220–229, 1998.

DAMATTA, R.A., SEABRA S.H., DEOLINDO P., ARNHOLDT A.C.V., MANHÃES, L., GOLDENBERG, S., DE SOUZA, W. *Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 266, n. 1, p. 29–33, 2007.

FADOK, V.A., BRATTON, D.L., HENSON, P.M. Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. **J. Clin. Invest.**, v. 108, n. 7, p. 957–962, 2001.

FADOK, V.A., BRATTON, D.L., KONOWAL, A., FREED, P.W., WESTCOTT, J.Y., HENSON, P.M., Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. **J. Clin. Invest.**, v. 101, n. 4, p. 890–898, 1998.

- FADOK, V.A., VOELKER, D.R., CAMPBELL, P.A., COHEN, P.A., COHEN, J.J., BRATTON, D.L., HENSON, P.M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **J. Immunol.**, v. 148, n. 7, p. 2207-2216, 1992.
- FENG, Y.H., MAO, H. Expression and preliminary functional analysis of Siglec-F on mouse macrophages. **J. Zhejiang Univ. Sci. B.**, v. 13, n. 5, p. 386-394, 2012.
- FREY, B. & GAIPPL, U. The immune functions of phosphatidylserine in membranes of dying cells and microvesicles. **Sem. Immunol.**, v. 33, n. 5, p. 497-516, 2011.
- GOOD, M.F. & DOOLAN, D.L. Immune effector mechanisms in malaria. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 11, n. 4, p. 412-419, 1999.
- GOOD, M.F. Identification of early cellular immune factors regulating growth of malaria parasites in humans. **Immunity**, v. 23, n. 3, p. 241-242, 2005.
- GREENWOOD, B. Can malaria be eliminated? **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 103, n. 1, p. 2-5, 2009.
- GREGORY, D.J. & OLIVIER, M. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. **Parasitology**, v. 130, n. 1 p. 27-35, 2005.
- GRIVICICH, I., REGNER, A., ROCHA, A.B. Apoptosis: Programmed Cell Death. **Rev. Bra. de Canc.**, v. 53, n.3, p. 335-343, 2007.

- HEDDINI, A., PETTERSSON, F., KAI, O., SHAFI, J., OBIERO, J., CHEN, Q., BARRAGAN, A., WAHLGREN, M., MARSH, K. Fresh isolate from children with severe *Plasmodium falciparum* malaria bind to multiple receptors. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 9, p. 5849-5856, 2001.
- IGNARRO, L. J. The unique role of nitric oxide as a signaling molecule in the cardiovascular system. **Ital. Heart J.** v. 3, n. 3, p. 28-29, 2000.
- ISRAELS L.G. & ISRAELS E.D. Apoptosis. **Stem Cells.**, v. 17, n. 5, p. 306-313, 1999.
- KERR J.F., WYLLIE A.H. & CURRIE A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer.**, v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.
- KOOPMAN, G., REUTELINGSPERGER, C.P., KUIJTEN, G.A., KEEHNEN, R.M., PALS, S. T., VAN OERS, M. H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**, v. 84, n. 5, p. 1415-1420, 1994.
- LAMIKANRA, A.A., BROWN, D., POTOCHNIK, A., CASALS-PASCUAL, C., LANGHORNE, J., ROBERTS, D.J. Malarial anemia: of mice and men. **Blood**, v. 110, n. 1, p. 18–28, 2007.
- LEGORRETA-HERRERA, M., RIVAS-CONTRERAS S., VENTURA-GALLEGOS, J.L. ZENTELLA-DEHESA, A., Nitric Oxide is Involved in the Upregulation of IFN- γ and IL-10 mRNA Expression by CD8⁺ T Cells During the Blood Stages of *P. chabaudi* AS Infection in CBA/Ca Mice . **Int. J. Bio. Sci.** , v. 7, n. 9, p. 1401-1411 , 2011.

- LEVINE, B. & DERETIC, V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. **Nat Rev. Immunol.**, v. 7, n. 10, p. 767-777, 2007.
- LIU, H., CAO, Y., TONG, T., SHI, J., ZHANG, Y., YANG, Y., LIU, C. Autophagy in Atherosclerosis: A Phenomenon Found in Human Carotid Atherosclerotic Plaques. **Chin. Med.**, v. 128, n. 1, p. 69-74, 2015.
- LUDER, C.G., CAMPOS-SALINAS, J., GONZALEZ-REY, E., VAN ZANDBERGEN, G. Impact of protozoan cell death on parasite-host interactions and pathogenesis. **Par. Vec.**, v. 3, n. 116, p. 1-12, 2010.
- MACKINTOSH, C.L., BEENSON, J.G., MARSH, K. Clinical features and pathogenesis of severe malaria. **Trends. Parasitol.**, v. 20, n. 12, p. 597-603, 2004.
- MARODI, L., TOURNAY, C., KAPOSZTA, R., JOHNSTON, R.B., MOGUILEVSKY, N. Augmentation of human macrophage candidacidal capacity by recombinant human myeloperoxidase and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Infect. Immun.** v. 66, n. 6, p. 2750-2754, 1998.
- MARTIN, S.J., REUTELINGSPERGER, C.P., MCGAHON, A.J., RADER, J.A., VAN SCHIE, R.C., LAFACE, D.M., GREEN, D.R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **J. Exp. Med.**, v. 182, n. 5, p. 1545-1556, 1995.
- MOHAN, K., STEVENSON, M.M. Dyserythropoiesis and severe anaemia associated with malaria correlate with deficient interleukin-12 production. **Br. J. Haematol.**, v. 103, n. 4, p. 942-949, 1998.

- MOSER, S., RUSSO, M., VAZCA, B. E., CALICH, V. L., KOWANKO, I. C. Cytokines in the host response to mycotic agents. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 32, n. 1, p. 203-210, 1994.
- MOSHAGE, H., KOK, B., HUIZENGA, J. R., JANSEN, P. L. M. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. **Clin. Chem.**, v. 41, n. 6, p. 892-896, 1995.
- MOSSER, D.M. The many faces of macrophage activation. **J. Leukoc. Biol.** v. 73, n. 2, p. 209-212, 2003.
- MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M.A., FERNÁNDEZ, M. & FRESNO, M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF- α and IFN- γ through a nitric oxide-dependent mechanism. **Immunol. Lett.**, v. 33, n. 1, p. 35-40, 1992.
- MURPHY, J. W., WU-HSIEH, B. A., SINGER-VERMES, L. M., FERRANTE, A., NORTH, R.J. The concept of the activated macrophage. **J. Immunol.**, v. 121, n. 3, p. 806-809, 1978.
- OHMORI, Y., HAMILTON, T.A. IFN- γ selectively inhibits lipopolysaccharide-inducible JE/monocyte chemoattractant protein-1 and KC/GRO/melanoma growth-stimulating activity gene expression in mouse peritoneal macrophages. **J. Immunol.**, v. 153, n. 5, p. 2204-2212, 1994.
- ORJIH, A. U., Requirements for maximal enrichment of viable intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* rings by saponin hemolysis. **Exp. Biol. Med.**, v. 233, n. 11, p.1359–1367, 2008.
- PALMER, R. M. J., FERRIGE, A. G. & MONCADA, S. Nitric oxide release

- accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature.**, v. 327, n. 6122, p. 524-526, 1987.
- PANG, W., SUN, X., FENG, H., WANG, J., CUI, L., CAO, Y. The Role of Regulatory T Cells during *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS Infection in BALC/c Mice. **Parasite Immunol.**, v. 10, n. 11, p. 1365-3024, 2016.
- PLATT, N., DA SILVA, R.P. & GORDON, S. Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. **Trends Cell. Biol.**, v. 8, n.9, p. 365–372, 1998.
- RICHARDS, J. S., & BEESON, J. G. The future for blood-stage vaccines against malaria. **Immunol. Cell. Biol.**, v. 87, n.5, p. 377-390, 2009.
- RIEGER, A. M., NELSON, K.L., KONOWALCHUK, J. D., BARREDA, D. R. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. **J. Vis.** v. 50, n. 2597, p. 3797, 2011.
- ROSSELI, M., KELLER, R. J., DUBEY, R. K. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. **Human Reproduction Update.**, v. 4, n. 1, p. 3-24, 1998.
- SEABRA, S. H., DE SOUZA, W., DAMATTA, R.A. *Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine inducing a TGF-beta1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 324, n. 2 p. 744–752, 2004.
- STEPHENS, R., CULLETON, R. L., & LAMB, T. J. The contribution of *Plasmodium chabaudi* to our understanding of malaria **Trends Parasitol.**, v. 28, n. 2, p. 73–82 , 2012.

- STUEHR, D.J. & MARLETTA, M.A. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, or Interferon- γ . **J. Immunol.**, v. 139, n. 2 p. 518-525, 1987.
- TRIPHATI, A. & GUPTA, C.M. Transbilayer translocation of membrane phosphatidylserine and its role in macrophage invasion in *Leishmania* promastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 128, n. 1, p. 1-9, 2003.
- VANCE, J.E., STEENBERGEN, R. Metabolism and functions of phosphatidylserine. **Prog. Lipid. Res.**, v. 44, n. 4, p. 207-234, 2005.
- VAZQUEZ-TORRES, A., BALISH, E. Macrophages in resistance to candidiasis. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 61, n. 2, p. 170-192, 1997.
- VERMEULEN, K., VAN BOCKSTAELE, D.R., BERNEMAN, Z.N. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. **Ann. Hematol.**, v. 84, n. 10, p. 627-639, 2005.
- VESPA, G.N., CUNHA, F.Q. & SILVA, J.S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi* induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. **Infect. Immun.**, v. 62, n.11, p. 5177-5182, 1994.
- WEI, X.Q., CHARLES I.G., SMITH, A., URE, J., FENG, G.J., HUANG, F.P., XU, D., MULLER, W., MONCADA, S., LIEW, F.Y. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Nature**, v. 375, n. 6530, p. 408-411, 1995.
- WICKMAN, G.R., JULIAN, L., MARDILOVICH, K., SCHUMACHER, S., MUNRO, J., RATH, N., ZANDER, S. A., MLECZAK, A., SUMPTON, D. Blebs produced by actin–myosin contraction during apoptosis release damage-associated molecular pattern proteins before secondary necrosis occurs. **Cell Death**

Differ., v. 20, n. 10, p. 1293-1305, 2013.