

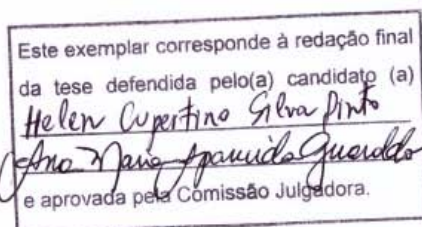
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



HELEN CUPERTINO SILVA PINTO

**"EFEITO DO TRATAMENTO DA MALÁRIA CEREBRAL
COM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA EM CAMUNDONGOS
INFECTADOS PELO *Plasmodium berghei* ANKA"**



Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia para
obtenção do Título de Mestre em
Parasitologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Gualardo

Campinas, SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

P658e

Pinto, Helen Cupertino Silva
Efeito do tratamento da malária cerebral com células da medula óssea em camundongos infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA / Helen Cupertino Silva Pinto. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadora: Ana Maria Aparecida Guaraldo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Malária cerebral. 2. Células da medula óssea. 3. *Plasmodium berghei*. 4. Camundongo. 5. Proteínas de fluorescência verde. I. Guaraldo, Ana Maria Aparecida, 1951-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(scs/lb)

Título em inglês: Effect of treatment of cerebral with bone marrow cells in mice infected by *Plasmodium berghei* ANKA.

Palavras-chave em inglês: Cerebral malaria; Bone marrow cells; *Plasmodium berghei*; Mice; Green fluorescent proteins.

Área de concentração: Parasitologia.

Titulação: Mestre em Parasitologia.

Banca examinadora: Ana Maria Aparecida Guaraldo, Marcus Alexandre Finzi Corat, Rosa Maria Elias.

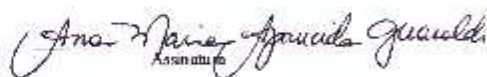
Data da defesa: 26/08/2009.

Programa de Pós-Graduação: Parasitologia.

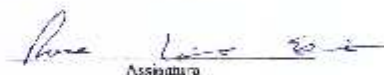
Campinas, 26 de agosto de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo
(Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Rosa Maria Elias


Assinatura

Prof. Dr. Marcus Alexandre Finzi Corat


Assinatura

Prof. Dr. Cláudio Romero Farias Marinho


Assinatura

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho


Assinatura

**Dedico este trabalho:
aos meus filhos, Renan e Allan e
ao meu dedicado marido
Epaminondas;
pelo incentivo, companheirismo e paciência.**

Agradecimentos:

A conclusão de etapa tão importante na minha formação profissional é motivo de muita alegria e sei que isso não seria possível sozinha, quando olho pra trás relembro quantos estiveram ao meu lado, ensinando, incentivando, acolhendo e até discordando em prol do meu crescimento; considero que essa vitória não é só minha, gostaria de compartilhar com todos a conquista desse título.

Acredito que esta seja a parte mais gratificante do meu trabalho, acima de todo aprendizado, toda experiência, com certeza o bem mais precioso conquistado nessa trajetória foram as amizades e a agradável convivência com pessoas tão queridas.

Agradeço primeiramente a Deus pela conclusão de tão importante etapa na minha formação profissional;

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela possibilidade de realizar este trabalho e à CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão de bolsa de estudo;

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo, obrigada pela oportunidade de realizar esse sonho, agradeço por ter acreditado em mim, pela paciência, incentivo naquelas horas em que tudo dava errado e só você conseguia ver um lado positivo; como já disse um dia, lhe considero muito além de uma orientadora, uma amiga, uma segunda mãe;

Aos meus filhos, Renan e Allan, agradeço pela paciência, pela ajuda na informática e principalmente pela compreensão da ausência materna em muitas atividades sociais e familiares;

Ao meu marido, Epaminondas, a quem devo a realização desse sonho, agradeço por não permitir que eu fraquejasse nos momentos mais difíceis, por ter acreditado e investido em mim, sem você nada disso seria possível;

À minha família, agradeço pelo incentivo, pela torcida e compreensão;

À Lenira Guaraldo de Andrade e Dani Masselli Demolin (CEMIB), agradeço por todo apoio técnico, sugestões e principalmente pelas inúmeras palavras de incentivo que muitas vezes me renovaram; obrigada pelo prazer da convivência com vocês;

Ao Sílvio, Jô, Clarice, obrigada pelo apoio e companheirismo, estar entre vocês me faz sentir em família;

Ao Dr. Rovilson Gilioli, agradeço por ter me acolhido com tanto carinho e por ter aberto as portas do seu laboratório disponibilizando equipamentos e material, serei sempre grata por tudo.

Ao Dr. Marcus Corat, agradeço pela maravilhosa oportunidade de ter trabalhado ao seu lado, pelo aprendizado, incentivo, apoio e principalmente pela honra de contar com você na minha banca de defesa;

À minha querida Danizinha, obrigada pela sua dedicação, paciência e apoio na conclusão desse trabalho;

Ao Prof. Dr. Alexandre Rodrigues de Oliveira e ao doutorando Gustavo Simões do Departamento de Anatomia, agradeço por disponibilizarem o criostato, material e muita paciência para confecção dos cortes histológicos;

Aos técnicos e amigos de departamento, João, Ivo, Nilson, Rubens, Marina, agradeço pelo suporte e todo apoio que sempre disponibilizaram;

A todos os amigos do L3, Luciana, Claudineide, Michele, Tarsila, Bel, Anderson, Júlia, agradeço pela ajuda e agradável convivência;

À Stefanie e Yara, obrigada pelo apoio na infecção dos camundongos;

Ao Prof. Dr. Arício Xavier Linhares agradeço pela participação na banca de qualificação e contribuição na análise estatística;

À Profª. Dra. Selma Giorgio e Profª. Dra. Eliana Maria Zanotti-Magalhães, agradeço pela participação na banca de qualificação e sugestões;

À Catarina Raposo, agradeço pela contribuição na leitura e análise dos cortes histológicos;

Ao Vinícius Pascoal, obrigada por sua imensa paciência na realização da cirurgia estereotáxica ;

À Dra. Rosa Maria Elias (USP/Unifesp) agradeço por disponibilizar a linhagem PbA GFP, por todos esclarecimentos técnicos e pela aceitação na participação na minha banca de defesa;

Aos camundongos que viabilizaram a execução desse projeto.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desse sonho.

EFEITO DO TRATAMENTO DA MALÁRIA CEREBRAL COM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS PELO *Plasmodium berghei* ANKA.

A malária cerebral humana é a manifestação mais grave do *Plasmodium falciparum* que ocorre em 1% das infecções, sendo responsável por mais de dois milhões de mortes anuais entre crianças abaixo de cinco anos. O modelo experimental mais aceito da malária cerebral é o camundongo C57BL/6 infectado pelo *Plasmodium berghei* ANKA (PbA). A administração da fração mononuclear da medula óssea, contendo principalmente células tronco mesenquimais e hematopoiéticas, constitui uma estratégia promissora no tratamento de danos neurais causados por acidente vascular cerebral. Neste estudo, foi avaliado o efeito de células da medula óssea de camundongos transgênicos C57BL/6 GFP HET transplantadas em C57BL/6JUnib infectados com 10^6 hemácias parasitadas pelo PbA. Resumidamente, células perfundidas da medula do fêmur e tíbia de C57BL/6 GFP HET foram purificadas por gradiente de Ficoll (Histopaque) a $1000 \times g$ por 15 minutos. Após duas lavagens em meio RPMI, as células foram ressuspensas em NaCl 0,15 M. No segundo dia após a infecção (dai) pelo PbA, foram injetadas $3,0 \times 10^6$ a $4,6 \times 10^7$ células de medula óssea (CMO) no plexo oftálmico dos camundongos devidamente anestesiados com ketamina/xylasina (protocolo 1078-1 CEEA/Unicamp). Alguns camundongos receberam apenas a injeção de células totais da medula óssea (CTMO), sem a purificação pelo gradiente de Ficoll. Foi avaliada a integridade da barreira hemato-encefálica, mediante a injeção de azul de Evans 1% no plexo oftálmico em camundongos transplantados e não transplantados com células mononucleares da medula óssea (CMoMO) no 2º dai. Após 3 e 4 dias do transplante, não houve proteção da barreira hemato-encefálica. Para constatação da presença das células de medula óssea no cérebro, outro grupo de camundongos infectados pelo PbA recebeu no 2º dai, $4,6 \times 10^7$ CMoMO provenientes de camundongos GFP. Após a manifestação de sinais clínicos da MC os camundongos foram sacrificados para remoção do cérebro e preparo de cortes em criostato. Foi possível observar, sob microscópio de fluorescência, a presença de células da medula no bulbo olfatório de camundongos com MC+. Também foram avaliadas a sobrevivência, a parasitemia e a ação coadjuvante do tratamento com cloroquina (0,8 mg/dia/animal). Todos os 38 animais do grupo controle morreram até o 7º dia de infecção pelo PbA (13,16% no 5º dia, 68,42% no 6º dia e 18,42 % no 7º dai). A injeção de células da medula

óssea não interferiu na parasitemia dos animais. Apesar dos animais que superaram a fase aguda da malária cerebral morrerem em decorrência de hiperparasitismo e anemia, o tratamento com células da medula óssea (fração mononuclear ou células totais) mostrou-se capaz de ampliar a sobrevivência em 10 a 21 dias, resultados considerados promissores. As células da medula óssea promoveram a melhora clínica do quadro neurológico da malária cerebral.

Palavras-chave: malária cerebral; células da medula óssea, camundongo GFP; C57BL/6; *Plasmodium berghei* ANKA

EFFECT OF TREATMENT OF CEREBRAL MALARIA WITH BONE MARROW CELLS IN MICE INFECTED BY *Plasmodium berghei* ANKA

The cerebral malaria (CM) is the most serious complication of *Plasmodium falciparum* occurring in 1% of infections, and is responsible for more than two million of annual deaths among children under five years old. The experimental model for brain malaria currently used is the C57BL/6 mice infected by *Plasmodium berghei* ANKA (PbA). Administration of mononuclear population from bone marrow containing mainly mesenchymal stem cells and haematopoietic stem cells, is a promising strategy to treat neural damages caused by stroke. In this study was evaluated the effect of bone marrow mononuclear cells of transgenic mice C57BL/6 GFP HET transplanted into C57BL/6JUnib, infected by 10^6 parasitized erythrocyte PbA. Briefly, bone marrow mononuclear cells flushed from femur and tibia of C57BL/6 GFP HET were purified through Ficoll (Histopaque) gradient at 1000xg during 15 minutes. After two washes with RPMI medium, the cells were resuspended in NaCl 0,15M. On the second day after infection (DAI) by PbA, were injected into mice orbital plexus 3×10^6 to 4.6×10^7 cells of after anaesthesia with Ketamine/Xylazine (protocol nº 1078-1 CEEA/UNICAMP). Some mice received only injection of total bone marrow cells without purification on Ficoll gradient. The injection of bone marrow mononuclear cells on the second day of infection by PbA was unable in recovering the brain blood barrier after three or four days. In order to confirm the presence of bone marrow cells in the brain, another group of infected C57BL/6JUnib received on the second day after infection 4.6×10^7 bone marrow mononuclear cells from GFP mice. They were sacrificed between 6th and 8th day after onset of clinical signs of the CM. After removal and preparation of the brain for criostate cuts, was possible to observe, under fluorescence microscope, the presence of GFP bone marrow cells in the olfactory bulb on CM+ mice. It was evaluated survival, parasitemia and action of the adjuvant treatment of chloroquine (0.8 mg/day/animal) as well. All the 38 animals from control group died until 7th DAI. (13.16% at 5th DAI, 68.42% at 6th DAI and 18.42% at 7th DAI). The transplantation of bone marrow cells did not affect the parasitemia. The bone marrow cells therapy infected mice by PbA was able to revert the clinical signs of cerebral malaria, increasing the survival up to 21 days.

Key words: cerebral malaria, bone marrow cells, GFP mice, C57BL/6; *Plasmodium berghei* ANKA

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. ASPECTOS GERAIS	13
1.2. CICLO BIOLÓGICO	15
1.3. MALÁRIA CEREBRAL (MC)	18
1.3.1. Citoaderência	20
1.3.2. Patologia do Sistema Nervoso Central	21
1.4. TRATAMENTO	22
1.5. MODELO EXPERIMENTAL NA MALÁRIA CEREBRAL	23
1.6. TERAPIA COM CÉLULAS TRONCO	24
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1. CAMUNDONGOS	32
3.2. <i>PLASMODIUM BERGHEI</i> ANKA (PBA) E <i>PLASMODIUM BERGHEI</i> ANKA GFP (PBA GFP)	32
3.3. TRANSPLANTE DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA (CMOMO)	33
3.4. TRANSPLANTE DE CÉLULAS TOTAIS DE MEDULA ÓSSEA (CTMO)	33
3.5. TRATAMENTO COM CLOROQUINA	34
3.6. DETECÇÃO DE CÉLULAS GFP DE MEDULA ÓSSEA NO CÉREBRO DE CAMUNDONGOS C57BL/6JUNIB INFECTADOS PELO PBA	34
3.7. DETECÇÃO DE FORMAS PARASITÁRIAS DO PBA NO CÉREBRO DE CAMUNDONGOS	35
3.8. MONITORAMENTO DA INTEGRIDADE DA BARREIRA HEMATO-ENCEFÁLICA EM CAMUNDONGOS	35
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
4. RESULTADOS	37
4.1. DETERMINAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE CAMUNDONGOS C57BL/6JUNIB INFECTADOS PELO <i>PLASMODIUM BERGHEI</i> ANKA	37
4.1.1. Tratamento com células mononucleares de medula óssea (CMOMO)	37
4.1.2. Sobrevivência de camundongo C57BL/6JUnib infectado por <i>Plasmodium berghei</i> ANKA, tratados com células totais de medula óssea (CTMO) comparado ao grupo não tratado	39
4.1.3. Sobrevivência de camundongos C57BL/6JUnib infectados por <i>Plasmodium berghei</i> ANKA, tratados com Cloroquina ou células totais de medula óssea (CTMO) associadas à cloroquina	40
4.2. DETERMINAÇÃO DA PARASITEMIA DE CAMUNDONGOS C57BL/6JUNIB INFECTADOS PELO <i>PLASMODIUM BERGHEI</i> ANKA	42
4.2.1. Tratamento de C57BL/6JUnib com células totais de medula óssea (CTMO)	43
4.2.2. Tratamento de C57BL/6JUnib com células totais de medula óssea (CTMO) , associada ao tratamento com cloroquina.	44
4.3. MONITORAMENTO DA INTEGRIDADE DA BARREIRA HEMATO-ENCEFÁLICA	45
4.4. DETECÇÃO DE CÉLULAS GFP DE MEDULA ÓSSEA NO CÉREBRO DE CAMUNDONGOS C57BL/6JUNIB INFECTADOS PELO <i>PLASMODIUM BERGHEI</i> ANKA	48
4.5. DETECÇÃO DE FORMAS PARASITÁRIAS DO PBA NO CÉREBRO DE CAMUNDONGOS	51
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÕES	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
8. ANEXO	80
8.1. ANÁLISE ESTATÍSTICA	80
8.2. CERTIFICADO CEEA/UNICAMP	90
8.3. CERTIFICADO CIBIO/CEMIB	91

RELAÇÃO DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS:

BHE	Barreira hemato-encefálica
CMoMO	Células mononucleares da medula óssea
CTMO	Células totais da medula óssea
dai	Dias após a infecção
EI	Eritrócitos infectados
ICAM	Molécula de adesão intracelular
MC	Malária cerebral
MC+	Malária cerebral positiva
CMsMO	Células mesenquimais da medula óssea
PbA	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA
PbA GFP	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA GFP
SC	Sinais clínicos
VCAM	Molécula de adesão celular vascular
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

1. Introdução

1.1. Aspectos Gerais

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde de 2008, cerca de 3,3 bilhões de pessoas, metade da população mundial, vive em áreas onde há o risco de transmissão da malária, abrangendo 109 países, 45 dentro da região africana. Estima-se que a incidência da doença seja da ordem de 300 a 500 milhões de casos clínicos por ano com aproximadamente um milhão de mortes (LUHAN, 1996). Mais de 90% destes casos ocorrem na África tropical, região ao sul do deserto de Saara e o restante se distribui pelos países tropicais da Ásia, América Latina e Caribe (Fig.1) (BYK & ANHALT, 1971).

Uma em cada cinco mortes infantis (20%) na África é atribuída à malária e a cada 30 segundos morre uma criança. Em 2004, o *Plasmodium falciparum* representou um dos principais agentes letais em todo o mundo (WHO, 2008).

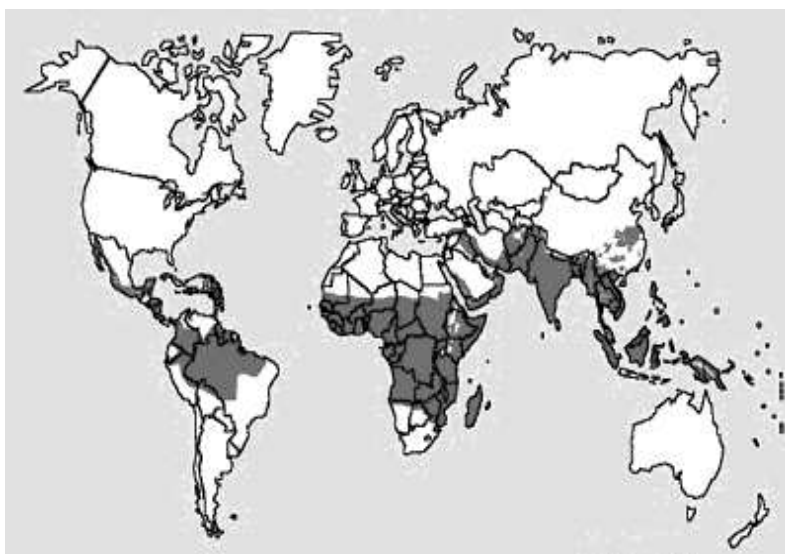


Figura 1 : Mapa da área endêmica de malária mundial. Fonte: adaptado da OMS, 1997

No Brasil, de acordo com a base de dados do Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica (SIVEP)/MS (http://dw.saude.gov.br/portal/page/portal/sivep_malaria/) do Ministério da Saúde, em 2007, 99% dos casos foram registrados na região da Amazônia Legal, que abrange Amazonas, Acre, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. (Figura 2).

A doença afeta principalmente populações vivendo em condições insatisfatórias de habitação e trabalho. Tais populações estão relacionadas à ocupação desordenada de terras, à exploração de minérios e aos movimentos migratórios (SILVEIRA & RESENDE, 2001).

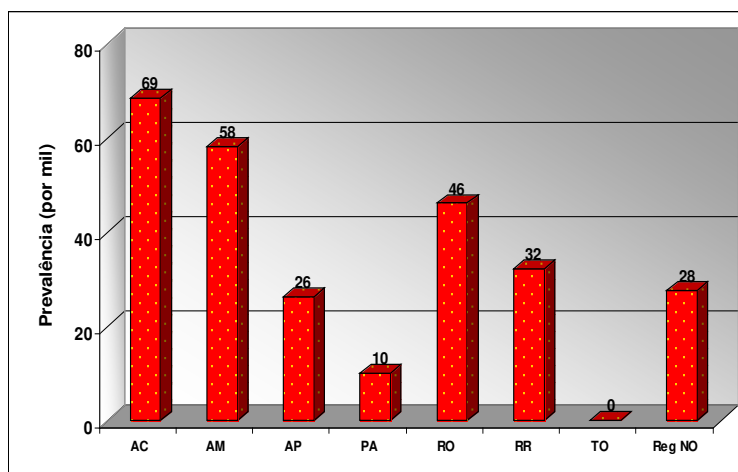


Figura 2: Prevalência de malária por UF da região Norte-2007 (por mil hab.).

Fonte: SIVEP-Malária, 2008

Os agentes etiológicos da malária são protozoários da família Plasmodiidae, do gênero *Plasmodium* que apresenta quase 100 espécies descritas. Em humanos são encontradas quatro espécies: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. ovale*.

O *P. vivax* é o mais disperso no mundo, ocorre em países tropicais, subtropicais e temperados e está associado à chamada febre terçã benigna. O *P. malariae* é de menor incidência, restrito a pequenas áreas das regiões tropicais e temperadas, produz a febre quartã. O *P. ovale* está restrito principalmente a algumas áreas da África e descrito ocasionalmente na Ásia, até o momento indene no Brasil.

O *P. falciparum* é responsável pelos quadros clínicos mais graves da doença; predomina nos países africanos ao sul do Saara e nas regiões tropicais e subtropicais das Américas e do sudeste asiático. Este plasmódio está associado à chamada febre terçã maligna e estima-se que ocorra 1,5 a 2,7 milhões de óbitos por ano (WHO,2008). Crianças, gestantes e pessoas não-imunes recém-chegadas a áreas endêmicas compõem os grupos de maior risco de óbito pela malária.

1.2. Ciclo Biológico

Os vetores biológicos da malária em mamíferos são insetos fêmeos da ordem Diptera, da família Culicidae e do gênero Anopheles. No Brasil, as principais espécies vetoras são: *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*, *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis*, *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis*, *Anopheles (Kerteszia) cruzi* e *Anopheles (Kerteszia) bellator*.

O ciclo de vida é essencialmente o mesmo entre as quatro espécies de *Plasmodium* que afetam o homem (figura 3). A fase sexuada ocorre na fêmea do mosquito e a fase assexuada no hospedeiro vertebrado. Durante o repasto sanguíneo o inseto inocula os esporozoítos que em questão de minutos alcançam o fígado, fase pré-eritrocítica (assintomática) e, nos hepatócitos começam a se multiplicar, transformando-se em esquizontes. Centenas de merozoítos são liberados na corrente sanguínea e rapidamente penetram nas células vermelhas, que caracteriza

a fase eritrocítica (sintomática). O tempo para a liberação dos merozoítos no sangue varia geralmente de uma a duas semanas. No interior dos eritrócitos ocorre divisão assexuada com desenvolvimento do parasita em estágios de anel, trofozoíto, esquizonte jovem até esquizonte maduro, sendo este responsável pela liberação de merozoítos na circulação sanguínea, dando início a um ciclo de novas invasões eritrocíticas.

Este ciclo assexuado de invasão das hemácias pelos merozoítos até a ruptura do esquizonte leva 48 horas na malária causada pelos *Plasmodium falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* e 72 horas no caso do *P. malariae* (ASHLEY et al., 2006).

Depois de algumas gerações de merozoítos sanguíneos ocorre diferenciação em estágios sexuais, os gametócitos, que completarão seu desenvolvimento vetor. Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do anofelino ingere as formas sanguíneas do parasito, porém somente os gametócitos evoluirão no inseto originando os esporozoítos.

No intestino médio do mosquito os gametócitos se diferenciam em gametócitos masculinos e femininos e posteriormente em micro e macrogametas respectivamente. A fusão destes resulta no zigoto que dentro de 24 horas passa a movimentar-se, sendo então denominado oocineto, que atinge a parede do intestino médio encistando-se na camada epitelial, agora então denominado de oocisto. Em seguida, mediante a reprodução assexuada se divide em inúmeros esporozoítos, sua parede se rompe e os esporozoítos agora livres no meio extracelular migram até as glândulas salivares e serão eliminados, juntamente com a saliva, durante o repasto sanguíneo infectante.

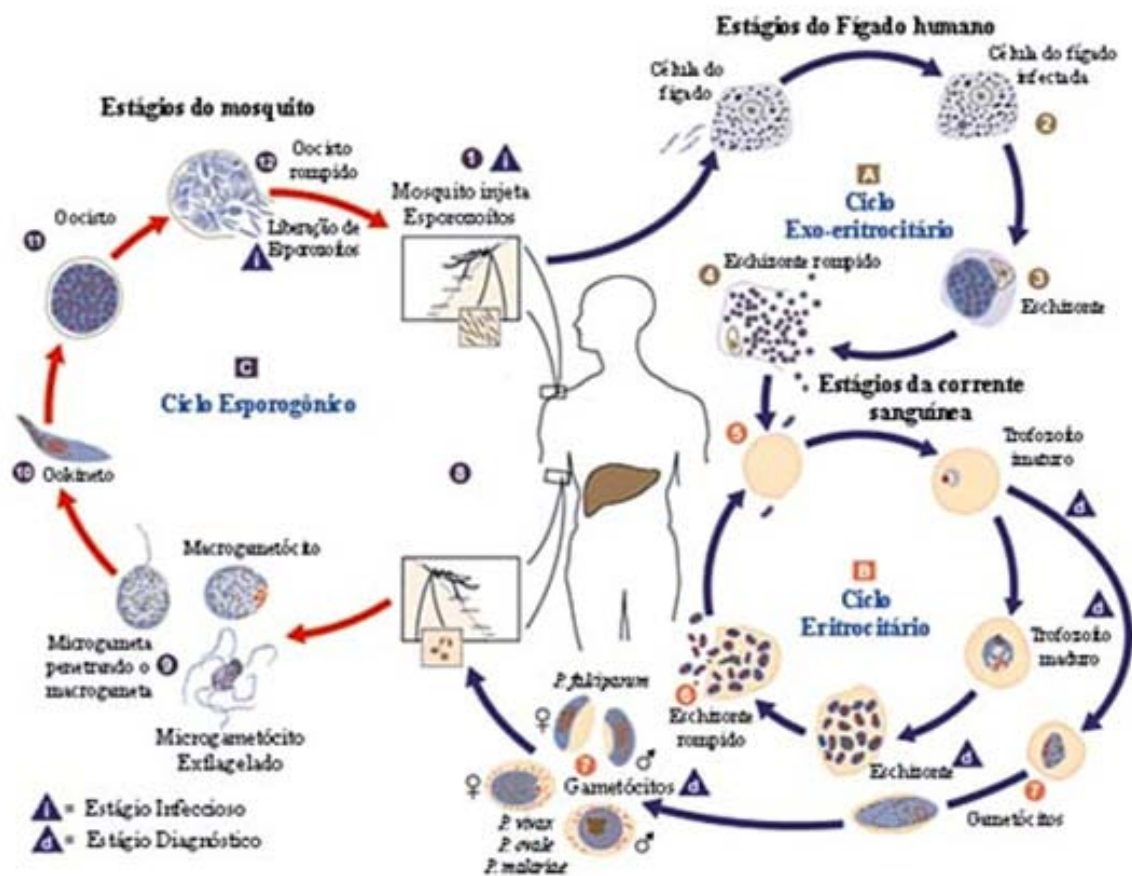


Figura 3. Ciclo biológico de *Plasmodium* spp (Adaptado: <http://www.cdc.gov>)

A sintomatologia na malária varia de acordo com a espécie e cepa do plasmódio. A destruição das hemácias é um dos aspectos importantes da patologia malárica, tendendo a levar o paciente a certo grau de anemia. A maioria dos pacientes apresenta febre, dor de cabeça, calafrios e sudorese. Outros sintomas como tonturas, dores abdominais, náuseas, diarreia e vômitos também podem estar presentes (TRAMPUZ et al., 2003).

Em infecções causadas pelo *Plasmodium falciparum* observa-se uma profunda e severa anemia podendo levar a óbito (MENENDEZ et al., 2000).

1.3. Malária Cerebral (MC)

A complicação mais importante na infecção pelo *P. falciparum* é a Malária Cerebral (MC). Esta síndrome neurológica ocorre em cerca de 1% das infecções, porém é responsável por mais de dois milhões de mortes anualmente entre crianças abaixo de cinco anos na África Sub-Saariana. A histopatologia de cérebros *pos-mortem* mostra que a MC é caracterizada por um bloqueio dos microvasos cerebrais, devido ao acúmulo de células do hospedeiro, predominantemente eritrócitos invadidos pelo parasito, mas também leucócitos e plaquetas. Edema cerebral e alterações da integridade da barreira hemato-encefálica podem ser acompanhadas por micro-hemorragias e necroses de tecidos vizinhos (COLTEL et al, 2004).

A mortalidade na malária cerebral ainda permanece elevada, podendo atingir de 20 a 50% dos casos (WALKER et al., 1992). Alguns fatores tais como o nível do coma, a presença de rigidez de descerebração, hipoglicemia, elevados níveis de uréia, idade menor que dois anos e a predominância de formas maduras do parasita (esquizontes) no sangue periférico são indicadores de mal prognóstico (SILLAMUT & WHITE, 1993).

Nos pacientes que sobrevivem a um episódio de malária cerebral, particularmente nas crianças, sequelas neurológicas podem ocorrer com uma frequência de 9 a 18% (CAME et al, 1993). As mais proeminentes são: *deficit* da fala, desordens de tono muscular, ataxia, mono ou hemiparesia e perda visual. Pacientes com hipoglicemia persistente, convulsões severas e coma prolongado foram particularmente propensos a desenvolver *deficits* neurológicos (BONDI, 1992; WHITE et al., 1987).

A malária cerebral é consequência de uma cascata de eventos, envolvendo a produção de toxinas pelo parasito, de citocinas pelo hospedeiro e a ampliação da expressão de receptores para citoaderência nas células do endotélio capilar cerebral.

Em experimentos com camundongos suscetíveis à malária cerebral e *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) foram evidenciados altos níveis de TNF, citocinas que aumentam a expressão de moléculas de adesão do endotélio celular como ICAM-1 ou CD54 (molécula de adesão intercelular), Elam ou selectina E e VCAM-1 (molécula de adesão celular/vascular). Na infecção humana estes e outros antígenos de superfície das células do hospedeiro têm sido incriminados como ligantes para a citoaderência de eritrócitos parasitados por *P. falciparum* incluindo trombospondina (proteína da matriz extracelular) de CD36 (antígeno de diferenciação de leucócitos, expresso em células endoteliais). Vários estudos confirmaram, na infecção humana, a correlação positiva de níveis plasmáticos de TNF com a gravidade da doença, mas não necessariamente com a forma cerebral (HOMMEL, 1993; PORTA et al., 1993).

Não se sabe ao certo o mecanismo envolvido na MC, mas acredita-se que esteja associado à sequestração dos parasitos e obstrução dos vasos cerebrais. Turner (1997) explica a etiologia com duas hipóteses: a mecânica e a humoral.

A hipótese mecânica tem a seu favor a interação específica mediada por proteínas do *P. falciparum* (PfEMP1) na superfície dos eritrócitos com antígeno de diferenciação leucocitária (CD36) e a molécula de adesão (ICAM1) principal ligante na malária cerebral. TNF- α e outras citocinas podem estimular a expressão de moléculas de adesão, principalmente ICAM1 nos capilares cerebrais. A citoaderência seletiva entre hemácias parasitadas e não parasitadas formam as chamadas rosetas, que ocorrem nas vênulas do cérebro, podendo levar à obstrução da microcirculação com consequente redução do fluxo sanguíneo, induzindo hipóxia, metabolismo anaeróbico e acidose láctica, levando às complicações da malária cerebral. Esta característica parece ser necessária mas não suficiente para induzir a malária cerebral considerando que o seqüestro de eritrócitos infectados ocorre em quase todos os casos de infecção por *P. falciparum*, mesmo sem implicações cerebrais (ARTAVANIS-TSAKONAS et al., 2003; DE SOUZA & RILEY., 2002; HUNT & GRAU, 2003; TAYLOR et al., 2004).

A hipótese humoral tem a seu favor a liberação pelos macrófagos de TNF- α e outras citocinas, como IL-1, ativadas por metabólitos do parasito. Estas citocinas estão associadas à febre e mal estar da malária aguda e sua ação inibitória sobre a gliconeogênese é responsável pela hipoglicemia. Citocinas também induzem a produção adicional e descontrolada de óxido

nítrico pelos leucócitos, musculatura lisa, micróglia e endotélio muscular que poderia difundir pelas barreiras hematogênicas cerebrais e alterar as funções sinápticas, tal como acontece sob o efeito de alguns anestésicos ou de altas concentrações de etanol, levando a um estado de redução de consciência com coma reversível.

1.3.1. Citoaderência

Estudos de microscopia eletrônica têm revelado que os eritrócitos parasitados com os estágios tardios do *P. falciparum*, em geral, desenvolvem na sua superfície pequenas protuberâncias denominadas “knobs”, através das quais aderem ao endotélio dos capilares e das vênulas pós-capilares (AIKAWA et al., 1990). Este fenômeno, denominado citoaderência, constitui a base da patologia microvascular, observada em vários órgãos (cérebro, pulmões, intestino, coração, etc) nas formas graves causadas pelo *P.falciparum* (AIKAWA et al., 1990; NAGATABE et al., 1992).

A citoaderência é responsável pela observação de que os esquizontes e merozoítos do *P. falciparum* não são vistos no sangue periférico, uma vez que se encontram sequestrados em capilares profundos das vísceras. Pelo menos três proteínas derivadas dos plasmódios estão associadas aos “knobs”: Pf – EMP1 (EMP = proteína da membrana do eritrócito), PfEMP2 e PfHRP1 (HRP = proteína rica em histidina) (UDEINYA & ADOGYERAM, 1993). Moléculas na superfície das células endoteliais funcionam como receptoras para as hemácias parasitadas contendo “knobs” realizarem a adesão: estas moléculas são denominadas trombospondina, CD36, ICAM1 (molécula de adesão intercelular), VCAM1 e ELAM1 (UDEINYA & ADOGYERAM, 1993). A expressão destes receptores endoteliais (e também a extensão da citoaderência) pode variar com as concentrações de citocinas no sangue, particularmente fator de necrose tumoral (TNF) e a interleucina I, capazes de exacerbar a adesividade das hemácias (ROCKETT et al., 1994).

A citoaderência leva à formação de massas de eritrócitos que acabam bloqueando a luz dos capilares induzindo aumento da permeabilidade com perda de fluidos e proteínas com anóxia e consequente edema dos tecidos. A formação de “rosetas” refere-se ao aparecimento de

hemácias parasitadas, no interior dos pequenos vasos cerebrais, circundadas por hemácias não-parasitadas.

1.3.2. Patologia do Sistema Nervoso Central

Em indivíduos infectados exclusivamente pelo *P. falciparum* são observadas lesões do sistema nervoso central. Macroscopicamente, o encéfalo mostra-se congesto, com edema proeminente em 36% dos casos e, em mais de 80% deles, observam-se evidentes hemorragias petequiais distribuídas especialmente na substância branca. O cérebro apresenta-se com uma cor cinza-azulada devido à impregnação pelo pigmento malárico (hemozoína) e as meninges também se apresentam congestionadas. Microscopicamente, observam-se em praticamente todos os casos, hemácias infectadas com esquizontes aderidas ao endotélio dos capilares e vênulas cerebrais (citoaderência) ou então, formando agregados com células não-parasitadas. Este fenômeno, conhecido como sequestração microvascular das hemácias, leva a profundas alterações na circulação cerebral devido à obstrução parcial ou completa dos pequenos vasos (AIKAWA et al., 1990). Isto é importante para o parasito porque o acúmulo dos glóbulos parasitados fora da circulação geral constitui uma adaptação biológica essencial à sobrevivência parasitária, uma vez que a passagem através do baço pode resultar na destruição do protozoário.

A gravidade da malária cerebral está na dependência direta do grau de sequestração eritrocítica que está ocorrendo no sistema nervoso (NAGATABE et al., 1992).

Um aspecto de particular interesse na patologia da malária cerebral é que a percentagem de vasos com sequestração de eritrócitos parasitados varia em diferentes regiões do sistema nervoso, sendo maior no cerebelo. Isto se deve ao fato de que o grau de vascularização do cerebelo (sete vasos por mm^3) é maior do que no cérebro (cinco vasos por mm^3). Outras lesões, tais como as hemorragias perivascularares, também são mais comumente vistas no cerebelo do que no cérebro (SEIN et al., 1993).

Na histopatologia do tecido nervoso no paciente com malária, podem ser observadas algumas lesões como necrose perivascular, necrose neuronal com reação glial e os denominados granulomas de Durck; estes consistem em uma zona central constituída por um pequeno vaso

com trombose envolvido por tecido necrótico e hemácias, ao redor das quais se dispõem células da glia em constante multiplicação. Estes granulomas provavelmente representam um processo de reparação desencadeado pelo extravasamento de sangue com parasitas, seus produtos e mediadores de inflamação no tecido nervoso (NAGATABE et al., 1992).

1.4. Tratamento

O tratamento anti-malárico convencional nas formas brandas baseia-se no uso de quinino, visto que é a droga mais barata. Entretanto, em áreas onde casos de resistência ao quinino já foram detectados, aconselha-se a utilização de cloroquina. O artesunato, outra droga utilizada, é um derivado de artemisina e solúvel em água. O artesunato apresenta eficiência semelhante ao do quinino, porém com custo mais elevado (TRAMPUZ et al., 2003; Newton & KRISHNA, 1998).

O tratamento das formas severas da malária, como a malária cerebral, é feito com as mesmas drogas utilizadas na malária branda, porém sua aplicação se faz por via intravenosa ou intramuscular pois os pacientes com malária severa apresentam intolerância à medicação oral (TRAMPUZ et al., 2003; IDRO et al., 2005).

Devido às complicações apresentadas na malária severa, terapias adjuvantes como administração de antitérmicos, anticonvulsivos, antiinflamatórios, vasodilatadores, aplicação de glicose e transfusão sanguínea também são utilizadas (NEWTON & KRISHNA, 1998).

A grande capacidade de adaptação dos parasitas da malária evidencia-se na rapidez com que se desenvolveu, particularmente em *P. falciparum*, a resistência a praticamente todos os antimaláricos sintéticos desenvolvidos a partir de 1940 (HILDEBRANDO & OLIVEIRA, 2002). O uso inadequado dos medicamentos e/ou a administração de fármacos com baixa qualidade também contribuem para o surgimento de resistência.

Acredita-se que a primeira ocorrência de cepas de *P. falciparum* cloroquina-resistentes ocorreu no final dos anos 50, no Sudeste Asiático e também na América do Sul. Atualmente,

cepas com esta característica estão espalhadas por todas as áreas endêmicas do mundo e uma diminuição da sensibilidade à quinina e à mefloquina tem sido relatada na América do Sul (GUERIN et al., 2002).

Com o aparecimento de cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina (MABERTI, 1960; MOORE & LANIER, 1961) e a rápida dispersão dessas cepas nas áreas malarígenas da Ásia (CLYDE et al., 1972, DEGOWIN & POWELL, 1965), Américas (FERRRARONI et al., 1981, RIECKMANN & LOPEZ-ANTUNANO, 1971) e África (KEAN, 1979), a pesquisa para o encontro de novas drogas antimaláricas foi substancialmente intensificada.

A emergência da resistência, principalmente do *P. falciparum*, tem contribuído para a ressurgência global da malária nas últimas três décadas (MARSH, 1998).

Na ausência de uma vacina efetiva contra a malária, a quimioprofilaxia e a quimioterapia são atualmente as únicas armas capazes de controlar e combater os parasitas da malária. Assim sendo, o desenvolvimento de cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes às drogas é um grande obstáculo ao combate e controle desta protozoose e asseguram a permanência do problema global que a malária representa (COWMAN & CRABB, 2006).

1.5. Modelo Experimental na Malária Cerebral

Atualmente são reconhecidas quatro espécies distintas de *Plasmodium* de roedores: *Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelii*, *Plasmodium vinckei* e *Plasmodium chabaudi*, cada uma, com exceção do *Plasmodium berghei*, representada por duas ou mais subespécies. Os plasmódios de roedores são divididos em dois grupos: o grupo berghei (*P. berghei* e *P. yoelii*) e o grupo vinckei (*P. vinckei* e *P. chabaudi*). As similaridades entre os dois grupos são avaliadas em múltiplos aspectos, incluindo a morfologia dos parasitos no estágio sanguíneo, padrão de proteção cruzada, sorologia e polimorfismo enzimático (CARTER & DIGGS, 1977).

O modelo para pesquisa *in vivo* desenvolvido para o estudo da malária cerebral é o *Plasmodium berghei*, linhagem ANKA (MACKEY et al., 1980), conhecida como PbA.

Trata-se de um modelo com alto grau de reprodutibilidade, com histopatologia e manifestação clínica conhecidas. A infecção de camundongos pelo PbA resulta, em linhagens suscetíveis, uma síndrome letal conhecida como malária cerebral, em que os camundongos morrem de 7 a 9 dias após infecção em um estágio de coma associada com manifestações neurológicas (WRIGHT, 1968; WHITE & HO, 1992).

A síndrome neurológica ocorre de 6 a 14 dias após a infecção, acarretando uma mortalidade acumulativa de 90%. É baixa a parasitemia no momento da morte e as manifestações neurológicas referem-se a hemi ou paraplegia, desvio da cabeça, tendência a rolar quando estimulado, ataxia e convulsões. Os camundongos sobreviventes acabam morrendo com anemia severa e hiperparasitemia, sem sinais neurológicos 3 a 4 semanas após a infecção (GRAU et al., 1987).

O rompimento da barreira hemato-encefálica, detectada pelo vazamento de azul de Evans, microhemorragias, sequestro de macrófagos e plaquetas nas veias corticais, assim como o aumento da permeabilidade vascular no pulmão, são evidentes durante a infecção induzida pelo PbA (THUMWOOD et al., 1988; FAVRE et al., 1999).

1.6. Terapia com Células Tronco

Existe a tendência do desenvolvimento de uma nova área terapêutica utilizando o potencial das células tronco no tratamento de algumas doenças degenerativas. É consenso a capacidade de organismos adultos regenerarem tecidos como o epitélio intestinal, a pele, tecido nervoso e o sangue.

Células tronco, por definição, são capazes tanto de auto-renovação como diferenciação em diversos tipos celulares do organismo. São geralmente classificadas de acordo com sua capacidade em diferenciar nos diversos tecidos. Assim, podemos mencionar as células:

- Unipotentes: dão origem apenas a um tipo celular de tecido;

- Oligopotentes: originam tipos celulares de somente alguns tipos específicos de tecidos;
- Multipotentes: capazes de originar muitos tipos celulares de diversos tecidos;
- Pluripotentes: provém da medula óssea e dão origem a inúmeros tipos celulares dos muitos tecidos;
- Totipotentes: são as embrionárias e são capazes de originar todos os tipos celulares dos tecidos do organismo.

Estudos recentes têm transformado esta visão de restrição tecido-específica. Células-tronco de medula óssea mostram-se capazes de dar origem a um grande número de células de tipos não medulares.

O reparo de órgãos e tecidos é um fenômeno constante durante a vida de organismos complexos. Este processo pode ser dirigido por células-tronco que se encontram no tecido e que são providas por precursoras da medula óssea. Três mecanismos básicos são propostos para explicar como as células-tronco fazem o reparo de injúrias teciduais: i. Criação de um ambiente que aumente a regeneração de células endógenas; ii. Transdiferenciação (capacidade das células de se transformarem em qualquer tipo de tecido); iii. Fusão celular (PROCKOP et al., 2003). A regeneração completa dos tecidos é um processo complexo e demanda integração do tecido regenerado com os tecidos adjacentes e diferenciação. Estudos mostraram que células-tronco medulares possuem a capacidade de se infiltrarem em vários tecidos e órgãos quando infundidos sistemicamente, e esta infiltração têm mostrado ser estável a longo período (DEVINE et al., 2000). Mesmo as células infundidas na circulação periférica têm a habilidade de migrar para sítios específicos de injúria, o que sugere um evento complexo de sinalização, reconhecimento e reparo. Este fenômeno tem sido reportado em modelos animais de fratura de osso, isquemia cerebral e infarto do miocárdio (SHAKE et al., 2002; WANG et al., 2002).

A medula óssea contém populações de precursores celulares oligopotentes que dão origem às linhagens celulares do sangue e também uma porção de células multipotentes que podem se diferenciar em vários tipos celulares incluindo osso, cartilagem e células mesenquimais (PROCKOP, 1997). Mais recentemente, células da medula óssea demonstraram se diferenciar em células hepáticas (BLANC et al., 2000; PETERSEN et al., 1999), miócitos

(KAMO et al., 1990), neurônios e glia (BRAZELTON et al., 2000). Essas células demonstraram atravessar a barreira hemato-encefálica após infusão intravenosa e entrarem no cérebro (EGLITIS & MEZEY, 1997) e em áreas de desmielinização na medula espinhal (AKIYAMA et al., 2002; AKIYAMA et al., 2002b; INOUE et al., 2003; SASAKI et al., 2001). Além disso, têm sido relatado melhora funcional e redução da morte celular na região da zona isquêmica após infusão intra-cerebral (CHEN et al., 2001) e sistêmica (LI et al., 2002) de células estromais de medula óssea.

A plasticidade das células-tronco presentes em fígado, músculo esquelético, pâncreas e sistema nervoso não se restringe exclusivamente ao seu órgão de origem pois sua multipotencialidade permite que essas células gerem células de outros órgãos e tecidos (FERRARI et al., 1998).

Alguns dos alvos terapêuticos são órgãos considerados por muito tempo como incapazes de desenvolver quaisquer processos de regeneração, como o cérebro e o coração. Os relatos da constatação de que os tecidos adultos possuem células-tronco pluripotentes próprias (BELTRAMI et al., 2003; KRAUSE, 2002; PITTENGER et al., 1999), de que há migração de célula tronco do sangue periférico e sua diferenciação para tipos celulares residentes em órgãos como o coração (QUAINI et al., 2002) e de que células já diferenciadas podem proliferar em resposta a agressões teciduais (LERI et al., 2002), tem sido cada vez mais frequentes na literatura. Estes fatos são indicadores de que o processo de regeneração ocorre nestes tecidos, embora possa não ser eficiente para levar à cura dependendo do grau de dano tecidual instalado.

Estudos experimentais desenvolvidos para o tratamento de cardiopatia isquêmica crônica em ratos evidenciaram que as células-tronco de medula óssea foram capazes de tratar a insuficiência cardíaca (OLIVARES et al., 2004). Estes resultados animadores estimularam o teste de eficácia da terapia com células de medula óssea na cardiopatia chagásica no modelo murino com a cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*. Os camundongos transplantados apresentaram melhora na miocardite dois meses após o transplante. Nesta metodologia, houve ainda a possibilidade de monitorar a distribuição da repopulação das células-tronco porque foram adotadas células de camundongos transgênicos para a proteína verde fluorescente (GFP) ou para beta galactosidade de *Escherichia coli* (Gtrosa26) (SANTOS et al., 2004).

A administração de células derivadas de medula óssea constitui uma das mais novas estratégias promissoras no tratamento de danos neurais causados por acidente vascular cerebral (AVC). Vários estudos têm descrito os efeitos benéficos desse tratamento em modelos animais na fase aguda do AVC isquêmico (CHOPP & LI, 2002; MEZEY, 2007).

Em ratos adultos, submetidos à oclusão transitória ou permanente da artéria cerebral média, diferentes tipos de células-tronco (medula óssea de camundongos, medula óssea humana, cordão umbilical humano, etc) administrados por via intravenosa ou intra-arterial, acarretaram a diminuição da área isquêmica e melhor recuperação funcional comparados ao grupo controle (KONDZIOLKA et al., 2000).

A medula óssea contém uma população de células que secretam citocinas e fatores de crescimento como VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular) e bFGF (“basic fibroblast growth factor”) (HAMANO et al, 2000), que podem impedir o dano isquêmico das células endoteliais e pode ser associado com a melhora neurológica do infarto. Esses e outros fatores mostraram salvar o tecido neural lesionado pelo estresse isquêmico através de mecanismos como o sequestro de radicais livres, atividade antiapoptótica, atividade antiinflamatória e excitotoxicidade antiglutamato, promovendo assim a preservação do funcionamento neural após infarto cerebral (HIROUCHI & UKAI, 2002). Além disso, essas células produzem mediadores solúveis que atenuam a resposta imune (BERNSTEIN & SHEARER, 1988). Então, a influência trófica das células de medula óssea transplantadas que migraram para a lesão pode prevenir o cérebro isquêmico de lesões secundárias.

Embora viável, o uso terapêutico de células tronco mesenquimais de medula óssea envolve cultura de células por várias semanas antes do transplante, o que aumenta o risco de contaminação e atrasos no início do tratamento para além da fase aguda, momento em que este pode ser mais bem sucedido. Além disso o cultivo dessas células in vitro fora do seu ambiente natural pode acarretar modificações citogenéticas que podem por à prova a confiabilidade de sua integridade.

Um protocolo alternativo é o uso da fração mononuclear da medula óssea (CMoMO) em substituição às células tronco mesenquimais MSC. Além de progenitores hematopo iéticos e células diferenciadas, essa fração contém dois tipos de células tronco adultas que estão presentes

na medula óssea, ou seja, as células tronco mesenquimais e as células tronco hematopoéticas (ORKIN, 2000; WEISSMAN et al., 2001). As células-tronco mesenquimais são estimadas em 0,001 a 0,01% do total de células nucleadas da medula óssea (PITTENGER et al., 1999), e as células tronco hematopoéticas representam aproximadamente 0,0001% do total da população de células da medula óssea (ORKIN, 2000; WEISSMAN et al., 2001). Essas células tronco e as células progenitoras hematopoéticas têm sido descritas como capazes de serem quimioatraídas para tecidos lesionados e capazes de produzir e liberar várias citocinas e fatores tróficos (KRAUSE et al., 2001; CHOPP & LI, 2002; CRAIN et al., 2005; SHYU et al., 2006). Além disso, CmoMO também contém as células progenitoras endoteliais, que tem sido descritas contribuir com a revascularização de tecidos isquêmicos e reparação de endotélio lesionado. Essas observações endossam a fração mononuclear da medula óssea como uma candidata para ser usada em terapia celular. Com efeito, a utilização de células mononucleares da medula óssea demonstrou ser segura e eficaz em cardiopatias (PERIN et al., 2003; SOARES et al., 2004; STRAUER et al., 2008) e isquemias (YOSHIDA et al., 2003; SPRENGERS et al., 2008).

Em contraste ao longo processo necessário para obter as MSC, as CmoMO podem ser colhidas em 3-4 h e, portanto, o tratamento pode ser realizado durante a fase aguda da doença.

Poucos estudos estão disponíveis usando o transplante das CmoMO em modelos animais de AVC isquêmico. Estes estudos são importantes para a compreensão sobre o potencial molecular e celular e o mecanismo de ação das CmoMO em AVC.

Vários pesquisadores têm mostrado que células derivadas de medula óssea contribuem funcionalmente para a neoangiogênese durante a cura de ferimentos e isquemia de membros (MAJKA et al., 2003; ASAHARA et al., 1997; ASAHARA et al., 1999a; ASAHARA et al., 1999b; IWAGURO et al., 2002; KALLA et al., 2000; SCHATTEMAN et al., 2000; CROSBY et al., 2000; TAKAHASHI et al., 1999; LUTTUN et al., 2002; RAFII, 2000), infarto do miocárdio (ORLIC et al., 2001a; ORLIC et al., 2001b; KOCHER et al., 2001; JACKSON et al., 2001; EDELBERG et al., 2002), endotelização de enxertos vasculares (SHI et al., 1998, BHATTACHARYA et al., 2000, KAUSHAL et al., 2001, NOISHIKI et al., 1996), aterosclerose (SATA et al., 2002), neovascularização de órgãos linfóides e retinal (OTANI et al., 2002, GRANT et al., 2002, CRISA et al., 1999), vascularização durante crescimento neonatal (OTANI

et al., 2002) e crescimento de tumores (ASAHARA et al., 1999a, GRANT et al., 2002, CRISA et al., 1999, LYDEN et al., 2001, REYES et al., 2002, MOORE et al., 2002).

Em estudo pré-clínico, a introdução de células progenitoras endoteliais (EPCs) derivadas da medula óssea melhorou efetivamente a formação de vaso colateral, minimizando assim a isquemia em membros (ASAHARA et al., 1999b KALLA et al., 2000, TAKAHASHI et al., 1999, HILLEBRANDS et al., 2003, WAGERS et al., 2002, KRAUSE et al., 2001).

Em pacientes sofrendo de doença arterial periférica, a utilização de células autólogas mononucleares de medula óssea dentro do músculo gastrocnêmico isquêmico resultou em restauração da função do membro (TATEISHE-YUYAMA et al., 2002).

O sucesso da revascularização de membros isquêmicos depende da formação balanceada de vasos linfáticos e sanguíneos. A disfunção linfática resulta em formação de edema que contribui para a não cicatrização de úlceras. A introdução de VEGF-C (Fator de Crescimento Endotelial Vascular) tem sido efetiva na aceleração da recuperação funcional de membros isquêmicos pelo aumento da linfangiogênese e angiogênese e diminuição da formação de edema (YOON et al., 2003, SAARISTO et al., 2002, SZUBA et al., 2002).

Terapias com células tronco adultas de medula óssea estão sendo desenvolvidas no Brasil em alguns Centros de Terapia Celular. Em se tratando de medicina regenerativa, o transplante de células-tronco é considerado um procedimento seguro para doenças cardíacas, hepáticas e neurológicas, dentre outras.

Em casos de lesões decorrentes de autoimunidade, tais como diabetes tipo 1, a estratégia difere porque é preciso remover as células auto-reativas no paciente por imunossupressão com agentes quimioterápicos, e depois, o paciente recebe de volta as células da medula que foram mantidas criopreservadas para reconstituir um novo sistema imune livre de auto-agressão. Em 2008, por meio de uma abordagem clínica que recorre a altas doses de quimioterapia seguidas de um transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas do sangue periférico no diabete melito do tipo 1 recém-diagnosticado, Voltarelli et al. conseguiram livrar 14 diabéticos da necessidade diária de tomar doses de insulina, dentre 21 pacientes transplantados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

Todos os protocolos terapêuticos adotados são frutos de pesquisa básica onde o principal modelo animal para rastreamento do destino das células-tronco provém de transgenia para beta-galactosidase ou para a proteína fluorescente verde (GFP). A transgenia para obtenção de células fluorescentes neste camundongo é produto da inserção da proteína bioluminescente da água viva *Aequorea victoria*. A expressão da GFP sob excitação luminosa ocorre em todas as células, com exceção de eritrócitos e pêlos (OKABE et al.,1997).

Considerando a dificuldade de obtenção de uma droga eficaz para a malária humana, há interesse no desenvolvimento de um tratamento alternativo explorando o potencial regenerativo de células de medula óssea, uma opção de tratamento de baixo custo, relativamente simples e facilmente aplicável, caso sejam comprovadas sua segurança e eficácia.

Para esta finalidade, pretende-se transplantar células de medula óssea em camundongos acometidos pela malária cerebral e avaliar a distribuição destas células no cérebro, assim como o eventual benefício para o hospedeiro na reversão do quadro neurológico e redução da mortalidade.

2. Objetivos

O presente trabalho visa avaliar o efeito do transplante de células de medula óssea de camundongos transgênicos C57BL/6 GFP HET em camundongos C57BL/6/JUnib infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA.

Os principais objetivos específicos são:

- 1 – Avaliação da sobrevivência dos camundongos infectados pelo *P. berghei* ANKA e tratados com células de medula óssea;
- 2 – Avaliação da sobrevivência dos camundongos infectados pelo *P. berghei* ANKA tratados com células de medula óssea e com cloroquina;
- 3 – Avaliação da ação das células de medula óssea na parasitemia dos animais infectados pelo *P. berghei* ANKA;
- 4 – Avaliação da integridade hemato-encefálica dos camundongos com malária cerebral;
- 5 – Detecção de hemácias parasitadas pelo *P. berghei* ANKA nos capilares cerebrais dos camundongos com malária cerebral;
- 6 – Detecção de células de medula óssea no cérebro dos camundongos com malária cerebral.

3. Material e Métodos

3.1. Camundongos

Camundongos livres de patógenos específicos (SPF), fêmeas isogênicas da linhagem C57BL/6/JUnib, com idade mínima de 7 semanas foram adotados para desenvolvimento da malária cerebral.

Os camundongos C57BL/6 GFP HET foram adotados como doadores de células da medula óssea. Todos os animais foram provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Unicamp (CEMIB).

Os camundongos C57BL/6/JUnib foram mantidos em rack ventilada no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Biologia Animal na Unicamp, com ração Nuvilab CR-1 autoclavada e água filtrada *ad libitum*. O protocolo experimental n ° 1078-1 foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA/Unicamp).

Os camundongos transgênicos C57BL/6 GFP HET foram mantidos nas dependências do CEMIB, CQB 0237/07, CiBIO 005/08.

3.2. *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) e *Plasmodium berghei* ANKA GFP (PbA GFP)

Foram testadas duas linhagens de *Plasmodium*: o *Plasmodium berghei* ANKA, doado pelo Prof. Dr. Laurent Rénia (Institut Cochin, Paris, França) ao Prof. Dr. Fábio T. M. Costa (Instituto de Biologia, Unicamp) e o *Plasmodium berghei* ANKA GFP, gentilmente cedido pelo Dr. Andrew Waters (Leiden University Medical Center, Leiden (Holanda) à Profa. Dra. Rosa Elias (USP/SP).

Os camundongos foram infectados por injeção intraperitoneal de 10^6 hemácias parasitadas de acordo com o protocolo descrito por Engwerda et al. (2005), provenientes de animais que receberam um volume de 100 μ L de papa de hemácias, até então mantidas em criotubo a -80°C.

3.3. Transplante de Células Mononucleares de Medula Óssea (CMoMO)

Conforme preconizado por Soares et al. (2004), células retiradas por perfusão da medula do fêmur e tíbia dos camundongos C57BL/6 EGFP foram purificadas por centrifugação em gradiente de Ficoll (Histopaque) a 1000 x g por 15 minutos (Histopaque 1119 e 1077, 1:1; Sigma®). Após duas lavagens em meio RPMI as células foram ressuspensas em NaCl 0,15M, foi feito teste de viabilidade, contagem em câmara de Neubauer e finalmente as células foram injetadas intravenosamente no 2º dai pelo plexo oftálmico dos animais a serem avaliados. O número de células variou para cada experimento na faixa de 3×10^6 a $4,6 \times 10^7$. Os animais foram anestesiados com ketamina/xylasina. O teste de viabilidade celular foi realizado com o azul de Trypan. Os camundongos do grupo controle, não transplantados, receberam injeção intravenosa de 200 μ L do NaCl 0,15 M pelo plexo oftálmico.

3.4. Transplante de Células Totais de Medula Óssea (CTMO)

Conforme descrito por Braga et al. (2008), os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a medula do fêmur e tíbia foram perfundidas com meio RPMI. Após extração das células foi realizada a lavagem por centrifugação a 800xg por 10 minutos, foi feito teste de viabilidade, contagem em câmara de Neubauer e finalmente as células foram injetadas intravenosamente pelo plexo oftálmico dos animais a serem avaliados. O número de células

variou para cada experimento na faixa de 3×10^6 a 10^7 células. Os animais foram anestesiados com ketamina/xylasina. O teste de viabilidade celular foi realizado com o azul de Trypan. Os camundongos do grupo controle, não transplantados, receberam injeção intravenosa de 200 μ L do NaCl 0,15 M pelo plexo oftálmico.

3.5. Tratamento com cloroquina

Quando necessário, foi feita associação do tratamento de células CMO com Cloroquina (Chloroquine diphosphate salt - Sigma®), a partir dos sinais neurológicos da malária cerebral, como: paralisia total ou parcial de membros, ataxia (incapacidade de coordenar os movimentos dos músculos voluntários), perda visual e coma. Os camundongos foram tratados com doses de 0,8 mg/dia/animal pela via intraperitoneal, até o desaparecimento dos sinais neurológicos da malária cerebral, esquema adaptado conforme a evolução da doença nos camundongos.

3.6. Detecção de células GFP de medula óssea no cérebro de camundongos C57BL/6J Unib infectados pelo PbA.

Com o intuito de avaliar o efeito da malária cerebral na possível migração da CMO para as áreas de lesão no cérebro, três grupos de camundongos C57BL/6J Unib receberam os seguintes tratamentos:

- 1) Três camundongos sem infecção pelo PbA e sem injeção de CMO GFP;
- 2) Dois camundongos não infectados e que receberam $4,6 \times 10^7$ CMO GFP e sacrificados quatro dias após a inoculação das células;
- 3) Um animal infectado com PbA, que recebeu $4,6 \times 10^7$ CMO GFP no 2º dia, foi sacrificado no 10º dia, quando apresentou sinais clínicos da malária cerebral.

Todos os animais tiveram os cérebros cuidadosamente removidos e mergulhados em sacarose 20% “overnight” na geladeira. Em seguida, foram embebidos em Tissue-TeK (Sakura®), congelados em nitrogênio líquido e os blocos mantidos em freezer a -20°C.

Cortes histológicos com 12µm de espessura foram preparados em criostato (Micron, HM 525, Alemanha) e montados em lâminas silanizadas, visando diminuir a fluorescência residual. Os cortes montados em PBS pH 7,2 com lamínula, foram examinados sob o microscópio de fluorescência - Olympus® (Tokyo, Japão), acoplado a uma câmera digital para captura de imagens (Image Proplus Software, Olympus®).

3.7. Detecção de formas parasitárias do PbA no cérebro de camundongos

A pesquisa dos parasitos foi feita em cortes de cérebro de animais infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA. Camundongos com malária cerebral positiva (CM+), apresentando sintomas neurológicos, foram sacrificados entre o 6º e 8º dai, os cérebros imediatamente removidos, sem perfusão e fixados em formaldeído 4% tamponado por 6h à temperatura ambiente. A coloração foi feita pela Hematoxilina-Eosina. Os parasitos foram visualizados em microscópio Zeiss Axiophot®.

3.8. Monitoramento da integridade da barreira hemato-encefálica em camundongos

Três grupos de camundongos foram avaliados: animais infectados com PbA, animais infectados com PbA + $4,6 \times 10^7$ CMO MO no 2º dai e o grupo controle, animais não infectados pelo PbA e sem CMO MO.

A permeabilidade da barreira hemato-encefálica foi determinada inoculando 200µL de solução de azul de Evans 1% em PBS pelo plexo oftálmico.

O procedimento foi realizado quando os animais infectados apresentaram os sinais clínicos de malária cerebral, o que se deu entre o 5º e 6º dia.

Após 1 hora da inoculação do azul de Evans, os animais foram sacrificados e os respectivos cérebros imediatamente removidos e fotografados em microscópio estereoscópico (Zeiss SV-11®) com captação de imagens pelo software Image Manager 50 Leica®, na mesma posição e sob a mesma intensidade de luz.

3.9. Análise Estatística

A sobrevivência dos camundongos C57BL/6JUnib infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA obtida nos grupos experimentais (controle, transplantados com células mononucleares da medula óssea (CMoMO), tratados com cloroquina, transplantados com células totais de medula óssea (CTMO), transplantados com CTMO + tratamento com cloroquina) foi avaliada pela análise de Variância de Medidas Repetidas e o teste de Duncan, executados pelo programa estatístico SAS (SAS Institute 1987).

4. Resultados

4.1. Determinação da Sobrevivência de camundongos C57BL/6JUnib infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA

4.1.1. Tratamento com células mononucleares de medula óssea (CMoMO)

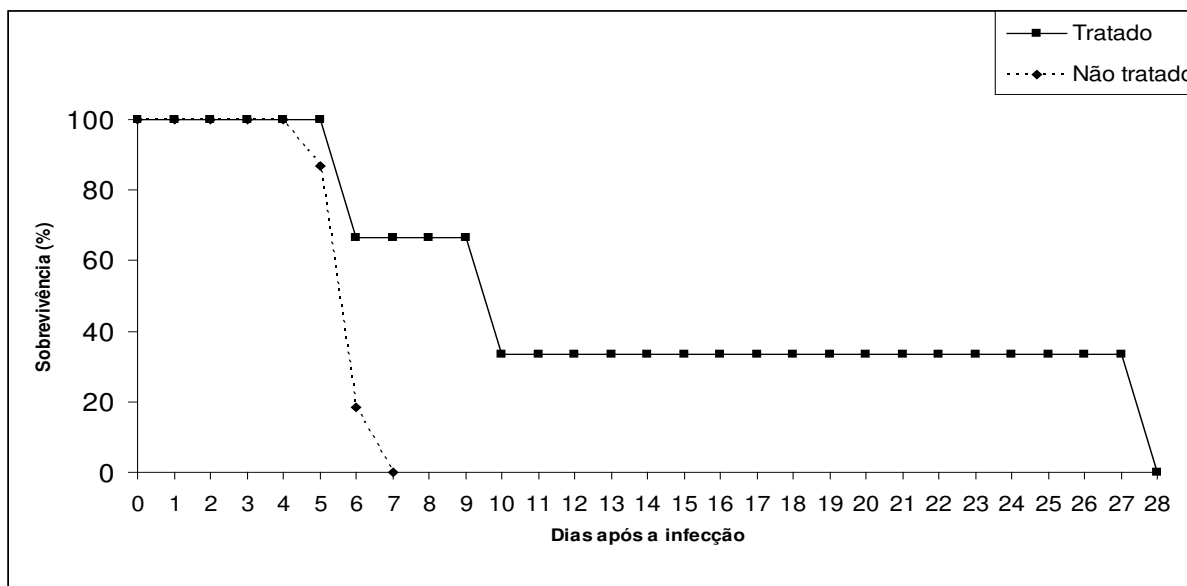


Figura 4: Sobrevivência de camundongos infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA GFP (PbA GFP). Linha pontilhada: resultado de 10 animais infectados com PbA GFP;

Linha contínua: 3 animais infectados com PbA GFP + inóculo de 10^7 CMoMO no 2º dai.

Com o objetivo de avaliar o efeito das CMoMO na sobrevivência dos animais, dois grupos de animais receberam 10^6 eritrócitos infectados de PbA GFP. O primeiro grupo (n=3) recebeu também no 2º dai 10^7 CMoMO de medula óssea adulta e o segundo grupo, o controle (n=10), recebeu 200µL de salina. Como mostra a Figura 4, um animal morreu no 6º dai, outro no 10º dai e o 3º animal no 28º dai, todos apresentando sinais clínicos de malária cerebral (ataxia, paralisia, coma). O 3º animal embora tivesse apresentado sinais clínicos de MC no 6º dai com perda do movimento dos membros inferiores teve uma melhora significativa a partir do 8º dai, perdurando até o 25º dai, inclusive com recuperação dos movimentos, quando novamente voltou a exibir os sinais clínicos da MC. Nesse momento utilizamos terapia adjuvante administrando glicose via oral e aquecimento artificial com o intuito de minimizar a hipotermia e hipoglicemia, sintomas característicos durante desenvolvimento de MC em murinos e a dificuldade do animal em se alimentar pela ataxia e paralisia. O quadro clínico se manteve até o 28ºdai quando então o animal morreu. Os animais do grupo controle apresentaram uma mortalidade acumulativa de 100% até o 7º dai, assim distribuídos: 13,2% morreram no 5º dai; 68,4% no 6º dai e 18,4% no 7º dai. Estes resultados demonstram a possível influência de CMoMO na melhora do quadro clínico da MC, com aumento de até 21 dias do período de sobrevivência após infecção.

4.1.2. Sobrevivência de camundongo C57BL/6JUnib infectado por *Plasmodium berghei* ANKA, tratados com células totais de medula óssea (CTMO) comparado ao grupo não tratado

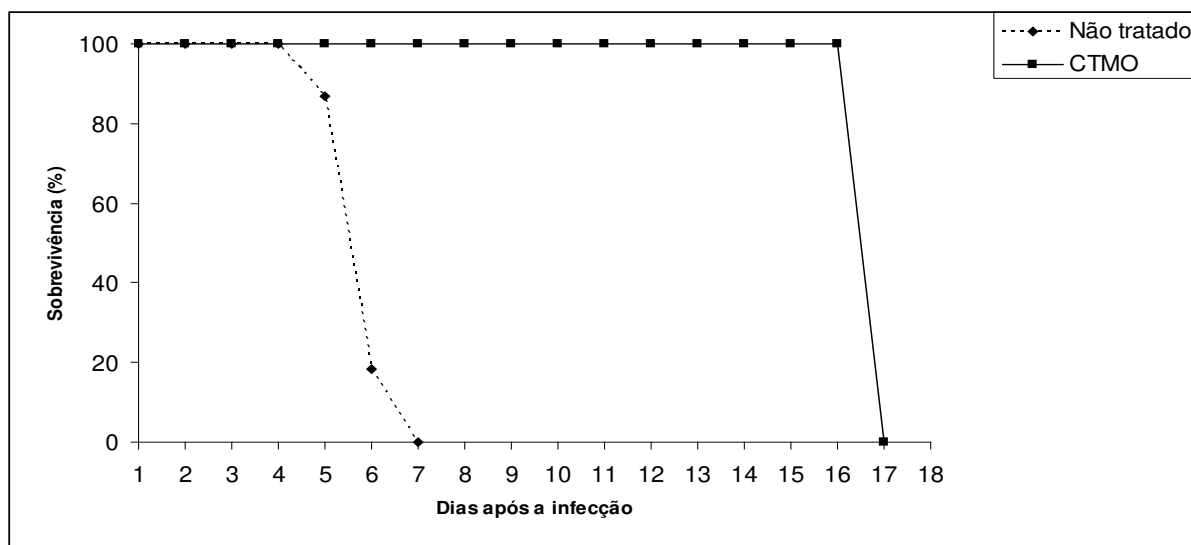


Figura 5: Sobrevivência dos camundongos C57BL/6JUnib infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA GFP (PbA GFP). *Linha pontilhada:* 8 animais infectados com PbA GFP; *Linha contínua:* 1 animal infectado com PbA GFP + inóculo de 10^7 CTMO no 2º dai.

Visando testar o potencial das CTMO um animal recebeu 10^6 EI de PbA GFP e no 2º dai 10^7 de células tronco totais de medula óssea sem purificação pelo gradiente de Ficoll enquanto o grupo controle (n=8) recebeu 10^6 EI de PbA GFP e no 2º dai 200µL de salina. O animal que recebeu CTMO apresentou no 6º dai cegueira bilateral, porém nenhum sinal clínico de MC foi observado; por volta do 9º dai, mostrou sinais de hipotermia e prostração, se movimentando pouco na gaiola, e este quadro perdurou até o 14º daí. Foi administrada glicose via oral e o animal foi mantido aquecido artificialmente nesse período.

Houve melhora considerável até o 17º dai quando o animal novamente entrou em estado de prostração e morreu 10 horas depois, ainda no 17º dai. Os animais do grupo controle morreram até o 7º dai.

4.1.3. Sobrevivência de camundongos C57BL/6JUnib infectados por *Plasmodium berghei* ANKA, tratados com Cloroquina ou células totais de medula óssea (CTMO) associadas à cloroquina

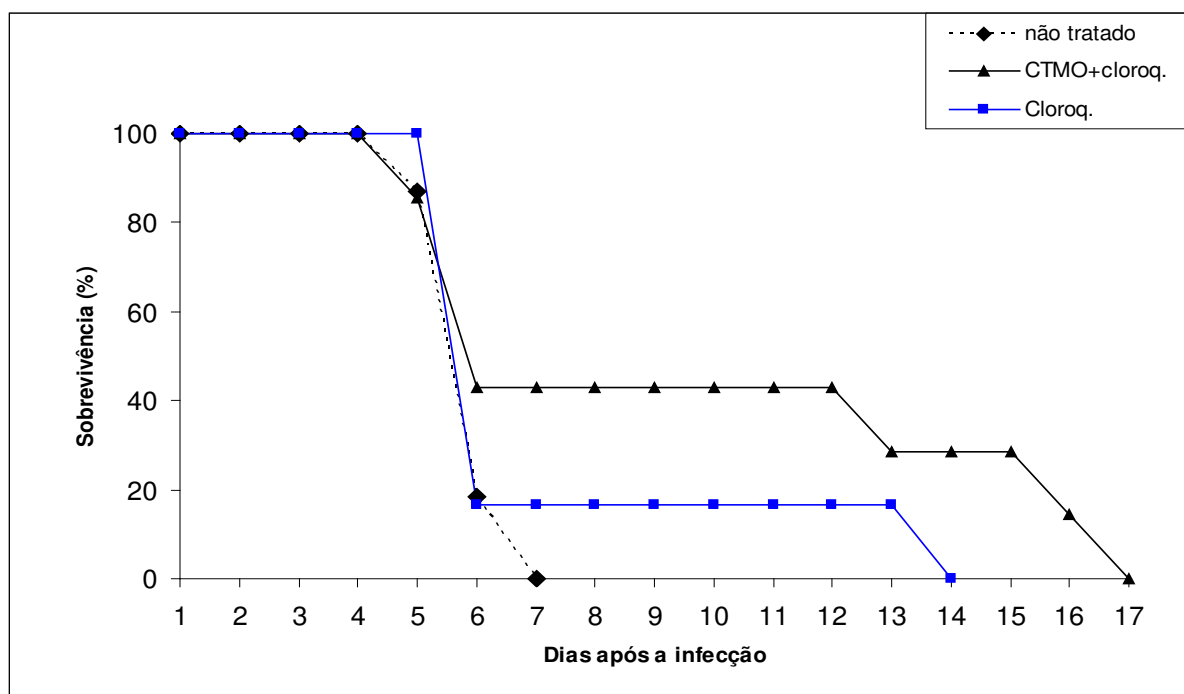


Figura 6: Sobrevivência dos camundongos C57BL/6JUnib infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA GFP (PbA GFP). *Linha Tracejada:* 10 animais infectados com PbA GFP; *Linha Contínua Azul:* 6 animais infectados com PbA GFP + cloroquina após sinais clínicos de MC; *Linha Contínua Preta:* 7 animais infectados com PbA GFP + inóculo de 10^7 CTMO no 2ºdai + cloroquina após sinais clínicos de MC;

A Fig. 6 (linha contínua azul) ilustra um grupo de seis animais que foram infectados com 10^6 EI de PbA GFP e que receberam, a partir dos sinais clínicos de MC, 0,8mg/dia/animal de cloroquina. Cinco animais morreram no 6º dai, dos quais quatro receberam uma única dose de cloroquina no quinto dia de infecção. Dois animais apresentaram cegueira. Um único animal sobreviveu até o 14º dai, tendo recebido quatro doses de cloroquina do 6º ao 9º dai mantendo um quadro estável até o 14º dai quando entrou em estado de prostração intensa e morreu.

Estes resultados demonstram que apenas a cloroquina administrada aos animais infectados, após a manifestação de sinais clínicos de MC, não impediu a morte dos animais.

Visando minimizar a severidade da fase aguda da malaria cerebral, sete camundongos infectados com 10^6 EI de PbA GFP (linha contínua preta) receberam no 2º dai inóculo de 10^7 CTMO e foram tratados, a partir dos sinais clínicos de MC, com 0,8 mg/dia/animal de cloroquina, via intraperitoneal, até o desaparecimento dos sinais clínicos de MC. Como apresentado na Fig.6, quatro animais morreram até o 6º dai. O animal que sobreviveu até o 13º dai recebeu cloroquina e glicose no 5º e 6º dai, pois apresentavam prostração e dificuldade para se alimentar; houve melhora clínica e o animal voltou a se movimentar bem na gaiola e a comer ração. No 5º dai observou-se também cegueira bilateral, porém esse quadro se reverteu após 24hs. O animal se manteve bem, se movimentando e se alimentando, sem hipotermia e cegueira até o 13º dai, quando voltou a ficar prostrado; foi administrada nova dose de cloroquina e glicose, mas o animal morreu 12hs depois, ainda no 13º dai.

O animal que sobreviveu até o 16º dai recebeu cloroquina e glicose do 5º ao 7º dai, nesse período apresentou prostração e cegueira bilateral. O quadro de cegueira bilateral se reverteu após 24hs. Até o 15º dai o quadro clínico do animal era bom, se locomovia e se alimentava e não voltou a apresentar cegueira. Na segunda metade do 15ºdai a animal voltou a apresentar prostração e hipotermia, foi administrada nova dose de glicose e cloroquina, o animal morreu 20hs depois, no 16ºdai.

O animal que sobreviveu até o 17ºdai recebeu cinco doses de cloroquina, do 5º ao 9ºdai, nesse período apresentou hipotermia, se locomovia lentamente pela gaiola. A partir

do 10º dia passou a se locomover melhor e a se alimentar, o animal manteve esse quadro até o 17º dia quando então voltou a ficar prostrado, nova dose de cloroquina foi administrada, mas o animal morreu 3hs depois, ainda no 17º dia. Os animais do grupo controle (n=10) receberam apenas 10^6 EI de PbA GFP e 200µL de salina no 2º dia e todos morreram até o 7º dia.

Como pode ser observado na figura 6, a administração de células totais de medula óssea aumentou a sobrevida média dos camundongos.

4.2. Determinação da Parasitemia de camundongos C57BL/6J Unib infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA

Segundo Golenser et al (2006) os camundongos normalmente morrem quando a parasitemia está entre 5 e 15%, o que ocorre entre o 6º e 8º dia da infecção.

4.2.1. Tratamento de C57BL/6JUnib com células totais de medula óssea (CTMO)

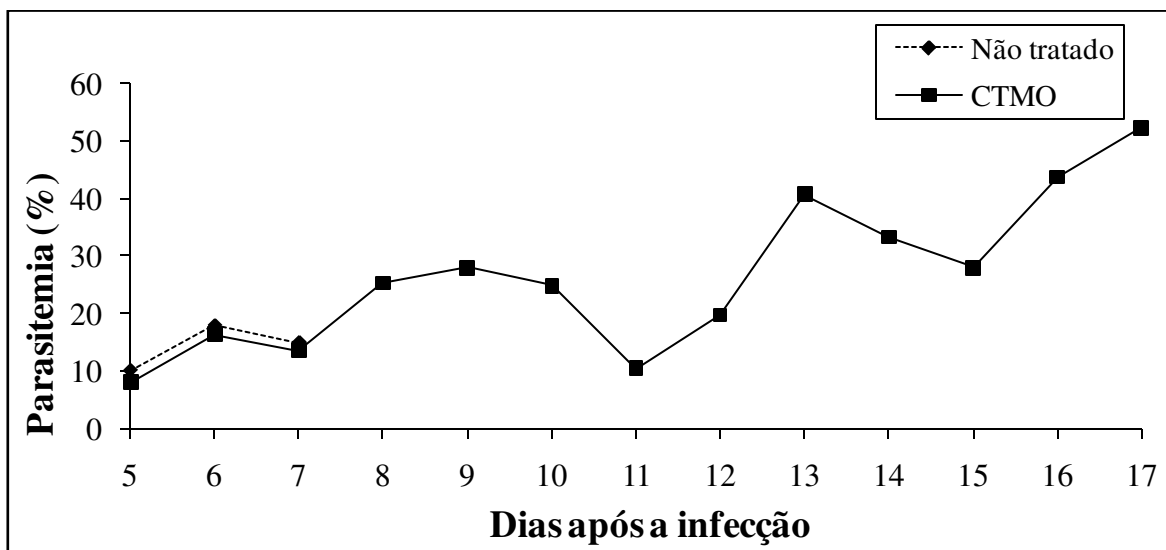


Figura 7: Parasitemia dos camundongos C57BL/6JUnib infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA GFP (PbA GFP). Linha pontilhada: 4 animais infectados com PbA GFP; Linha Contínua: 1 animal infectado com PbA GFP + 10^7 de CTMO

Na figura 7 é possível comparar a parasitemia do animal que recebeu apenas PbA GFP e outro animal que recebeu no 2º dia 10^7 de células totais de medula óssea (CTMO). Houve tendência da injeção de células da medula óssea controlar a parasitemia (11 dia), e ampliar a sobrevivência em 10 dias, quando comparado ao grupo controle.

4.2.2. Tratamento de C57BL/6JUnib com células totais de medula óssea (CTMO) , associada ao tratamento com cloroquina.

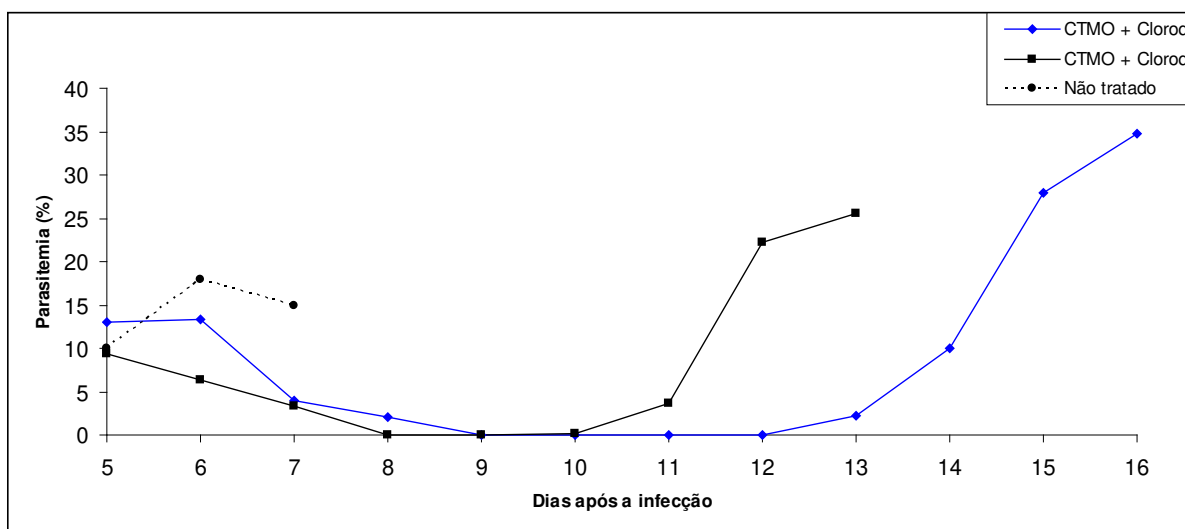


Figura 8: Parasitemia dos camundongos C57BL/6JUnib infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA GFP (PbA GFP). *Linha pontilhada:* animal infectado com PbA GFP; *Linhas contínuas:* animais infectados com PbA GFP + 10^7 de CTMO + Cloroquina após sinais clínicos da MC.

É possível comparar na Fig. 8 a parasitemia do animal que recebeu apenas PbA GFP e 2 outros que receberam no 2º dia 10^7 CTMO e foram tratados com cloroquina a partir dos sinais clínicos de MC. Foram dadas duas doses de cloroquina (5º e 6º dia) para o animal que morreu no 13º dia e três doses de cloroquina (5º, 6º e 7º dia) no caso do animal que morreu no 16º dia.

Quando comparamos a sobrevivência de animais que receberam apenas cloroquina, mesmo com 4 doses (Fig. 6) é possível constatar a eficácia do tratamento com células da medula óssea.

Comparando os resultados expressos nas Figuras 7 e 8, podemos observar que o animal tratado com células totais de medula óssea, mesmo sem a proteção da cloroquina e

com altas taxas de parasitemia (8º dai = 25,3% e 17º dai = 52,3%) sobreviveu 10 dias a mais que o grupo não tratado.

Em se tratando da sobrevivência dos animais, apesar do grupo tratado que recebeu apenas células mononucleares da medula óssea resultar em um único camundongo sobrevivente aos 28 dias após a infecção, dado que inviabiliza a análise estatística, convém enfatizar que o tratamento com células mononucleares induziu melhoria no quadro neurológico dos camundongos que superaram 7 dias da infecção, conforme consta na descrição dos itens 4.1.1 e 4.1.2.

A análise estatística da parasitemia dos camundongos foi feita com os resultados do 5º, 6º e 7º dai. Foram comparadas as parasitemias de animais tratados com células totais da medula óssea e células totais da medula óssea associados à cloroquina (Fig 8). Houve diferença significativa apenas para o grupo associado com a cloroquina (anexo1), onde houve o controle da parasitemia.

4.3. Monitoramento da Integridade da Barreira Hemato-Encefálica

A barreira hemato-encefálica é uma interface altamente especializada, estrutural e funcionalmente, entre o espaço intravascular e o sistema nervoso central (HAWKINS & DAVIS, 2005)

A adesão dos eritrócitos infectados nos endotélios vasculares na malária grave, causada pelo *P. falciparum*, provoca o bloqueio do fluxo sanguíneo, reduzindo a perfusão nos tecidos e consequentemente o suprimento de oxigênio, gerando assim um ambiente hipóxico e hipoglicêmico.

Essas alterações no metabolismo sistêmico levam a distúrbios na integridade funcional e estrutural das células endoteliais cerebrais, provocando a quebra da barreira hemato-encefálica, e consequentemente hemorragia cerebral (MEDANA & TURNER, 2006).

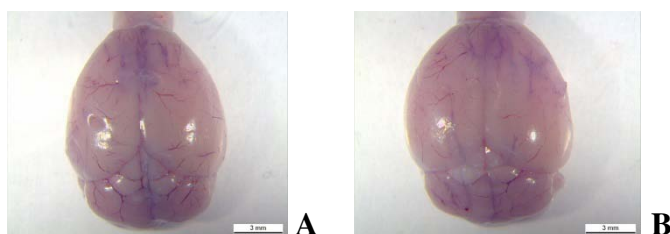
Considerando que a barreira hemato-encefálica é um ponto crítico de interação parasito-hospedeiro na MC foi avaliado o comportamento das células mononucleares de medula óssea na proteção dessa integridade.

Os animais não infectados não apresentaram o tecido nervoso central corado pelo azul de Evans (Fotomicrografia 1). Em contraste, os animais infectados pelo PbA apresentaram graus variados de coloração e concentração em determinadas seções do cérebro, principalmente na região do bulbo olfatório (Fotomicrografia 2) no 5^a dia após a infecção por PbA.

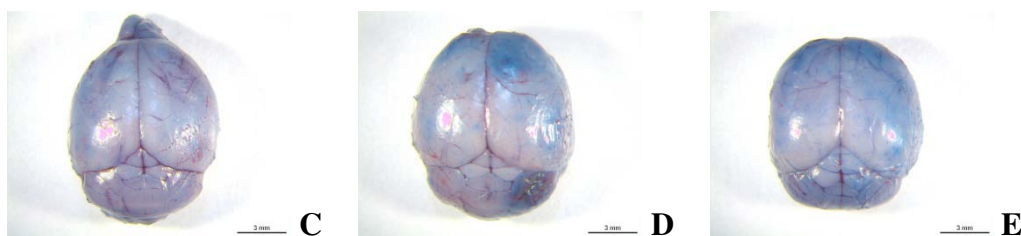
Os animais que receberam a injeção de células de medula óssea no 2^o dia e foram sacrificados quatro dias mais tarde, com sinais clínicos de malária cerebral, evidenciaram o extravazamento do azul de Evans em toda a extensão do cérebro.

Estes resultados que indicam o rompimento da barreira hemato-encefálica são esperados, mesmo com o tratamento dos animais com a injeção de células mononucleares da medula óssea porque a lesão cerebral induzida pelo PbA dificilmente teria condições de se regenerar em 4 dias. Portanto, a validação da quebra da barreira hematoencefálica, indicada pelo extravazamento do azul de Evans possivelmente só se aplique após a regeneração dos vasos.

Fotomicrografia 1: Cérebros de camundongos C57BL/6/JUnib do grupo controle: sem PbA, sem tratamento pelas CMoMO (Objetiva 10x).



Fotomicrografia 2: Cérebros de camundongos infectados com PbA, com sinais clínicos de malária cerebral, sem tratamento pelas CMoMO, no 5º dai.



Fotomicrografia 3: Cérebros de camundongos infectados com PbA + $4,6 \times 10^7$ CMoMO no 2ºdai, sacrificados após manifestação de sinais clínicos da malária cerebral, no 6º dai.



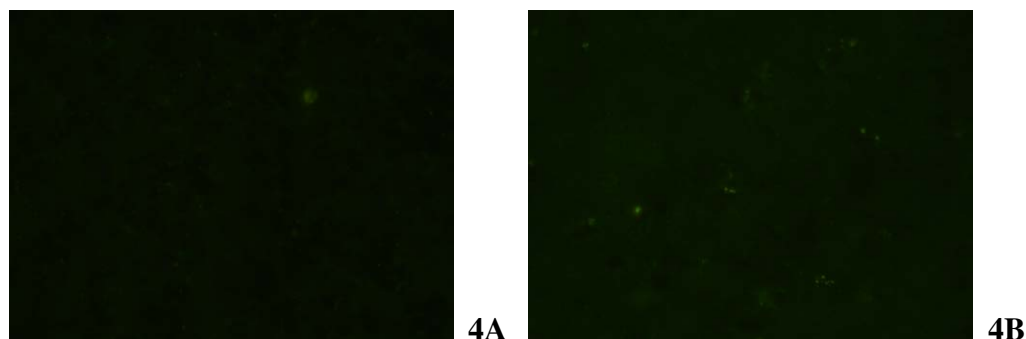
Os animais não infectados não apresentaram o tecido nervoso central corado pelo azul de Evans (Fotomicrografia 1). Em contraste, os animais infectados pelo PbA apresentaram graus variados de coloração e concentração em determinadas seções do cérebro, principalmente na região do bulbo olfatório (Fotomicrografia 2) no 5^a dia após a infecção por PbA.

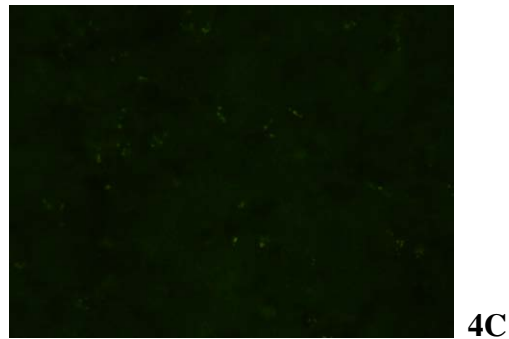
Os animais que receberam a injeção de células de medula óssea no 2^o dia e foram sacrificados quatro dias mais tarde, com sinais clínicos de malária cerebral, evidenciaram o extravazamento do azul de Evans em toda a extensão do cérebro.

Estes resultados que indicam o rompimento da barreira hemato-encefálica são esperados, mesmo com o tratamento dos animais com a injeção de células mononucleares da medula óssea porque a lesão cerebral induzida pelo PbA dificilmente teria condições de se regenerar em 4 dias. Portanto, a validação da quebra da barreira hemato-encefálica, indicada pelo extravazamento do azul de Evans possivelmente só se aplique após a regeneração dos vasos.

4.4. Detecção de células GFP de medula óssea no cérebro de camundongos C57BL/6JUnib infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA

Fotomicrografia 4: Bulbo olfatório de camundongo C57BL/6JUnib sem infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA, sem tratamento com célula mononuclear de medula óssea. Microscopia de fluorescência (Objetiva 60x).

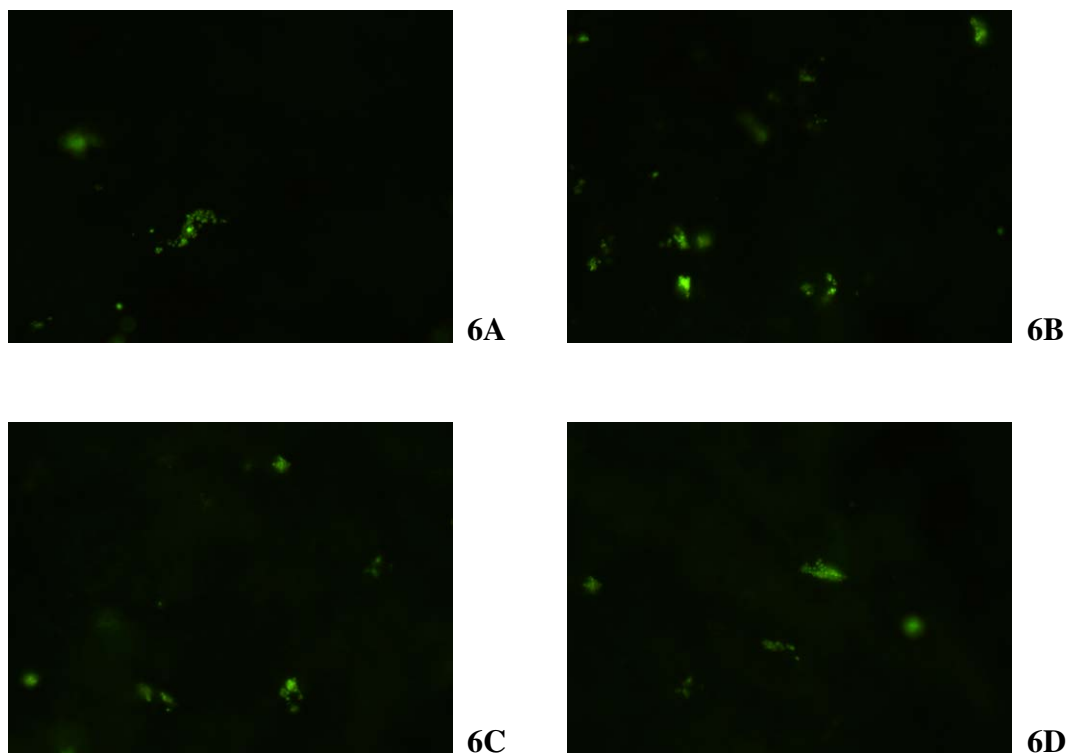




Fotomicrografia 5: Células GFP de medula óssea em bulbo olfatório de camundongo C57BL/6/JUnib sem infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA, 4 dias após a inoculação de $4,6 \times 10^7$ CMoMO GFP. Microscopia de fluorescência (Objetiva 60x).



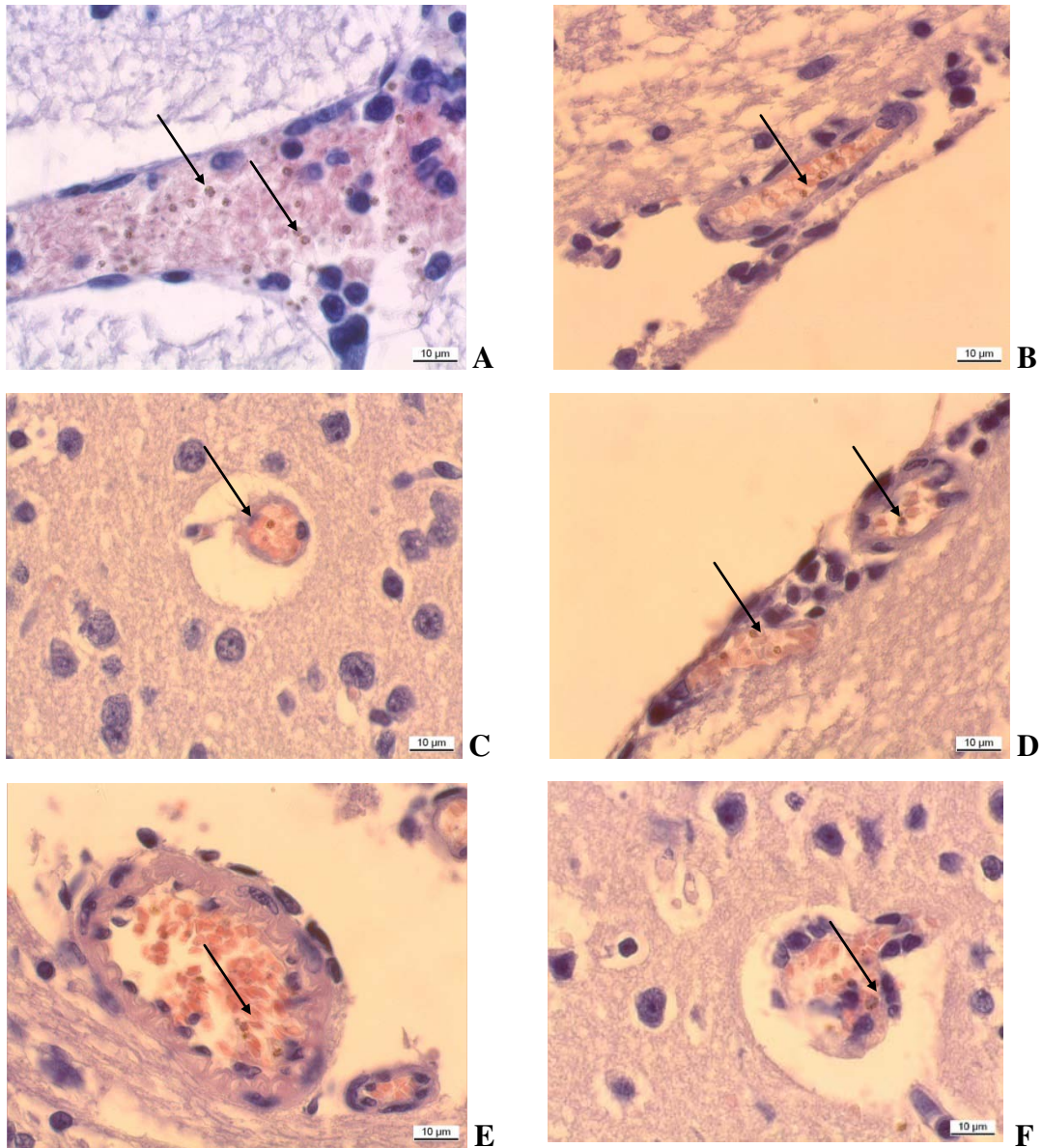
Fotomicrografia 6: Células GFP de medula óssea em bulbo olfatório de camundongo C57BL/6/JUnib infectado pelo *Plasmodium berghei* ANKA, 8 dias após a inoculação de $4,6 \times 10^7$ CMoMO GFP. Microscopia de fluorescência (Objetiva 60X).



É possível observar a presença das células GFP nos animais que receberam as células de medula óssea, com ou sem infecção pelo PbA. O número de células GFP detectadas no bulbo é maior nos animais com a malária cerebral. Foi possível constatar a presença de células GFP ao redor de vasos (6A,6B,6C,6D)

4.5. Detecção de formas parasitárias do PbA no cérebro de camundongos

PRANCHA I – Microfotografia de cérebro de camundongo C57BL/6/JUnib após 6 dias de infecção por *Plasmodium berghei* ANKA. As setas indicam a presença de esquizontes no interior de vasos cerebrais. Coloração HE (Objetiva 100x)



5. Discussão

A malária cerebral é a mais grave manifestação da infecção pelo *Plasmodium falciparum*, sendo responsável por alta taxa de mortalidade de crianças no continente africano.

Modelos experimentais da malária cerebral são bem aceitos porque há várias linhagens de camundongos suscetíveis à infecção por várias espécies de *Plasmodium*, fato que contribui para a compreensão da patogênese da malária (DE SOUZA & RILEY, 2002). Vale ressaltar que a interpretação dos resultados obtidos no modelo murino de malária cerebral deve ser feita com cautela porque em roedores, o leucócito é o tipo celular predominantemente sequestrado na microcirculação cerebral, ao contrário da malária cerebral humana, onde o alvo de adesão é o eritrócito (ADAMS et al., 2000; NEILL & HUNT, 1992; POLDER et al., 1992). Entretanto, já ficou comprovada em crianças a presença de monócitos aderidos ao endotélio (GRAU & KOSSODO, 1994). Os sintomas clínicos apresentados pelos camundongos suscetíveis também evidenciam agonia respiratória com acidose láctica, anemia e nefrite, muito semelhantes à malária por *P. falciparum* (VAN DER HEYDE et al., 2001) e o edema pulmonar induzido pelo PbA em C57BL/6 foi relatado por Egima et al. (2007).

Alta percentagem de camundongos C57BL/6 infectados pelo PbA desenvolve sintomas cerebrais entre o quinto e sétimo dia de infecção. Apesar da parasitemia se manter baixa, os camundongos morrem em dois ou três dias (JENNINGS et al., 1998; GRAU et al., 1987).

Nos 38 animais que constituíram o grupo controle deste estudo, a evolução da malária cerebral mostrou-se extremamente regular porque todos os C57BL/6JUnib desenvolveram os sinais clínicos da malária cerebral, desde o comprometimento da atividade motora e respiratória, paralisia, hipotermia, tendência a rolar, convulsão antes do coma e morte em sete dias (13,16% no 5º dia, 68,42% no 6º dia e 18,42% no 7º dia). A evolução para a cegueira ocorreu na maioria dos camundongos. Foi interessante observar a

aparente reversão da cegueira em dois animais dos 7 que receberam células da medula óssea associadas a cloroquina.

O branqueamento da retina é um fenômeno que ocorre em algumas crianças com malária cerebral, porém não parece afetar a acuidade visual dos pacientes observados após um mês do coma (BEARE et al., 2004 e 2009). Este fenômeno é pouco relatado em função da criança estar muito comprometida, o que inviabiliza o diagnóstico dos oftalmologistas que teriam que fazer uma angiografia para a constatação desta lesão. O branqueamento da retina se deve a um edema intracelular reversível em resposta à hipóxia, provocada pelo sequestro de hemácias infectadas pelo *P. falciparum* e se assemelha à descrição de alguns casos de oclusão da veia central da retina (LEWALLEN et al., 1996; HERO et al., 1997; LEWALLEN et al., 1999). A descrição do branqueamento da retina na oclusão não isquêmica da veia central retiniana foi feita por Browning em 2002. Não se deve também negligenciar o eventual efeito que a cloroquina possa ter sobre a retina, pois o tratamento crônico em pacientes que se recuperam da malária cerebral por *P. falciparum*, pode provocar a cegueira definitiva como reação adversa à cloroquina (EASTERBROOK, 1992). Este autor constatou esta triste realidade durante o acompanhamento da maculopatia de 62 pacientes por um período superior a 8 anos. A avaliação do campo visual de 22 pacientes que apresentavam escotomas indicou a ocorrência de cegueira bilateral definitiva em quatro pacientes que receberam o tratamento antimalárico e 63% perderam o campo visual por aumento absoluto dos escotomas.

A análise histopatológica dos tecidos uveal e retiniano em camundongos CBA/J sacrificados no 3º, 7º e 9º dia de infecção por PbA revelou, na fase tardia da infecção, alterações endoteliais nos vasos retinianos, adesão de monócitos na parede vascular e congestão do lúmen vascular por sequestro de hemácias parasitadas em tecido uveal, provavelmente com base nos fenômenos obstrutivos similares aos processos que envolvem o sistema nervoso central (SILVA et al., 2003).

As alterações histopatológicas envolvidas tanto na malária cerebral humana como na murina são caracterizadas pela perda da integridade da célula do endotélio, edema e congestão dos capilares com eritrócitos parasitados e/ou células mononucleares (MEDANA

et al., 2001). Os resultados obtidos nas infecções de C57BL/6JUnib corroboram estes achados porque foram evidenciadas pequenas áreas de microhemorragias no parênquima cerebral e muitos leucócitos na parede do vaso. (Prancha I).

Alguns animais que receberam as células totais da medula óssea puderam reverter o coma, apresentaram melhora do estado de saúde, porém, sucumbiram mais tarde possivelmente em decorrência da hiperparasitemia, hipóxia e hipotermia. Este quadro de reversão do coma pode estar relacionado com a produção de citocinas. O excesso de produção do TNF-alfa parece ser a chave da patogênese da malária cerebral murina porque o tratamento de camundongo com anticorpo anti-TNF-alfa previne o desenvolvimento de sintomas cerebrais e a patologia da malária cerebral (GRAU et al., 1987). Em 1994 surgiu a teoria idealizada por inúmeros autores: Berendt et al; Clark e Rockett; Clark et al. Estes autores sugeriram que o TNF-alfa induz a liberação do óxido nítrico (NO) e esta molécula contribui para a patologia da malária. A hipótese está fundamentada na capacidade do NO liberado pelas células do endotélio vascular estimulada pelo TNF-alfa difundir no cérebro, onde rompem a regulação do NO induzido pelo glutamato neural, resultando em alteração da neurotransmissão, o que leva ao coma. Grau e Kossodo (1994) propuseram que o NO pode mediar alterações precoces na malária cerebral, tais como distúrbios na neurotransmissão, quando a síndrome ainda é reversível, mas que é improvável que o NO esteja envolvido no processo que causa o dano neurovascular.

A hemozoína, presente em grande quantidade nos monócitos e neutrófilos circulantes persiste em macrófagos por muitos meses. Estudos *in vitro* com beta-hematina, um cristal estruturalmente idêntico à hemozoína, demonstraram que este pigmento ativa neutrófilos peritoneais murinos e induz a quimiotaxia de neutrófilos, sugerindo que a hemozoína pode ativar leucócitos a liberarem TNF-alfa e participar da patologia da malária grave (HUY et al., 2006). A constatação de agregados de esquizontes sequestrados nos capilares cerebrais dos camundongos em nosso estudo (Prancha I) indica a possibilidade de haver liberação maciça *in situ* de TNF-alfa, causando mais dano do que seria esperado caso estes esquizontes estivessem circulando.

Lesões cerebrais na malária grave são caracterizadas pelo sequestro de eritrócitos infectados, leucócitos e plaquetas nos capilares cerebrais e aumento excessivo de citocinas pro-inflamatórias induzindo o rompimento da barreira hemato-encefálica.

Wassmer et al. (2004) comprovaram *in vitro* que plaquetas aumentam a adesão de eritrócitos infectados às células endoteliais. Experimentos de co-incubação de plaquetas, células endoteliais cerebrais deficientes para CD36 e eritrócitos infectados, confirmam que plaquetas, via seus receptores ICAM -1 e CD36, podem servir como uma espécie de ponte para a adesão de eritrócitos infectados às células endoteliais cerebrais que usualmente não serviriam como local de citoadesão (WASSMER et al., 2003; COMBES et al., 2006). Plaquetas também potencializam a citotoxicidade de eritrócitos infectados presentes nos capilares sob as células endoteliais por induzir alteração da integridade e aumento da apoptose dessas células. Isso justifica o efeito deletério das plaquetas sobre o endotélio cerebral durante a malária grave.

Outro aspecto a ser considerado é a ativação de células vasculares e sanguíneas nos processos inflamatórios; essa ativação resulta na liberação de micropartículas circulantes. Micropartículas são elementos sub-micron produzidos após remodelação da membrana de células eucariotas durante processos fisiológicos ou patogênicos como ativação ou apoptose. As micropartículas atuam como efetores biológicos que estão envolvidos na homeostase, quando se trata de eventos fisiológicos, ou na coagulação e inflamação, quando se trata de eventos patológicos. Essas micropartículas podem se originar de várias células do hospedeiro e então participar do agravamento da lesão cerebral na malária grave. Após a infecção pelo PbA um aumento no número de micropartículas circulantes é observado. Em adição, essas micropartículas exibem potencial patogênico como pro-coagulantes e pro-inflamatórias.

As micropartículas ativam a coagulação e participam na formação de trombos em um modelo *in vivo* com danos vasculares na hemofilia. (HRACHOVINOVA et al., 2003).

A barreira hemato-encefálica (BHE) contribui para o isolamento imunológico do sistema nervoso central. A primeira evidência *in vivo* do rompimento da barreira hemato-encefálica e hemorragias atribuídas ao processo inflamatório na malária cerebral em

camundongos infectados pelo PbA foi realizada por Penet et al. (2005), mediante a utilização da ressonância magnética. Foi possível demonstrar a coexistência de lesões inflamatórias e isquêmicas que comprovam o importante papel do edema na morte dos animais. A quebra da barreira hemato-encefálica associada com edema cerebral resulta em uma significativa compressão de artérias cerebrais que podem representar a causa da morte.

Thumwood et al.(1988) observaram que a malária cerebral em camundongos A/J e CBA/H infectados pelo PbA é acompanhada de infiltração mononuclear, hemorragia e lesão nas células endoteliais. A lesão no endotélio é uma das causas da quebra da barreira hemato-encefálica que foi detectada mediante o extravasamento do corante azul de Evans e por albumina marcada por radioisótopos. Houve ainda a constatação de edema cerebral mediante a comparação da densidade do tecido cerebral.

Os resultados da avaliação da integridade da BHE ilustrados nas Fotomicrografias 1 a 3 evidenciaram o maior comprometimento da área do bulbo olfatório. Neste caso, o tempo de infecção não foi o mesmo porque o procedimento com o corante azul de Evans foi feito no momento em que os sinais clínicos da malária cerebral apareceram, o que aconteceu no 6º dia para os transplantados com células mononucleares da medula óssea e no 5º dia para os camundongos sem tratamento pelas CMoMO. Uma vez ocorrido o rompimento da BHE pela alteração da permeabilidade vascular pelo PbA, dificilmente a integridade da BHE seria refeita em pouco tempo, de modo que a injeção de CMoMO feita no segundo dia de infecção não foi capaz de resgatar a permeabilidade dos capilares. Neste caso, a validação da integridade da BHE deveria ser feita mais tardiamente, quando o animal sobrevivente à malária cerebral não apresentasse mais sinais clínicos, fato que aconteceu em poucos animais que sobreviveram 10 e 21 dias além do grupo controle.

É importante ressaltar que fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) secretados pela população de células da medula óssea possuem potente fator de permeabilidade vascular, favorecendo a migração de proteínas do plasma sanguíneo minutos após a exposição ao VEGF (DVORAK, 1995). Em casos de isquemia cerebral em ratos, o rompimento da barreira hemato-encefálica ocorre imediatamente, enquanto que a

regeneração de capilares cerebrais se desenvolve na fase tardia da isquemia cerebral (GOTOH et al., 1985; SBARBATI et al., 1996, LIU & CHEN, 1994).

Na tentativa de aumentar a sobrevivência dos camundongos que receberam células de medula óssea e permitir a colonização destas no parênquima cerebral, foi administrada cloroquina após a apresentação dos sintomas clínicos da malária cerebral.

A cloroquina, fármaco anti-malárico pertencente ao grupo das aminoquinolinas é um composto ativo contra formas eritrocíticas do *P. falciparum*, atuando como agente esquizotônica. Quando a forma merozoíta se reproduz assexuadamente dentro das hemácias ocorre degradação da hemoglobina humana como fonte de nutrientes para o parasito; como produto dessa degradação há liberação do grupo heme ou ferriprotoporfirina IX que é tóxico ao parasito devido à sua capacidade de gerar radicais livres. Para evitar essa toxicidade o grupo heme é agregado, pelo parasito, em um polímero insolúvel e não tóxico chamado hemozoína. Acredita-se que o mecanismo de ação da cloroquina se dê através da interação com o grupo heme, impedindo a formação de hemozoína. O aumento na disponibilidade de heme intracelular causado pela cloroquina aumenta o estresse oxidativo e interrompe o mecanismo de detoxificação do parasito, levando-o à morte (ROBERT et al., 2001; SILVA et al., 2005).

A Figura 6 expressa o resultado de sobrevivência dos animais com período de 6 a 10 dias superior ao dos animais que não receberam tratamento (células totais de medula óssea + cloroquina).

A parasitemia é baixa (de 5 a 15%) no momento da morte nos animais não transplantados. Nos camundongos tratados com células totais da medula óssea, há tendência do desenvolvimento rápido de intensa anemia na tentativa de um “clearance” dos protozoários, atingindo 52,3% de eritrócitos parasitados (Fig.7). A parasitemia de um dos animais no 16º dia após infecção pelo PbA, foi de 34,8%. As células da medula óssea foram eficientes na sobrevivência dos animais, porém não controlou a parasitemia.

Apesar dos animais que superaram a fase aguda da malária cerebral morrerem em decorrência de hiperparasitismo e anemia, o tratamento com células mononucleares de medula óssea no segundo dia após a infecção, foi capaz de adiar a morte dos camundongos

de 3 a 21 dias (Fig.4), resultados considerados promissores apesar da sobrevivência máxima de 21 dias ocorrer em um único animal.

A utilização de células totais da medula óssea, sem a concentração da fração mononuclear pelo gradiente de Ficoll foi um recurso adotado com a intenção de garantir que alguns fatores de crescimento e células progenitoras/tronco de tecidos específicos estivessem presentes na população celular transplantada e pudessem impedir o dano isquêmico de células endoteliais.

Segundo Kucia et al (2004) células tronco de tecidos específicos circulam em condição de estado estacionário no sangue periférico, aumentam em número durante estresse, lesão tecidual e mobilização farmacológica e são quimioatraídas para a medula óssea. A medula óssea é considerada um local não apenas de células tronco hematopoéticas mas também de células tronco/progenitoras circulantes de tecidos específicos e fatores de crescimento. Células progenitoras/tronco de tecido hematopoético, endotelial, muscular, neural e outros tecidos específicos, circulam em baixos níveis no sangue periférico e mantêm um “pool” de células tronco em partes distantes do corpo, elas também expressam um receptor de superfície, o CXCR4. O fator derivado de estroma (SDF-1), ligante do CXCR4, é secretado em vários órgãos e é um quimioatraente para células tronco circulantes. Essas células competem para a ocupação de nichos positivos SDF-1 em diferentes órgãos, justificando assim o encontro, por exemplo, de progenitores hematopoéticos em tecido muscular ou células musculares e de fígado podendo ser isoladas de culturas de medula óssea.

É importante relatar que um bom resultado também foi obtido com o transplante de 10^7 células totais da medula óssea, que resultou em dez dias a mais de sobrevivência do camundongo com malária cerebral (Fig.5).

A tendência de sucesso nesta terapia celular pode ser a obtenção de células mesenquimais murinas para garantia da proteção da patogênese envolvida na fase aguda da malária cerebral. O isolamento de células mesenquimais murinas da medula óssea exige o cultivo e expansão de culturas homogêneas livres de contaminantes para estudos de terapia

celular em camundongos e desenvolvimento subsequente de protocolos pré-clínicos para um grande espectro de doenças.

6. Conclusões

A terapia com células da medula óssea em camundongos C57BL/6JUnib infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) proporcionou a reversão do quadro neurológico, aumentando o tempo da sobrevivência dos animais de 3 a 21 dias, quando comparados ao grupo controle.

A mortalidade acumulativa dos camundongos C57BL/6JUnib infectados pelo PbA foi de 100% até o sétimo dia após infecção (13,2% no 5º dai, 68,4% no 6º dai e 18,4% no 7º dai.) Neste período os resultados da parasitemia foram: 9,4% (5º dai), 17,3 % (6º dai) e 15,9 % (7º dai).

A administração da cloroquina após a manifestação dos sinais clínicos da malária cerebral associada ao tratamento com células da medula óssea induziu maior sobrevivência aos camundongos, quando comparada à sobrevivência dos animais que receberam apenas cloroquina.

O transplante de células totais da medula óssea no segundo dia após a infecção dos camundongos pelo PbA não foi capaz de controlar a parasitemia, que alcançou nível máximo de 52,3% no 17º dia de infecção. Apesar da alta parasitemia, um animal sobreviveu 10 dias além do período máximo de sobrevivência do grupo controle.

A injeção de células mononucleares da medula óssea aplicada no segundo dia de infecção pelo PbA não foi capaz de resgatar a integridade da barreira hemato-encefálica no período de 3 e 4 dias após o transplante.

Foi possível observar a presença de esquizontes e pigmento malárico nos capilares cerebrais em cortes histológicos dos camundongos com malária cerebral.

Células mononucleares procedentes da medula óssea de C57BL/6 GFP HET inoculadas no plexo oftálmico dos camundongos C57BL/6JUnib infectados pelo PbA migram principalmente para o bulbo olfatório.

7. Referências bibliográficas

ADAMS, S.; TURNER, G. D.; NASH, G. B.; MICKLEM, K.; NEWBOLD, C. I.; CRAIG, A. G. Differential binding of clonal variants of *Plasmodium falciparum* to allelic forms of intercellular adhesion molecule 1 determined by flow adhesion. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 264-269, 2000.

AIKAWA, M.; ISEKI, M.; BARNWELL, J.W.; TAYLOR, D.; MAUNG, O.; HOWARD, R.J. The pathology of human cerebral malaria. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.43, p. 30-37, 1990.

AKIYAMA, Y.; RADTKE, C.; HONMOU, O.; KOCSIS, J.D. Remyelination of the spinal cord following intravenous delivery of bone marrow cells. **Glia**, v.39, p. 229–236, 2002a.

AKIYAMA, Y.; RADTKE, C.; KOCSIS, J.D. Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells. **Journal of Neuroscience**, v.22, p.6623–6630, 2002b.

ARTAVANIS-TSAKONAS, K., TONGREN, J.E., RILEY, E.M. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. **Clinical and Experimental Immunology**, v.133, p.145-152, 2003.

ASAHARA, T.; MUROHARA, T.; SULLIVAN, A.; SILVER, M.; VAN DERZEE, R.; LI, T.; WITZENBICHLER, B.; SCHATTEMAN, G.; ISNER, J.M. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science**, v.275, p.964-967, 1997.

ASAHARA, T.; MASUDA, H.; TAKAHASHI, T.; KALKA, C.; PASTORE, C.; LILVER, M.; KEARNE, M.; MAGNER, M.; ISNER, J.M. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. **Circulation Research**, v.85, p.221-228, 1999a.

ASAHARA, T.; TAKAHASHI, T.; MASUDA, H.; KALKA, C.; CHEN, D.; IWAGURO, H.; INAI, Y.; SILVER, M.; ISNER, J.M. VEGF contributes to postnatal neovascularization

by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. **The Embo Journal**, v.18, p.3964-3972, 1999b.

ASHLEY, E.; MCGREADY, R.; PROUX, S.; NOSTEN, F. Malaria. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v.4, p.159-173, 2006.

BEARE, N.A.V.; SOUTHERN, C.; KAYIRA, K.; TAYLOR, T.E.; HARDING, S.P. Visual outcomes in children in Malawi following retinopathy of severe malaria. **British Journal of Ophthalmology**, v.88, p.321-324, 2004.

BEARE, N.A.V.; GLOVER, S.J.; MOLYNEUX, M. Malarial retinopathy in cerebral malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.80, p.171, 2009.

BELTRAMI, A.P.; BARLUCCHI, L.; TORELLA, D.; BAKER, M.; LIMANA, F.; CHIMENTI, S.; KASAHARA, H.; ROTA, M.; MUSSO, E.; URBANEK, K.; LERI, A.; KAJSTURA, J.; NADAL-GINARD, B.; ANVERSA, P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. **Cell**, v.114, p.763-776, 2003.

BERENDT, A.R.; TURNER, G.D.H.; NEWBOLD, C.I. Cerebral malaria: the sequestration hypothesis. **Parasitology Today**, v.10, p.412-414, 1994.

BERNSTEIN, D.C.; SHEARER, G.M. Suppression of human cytotoxic T lymphocyte responses by adherent peripheral blood leukocytes. **Annals of New York Academic Science**, v.532, p.207-213, 1988.

BHATTACHARYA, V.; MCSWEENEY, P.A.; SHI, Q.; BRUNO, B.; ISHIDA, A.; NASH, R.; STORB, R.F.; SAUVAGE, L.R.; HAMMOND, W.P.; WU, M.H. Enhanced endothelialization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD34+ bone marrow cells. **Blood**, v.95, p.581-585, 2000.

BLANC, J.; LEPREUX, S.; LE BAIL, B.; BALABAUD, C.; BIOULAC-SAGE, P. Liver cells from bone marrow. **Gastroenterologie Clinique et Biologique**, v.24, p.1155-1158, 2000.

BONDI, F.S. The incidence and outcome of neurological abnormalities in childhood cerebral malaria: a longterm follow-up of 62 survivors. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, p. 17-19, 1992.

BRAGA, L.M.G.M.; LACCHINI, S.; SCHANN, B. D.'A.; RODRIGUES, B.; KALEIZU, R.; DE ANGELIS, K.; BORGES, L.F.; IRIGOYEN, M.C.; NARDI, N.B. *In situ* delivery of bone marrow cells and mesenchymal stem cells improves cardiovascular function in hypertensive rats submitted to myocardial infarction. **Journal of Biomedical Science**, v.15, p.365-374, 2008.

BRAZELTON, T.R.; ROSSI, F.M.; KESHET, G.I.; BLAU, H.M. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. **Science**, v.290, p. 1775–1779, 2000.

BROWNING, D.J. Patchy ischemic retinal whitening in acute central retinal vein occlusion. **Ophthalmology**, v.109, p. 2154-2159, 2002.

BYK, R.L.; ANHALT Jr, J.E. Malaria transmission among narcotic addicts. A report of ten cases and review of literature. **California Medical**, v. 115, p. 56-58, 1971.

CAME, B.; BOUQUETY, J.C.; PLASSART, H. Mortality and sequelae due to cerebral malaria in African children in Brazzaville, Congo. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 48, p. 216-221, 1993.

CARTER, R.; DIGGS, C. L. Plasmodia of Rodents. In: **Parasitic Protozoa**. Ed.J.P.Kreier v.3, cap.8, p. 359-465, 1977.

CHEN, J.; LI, Y.; WANG, L.; LU, M.; ZHANG, X.; CHOPP, M. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. **Journal of the Neurological Science**, v.189, p.49–57, 2001.

CHOPP, M.; LI, Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. **The Lancet Neurology**, v.1, p.92-100, 2002.

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

CLARK, I.A.; ROCKETT, K.A; COWDEN, B. Possible central role of nitric oxide in conditions clinically similar to cerebral malaria. **Lancet**, v.340, p.894–896,1994.

CLYDE, D.F.; LAING, N.; TIN, F. Resistance to chloroquine of *Plasmodium falciparum* from Burma. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, v.66, p.369-70, 1972.

COLTEL, N.; COMBES, V.; HUNT, N.H.; GRAU, G.E. Cerebral malaria – a neurovascular pathology with many riddles still to be solved. **Current Neurovascular Research**, v. 1, p. 91-110, 2004.

COWMAN, A. F.; CRABB, B.S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell**, v.124, p.755, 2006.

CRAIN, B.J.; TRAN, S.D.; MEZEY, E. Transplanted human bone marrow cells generate new brain cells, **Journal of Neurological Sciences**, v.233, p.121–123, 2005.

CRISA, L.; ARRULI, V.; SMITH, K.A.; ELLISMAN, M.H.; TORBETT, B.E.; SALOMON, D.R. Human cord blood progenitors sustain thymic T-cell development and a novel form of angiogenesis. **Blood**, v.94, p.3928-3940, 1999.

CROSBY, J.R.; KAMINSKI, W.E.; SCHATTEMAN, G.; MARTIN, P.J.; RAINES, E.W.; SEIFERT, R.A.; BOWEN-POPE, D.F. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. **Circulation Research**, v.87, p.728-730, 2000.

DEGOWIN, R.L.; POWELL, R.D. Drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum* from Malaya. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.14, p.519-28, 1965.

de SOUZA, J. B. & RILEY, E. M. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. **Microbes and Infection**, v.4, p.291-300, 2002.

DVORAK, H.F.; BROWN, L.F.; DETMAR, M.; and DVORAK, A.M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. **American Journal of Pathology**, v.146, p.1029–1039, 1995.

EASTERBROOK, M. Long-term course of antimalarial maculopathy after cessation of treatment. **Canadian Journal of Ophthalmology**, v.27, p.237-239, 1992.

EDELBERG, J.M.; TANG, L.; HATTORI, K.; LYDEN, D.; RAFFI, S. Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function. **Circulation Research**, v.90, p.E89-E93, 2002.

EGIMA, C.M.; MACEDO, S.F.; SASSO, G.R.S.; COVARRUBIAS, C.; CORTEZ, M.; MAEDA, F.Y.; COSTA, F.T.; YOSHIDA, N. Co-infection with *Trypanosoma cruzi* protects mice against early death by neurological or pulmonary disorders induced by *Plasmodium berghei* ANKA. **Malaria Journal**, v.6, p.90-95, 2007.

EGLITIS, M.A.; MEZEY, E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, v.94, p.4080–4085, 1997.

ENGWERDA, C.; BELNOUE, E.; GRUNER, A.C.; RENIA, L. Experimental models of cerebral malaria. **Current Topics in Microbiology and Immunology Journals**, v.297, p.103-143, 2005.

FAVRE, N.; LAPEROUSAZ, C. Da.; RYFFEL, B.; WEISS, N.A.; IMHOF, B.A.; RUDIN, W. L. R.; PIGUET, P.F.; Role of ICAM-1 (CD 54) in the development of murine cerebral malaria. **Microbes and Infection**, v.1, p. 961-968, 1999.

FERRARI, G.; CUSELLA-DE ANGELIS, G.; COLLETA, M.; PAOLUCCI, E.; STORNAIUOLO, A.; COSSU, G.; MAVILIO, F. Muscle regeneration by bone marrow derived myogenic progenitors. **Science**, v.279, p. 154-156, 1998.

FERRARONI, J.J.; SPEER, C.A.; HAYES, J.; SUZUKI, M. Prevalence of chloroquine-resistant falciparum malaria in the Brazilian Amazon. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.30, p.526-30, 1981.

GOLENSER, J.; McQUILLAN, L.; HEE, L.; MITCHELL, A.J.; HUNT, N.H. Conventional and experimental treatment of cerebral malaria. **International Journal for Parasitology**, v.36, p.583-593, 2006.

GOTOH, O.; ASANO, T.; KOIDE, T.; TAKAKURA, K. Ischemic brain edema following occlusion of the middle cerebral artery in the rat. I. The time courses of the brain water, sodium and potassium contents and blood-brain barrier permeability to 125I-albumin. **Stroke**, v.16, p.101-109, 1985.

GRANT, M.B.; MAY, W.S.; CABALLERO, S.; BROWN, G.A.; GUTHRIE, S.M.; MAMES, R.N.; BYME, B.J.; VAUGHT, T.; SPOERRI, P.E.; PECK, A.B.; SCOTT, E.W. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. **Nature Medicine**, v.8, p.607-612, 2002.

GRAU, G.E.; FAJARDO, L.F.; PIGUET, P.F.; ALLET, B.; LAMBERT, P.H.; VASSLLI, P. Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. **Science**, v.237, p.1210-1212, 1987.

GRAU, G.E.; KOSSODO, S. Cerebral malaria: Mediators, mechanical obstruction or more? **Parasitology Today**, v.10, p.408-409, 1994.

GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; NOSTEN, F.; DRUILHE, P.; LAXMINARAYAN, R.; BINKA, F.; KILAMA, W. L.; FORD, N.; WHITE, N. J. Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. **Infectious disease**, v.2, p. 564, 2002.

HAMANO, K.; LI, T.S.; KOBAYASHI, T.; KOBAYASHI, S.; MATSUZAKI, M.; ESATO, K. Angiogenesis induced by the implantation of self-bone marrow cells: a new material for therapeutic angiogenesis. **Cell Transplantation**, v.9, p.439-443, 2000.

HAWKINS, B.T.; DAVIS, T.P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. **Pharmacological Reviews**, v.57, p. 73-185, 2005.

HERO, M.;HARDING, S.P; RIVA, C.E. Photographic and angiographic characterization of the retina of Kenyan children with severe malaria. **Archives of Ophthalmology**, v.115, p.997-1003 ,1997.

HILDEBRANDO, L.; OLIVEIRA, V.E.G. O desafio da malária: o caso brasileiro e o que se pode esperar dos progressos da era genômica. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.7,p.49, 2002.

HILLEBRANDS, J.; KLATTER, F.A.; ROZING, J. Origin of vascular smooth muscle cells and the role of circulating stem cells in transplant arteriosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.23, p.380-387, 2003.

HIROUCHI, M.; UKAI, Y. Current state on development of neuroprotective agents for cerebral ischemia. **Nippon Yakurigaku Zasshi.**, v. 120, p.107-113, 2002.

HOMMEL, M. Amplification of cytoadherence in cerebral malaria: towards a more rational explanation of disease pathophysiology. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.87, p. 627-635, 1993.

HRACHOVINOVA, I.; CAMBIEM, B.; HAFEZI-MOGHADAM, A.; KAPPELMAYER, J.; CAMPHAUSEN, R.T.; WIDOM, A.; XIA, L.; KAZAZIAN, H.H.; SCHAUB, R.G.; McEVER, R.P.; WAGNER, D.D. Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A. **Nature Medicine**, v.9, p. 1020-1025, 2003.

http://www.cdc.gov/malaria/biology/life_cycle.htm acessada em 8 de julho de 2009.

HUNT, N.H.; GRAU, G.E. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. **Trends in Immunology**, v.24, p.491-499, 2003.

HUY, N.T.; TRANG, D.T.; KARIU, T.; SASAI, M.; SAIDA, K.; HARADA, S.; KAMEI, K. Leukocyte activation by malarial pigment. **Parasitology International**, v.55, p.75-81, 2006.

IDRO R., JENKINS N.E., NEWTON C.R.J. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcomes of cerebral malaria. **The Lancet**. v.4, p.827-840, 2005.

INOUE, M.; HONMOU, O.; OKA, S.; HOUKIN, K.; HASHI, K.; KOCSIS, J.D. Comparative analysis of remyelinating potential of focal and intravenous administration of autologous bone marrow cells into the rat demyelinated spinal cord. **Glia**, v.44, p.111-118, 2003.

JACKSON, K.A.; MAJKA, S.M.; WANG, H.; POCIUS, J.; HARTLEY, C.J.; MAJESKY, M.W.; ENTMAN, M.L.; MICHAEL, L.H.; HIRSCHI, K. K.; GOODELL, M. A. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v.107, p.1395-1402, 2001.

JANSE, C.J.; FRANKE-FAYARD, B.; MAIR, G.R.; RAMESAR, J.; THIEL, C.; ENGELMANN, S.; MATUSCHEWSKI, K.; VAN GEMERT, G.J.; SAUERWEIN, R.W.; WALTERS, A.P. High efficiency transfection of *Plasmodium berghei* facilitates novel selection procedures. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.145, p.60-70, 2006.

JANSE, C.J.; FRANKE-FAYARD, B.; WALTERS, A.P. Selection by flow-sorting of genetically transformed, GFP-expressing blood stages of the rodent malaria parasite, *Plasmodium berghei*. **Nature protocols**, v.1, p.614-623, 2006

JENNINGS, V.M.; LAL, A.A.; HUNTER, R.L. Evidence for multiple pathologic and protective mechanisms of murine cerebral malaria. **Infectious and Immunity**, v.66, p.5972-597, 1998.

KALLA, C.; MASUDA, H.; TAKAHASHI, T.; KALKA-MOLL, W.M.; SILVER, M.; KEARNEY, M.; LI, T.; ISNER, J.M.; ASAHARA, T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. **Medical Sciences**, v.97, p.3422-3427, 2000.

KAMO, I.; KIKUCHI, A.; ISHII, H.; MATSUOKA, T.; FURUKAWA, S.; ISHIURA, S. Establishment of myoid cells from bone marrow. **Cell Biology International Reports**, v.14, p. 595–600, 1990.

KAUSHAL, S.; AMIEL, G.E.; GULESERIAN, K.J.; SHAPIRA, O.M.; PERRY, T.; SUTHERLAND, F.W.; RABKIN, E.; MORAN, A.M.; SCHOEN, F.J.; ATALA, A.; SOKER, S.; BISCHOFF, J.; MAYER, J.E.Jr. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. **Nature Medicine**, v.7, p.1035-1040, 2001.

KEAN, B.H. Chloroquine-resistant falciparum malaria from Africa., **Journal of the American Medical Association**, v.241, p.395-396, 1979.

KOCHER, A.A.; SCHUSTER, M.D.; SZABOLCS, M.J.; TAKUMA, S.; BURKHOF, D.; WANG, J.; HOMMA, S.; EDWARDS, N.M.; ITESCU, S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. **Nature Medicine**, v.7, p.430-436, 2001.

KONDZIOLKA, D.; WECHSLER, L.; GOLDSTEIN, S.; MELTZER, C.; THULBORN, K.R.; GEBEL, J.; JANNETA, P.; DeCESARE, S.; ELDER, E.M.; McGROGAN, M.; REITMAN, M.A.; BYNUM, L. Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. **Neurology**. v.55, p.565-569, 2000.

KRAUSE, D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Gene Therapy**, v.9, p.754-758, 2002.

KRAUSE, D.S.; THEISE, N.D.; COLLECTOR, M.I.; HENEGARIU, O.; HWANG, S.; GARDNER, R.; NEUTZEL, S.; SHARKIS, S.J. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. **Cell**, v.105, p.369-377, 2001.

KUCIA, M.; RATAJCZAK, J.; RECA, R.; JANOWSKA-WIEEZOREK, A.; RATAJCZAK, M. Z. Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury. **Blood cells, Molecules, and diseases**, v.32, p. 52-57, 2004.

LERI, A.; KAJSTURA, J.; ANVERSA, P. Myocyte proliferation and ventricular remodeling. **Journal of Cardiac Failure**, v.8, p.518-525, 2002.

LEWALLEN, S.; BAKKER, H.; TAYLOR, T.E.; WILLS, B.A.; COURTRIGHT, P.; MOLYNEUX, M.E Retinal findings predictive of outcome in cerebral malaria. **Transaction of Royal Society for Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, p.144-146, 1996.

LEWALLEN, S.; HARDING, S.P.; AJEWOLE, J. A review of the spectrum of clinical ocular fundus findings in *P. falciparum* malaria in African children with a proposed classification and grading system. **Transaction of Royal Society for Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, p.619-622, 1999.

LI, Y.; CHEN, J.; CHEN, X.G.; WANG, L.; GAUTAM, S.C.; XU, Y.X.; KATAKOWSKI, M.; ZHANG, L.J.; LU, M.; JANAKIRAMAN, N.; CHOPP, M. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. **Neurology**, v.59, p.514-523, 2002.

LIU, H.M.; CHEN, H.H. Correlation between fibroblast growth factor expression and cell proliferation in experimental brain infarct: studied with proliferating cell nuclear antigen immunohistochemistry. **The Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v.53, p.118-126, 1994.

LUHAN, M. Malaria. **WHO** press office fact sheet, v.94, p.1-3, 1. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1996.

LUTTUN, A.; CARMELIET, G.; CARMELIETE, P. Vascular progenitors: from biology to treatment. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v.12, p.88-96, 2002.

LYDEN, D.; HATTORI, K.; DIAS, S.; COSTA, C.; BLAIKIE, P.; BUSTROS, L.; CHADBURN, A.; HEISSIG, B.; MARKS, W.; WITTE, L.; WU, Y.; HICKLIN, D.; ZHU, Z.; HACKETT, N.R.; CRYSTAL, R.G.; MOORE, M.A.; HAJJAR, K.A.; MANOVA, K.; BENEZRA, R.; RAFII, S. 2001. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. **Nature Medicine**, v.7, p.1194-1201, 2001.

MABERTI, S. Desarrollo de resistencia a la pyrimetamine, presentación de 15 casos estudiados en Trujillo, Venezuela. **Archivos Venezolanos de Medicina Tropical**, v.3, p.239-259, 1960.

MACKAY, L.J.; HOCHMANN, A.; JUNE, C.H.; CONTRERAS, C.E.; LAMBERT, P.H. Immunopathological aspects of *Plasmodium berghei* infection in five strains of mice. II. Immunopathology of cerebral and other tissue lesions during the infection. **Clinical Experimental Immunology**, v.42 p.412-420, 1980.

MAJKA, S.M., JACKSON, K.A.; KIENSTRA, K.A.; MAJESKY, N.W.; GOODELL, M.A.; HIRSCHI, K.K. Distinct progenitor populations in skeletal muscle are bone marrow derived and exhibit different cell fates during vascular regeneration. **The Journal of Clinical Investigation**, v.111, p.71-79, 2003.

MARSH, K. Malaria disaster in Africa. **Lancet**, v.352, p.924-925, 1998.

MEDANA, I.M.; TURNER, G.D. Human cerebral malaria and the blood-brain barrier. **International Journal for Parasitology**, v.36, p.555-568, 2006.

MEDANA, I.M.; CHAUDHRI, G.; CHAN-LING, T.; HUNT, N.H. Central nervous system in cerebral malaria: “innocent bystander” or active participant in the induction of immunopathology? **Immunology Cell Biology**, v.79, p.101-120, 2001.

MENENDEZ, C.; FLEMING, A F.; ALONSO P.L. Malaria-related Anaemia. **Parasitology Today**, v.16, n. 11, p. 469-476, 2000.

MEZEY, E. Bone marrow-derived stem cells in neurological diseases: stones or masons? **Regenerative Medicine**, v.2, p.37–49, 2007.

MOORE, D.V. & LANIER, T.E. Observations on two *Plasmodium falciparum* infections with an abnormal response to chloroquine. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.10, p.5-9, 1961.

MOORE, M.A. Putting neo into neoangiogenesis. **The Journal of Clinical Investigation**, v.109, p.313-315, 2002.

NAGATABE, T.; THUC, H.V.; TEGOSHI, T.; RABBEGE, J.; ANN, T.K.; AIKAWA, M. Pathology of falciparum malaria in Vietnam. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 47, p. 259-264, 1992.

NEILL, A. L. & HUNT, N. H. Pathology of fatal and resolving *Plasmodium berghei* cerebral malaria in mice. **Parasitology**, v.105, p.165-175, 1992.

NEWTON, C.R.J.C.; KRISGNA, S. Severe falciparum malaria in children: Current understanding of pathophysiology and supportive treatment. **Pharmacology and Therapeutics**, v.79, p.1-53, 1998.

NOISHIKI, Y.; TOMIZAWA, Y.; YAMANE, Y.; MATSUMOTO, A. Autocrine angiogenic vascular prosthesis with bone marrow transplantation. **Nature Medicine**, v.2, p.90-93, 1996.

OKABE, M., IKAWA, M. KOMINAMI, K., NAKANISHI, T. & NISHIMUNE, Y. "Green mice" as a source of ubiquitous green cells. **FEBS Letters**, v.407, p.313-319, 1997.

OLIVARES, E.L.; RIBEIRO, V.P.; WERNECK DE CASTRO, J.P.; RIBEIRO, K.C.; MATTOS.E.D.; GOLDENBERG,R.C.; MILL, J.G.; DOHMENN,H.F.; DOS SANTOS, R.R.; DE CARVALHO, A.C.; MASUDA, M.O.. Bone marrow stromal cells improve cardiac performance in healed infarcted rat hearts. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v.287, p. 464-470, 2004.

ORKIN, S.H. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. **Nature Reviews Genetics**, v.1, p.57-64, 2000.

ORLIC, D.; KAJSTURA, J.; CHIMENTI, S.; JAKONI, K.I.; ANDERSON, S.M.; LI, B.; PICKEL, J.; McKAY, R.; NADAL-GINARD, B.; BODINE, D.M.; LERI, A.; ANVERSA, P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature**, v.410, p.701-705, 2001a.

ORLIC, D.; KAJSTURA, J.; CHIMENTI, S.; LIMANA, F.; JAKONIĆ, K.I.; QUAINI, F.; NADAL-GINARD, B.; BODINE, D.M.; LERI, A.; ANVERSA, P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.8, p.10344-10349, 2001b.

OTANI, A.; KINDER, K.; EWALT, K.; OTERO, F.J.; SCHIMMEL, P.; FRIEDLANDER, M. Bone marrow-derived stem cells target retinal astrocytes and can promote or inhibit retinal angiogenesis. **Nature Medicine**, v.8, p.1004-1010, 2002.

PENET, M.F.; VIOLA, A.; CONFORT-GOUNY, S.; LE FUR, Y.; DUHAMEL, G.; KOBER, F.; IBARROLA, D.; IZQUIERDO, M.; COLTEL, N.; GHARIB, B.; GRAU, G.E.; COZZONE, P.J. Imaging experimental cerebral malaria in vivo: significant role of ischemic brain edema. **Journal of Neuroscience**, v.25, p.7352-7358, 2005.

PERIN, E.C.; DOHMANN, H.F.; BOROJEVIĆ, R.; SILVA, S.A.; SOUSA, A.L.; MESQUITA, C.T.; ROSSI, M.I.; CARVALHO, A.C.; DUTRA, H.S.; DOHMANN, H.J.; SILVA, G.V.; BELÉM, L.; VIVACQUA, R.; RANGEL, F.O.; ESPORCATTE, R.; GENG, Y.J.; VAUGHN, W.K.; ASSAD, J.A.; MESQUITA, E.T.; WILLERSON, J.T. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. **Circulation**, v.107, p.2294-2302, 2003.

PETERSEN, B. E.; BOWEN, W. C.; PATRENE, K. D.; MARS, W. M.; SULLIVAN, A.K.; MURASE, N.; BOGGS, S.S.; GREENBERGER, J.S.; GOFF, J.P. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. **Science**, v.284, p. 168-1170, 1999.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v.284, p.143-147, 1999.

POLDER, T.H.; ELING, W.M.C.; CURFS, J.H.A.J.; JERUSALEM, C.R.; WIJERS-ROUW, M. Ultrastructural changes in the blood-brain barrier of mice infected with *Plasmodium berghei*. **Acta Leiden**, v.60, p.31-46, 1992.

PORTA, J.; CAROTA, A.; PIZZOLATO, G.P.; WILDI, E.; WIDMER, M.C.; MARGAIRAZ, C.; GRAU, G.E. Immunopathological changes in human cerebral malaria. **Clinical Neuropathology**, v. 12, p. 142-146, 1993.

PROCKOP, D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science**, v. 276, p.71-74, 1997.

QUAINI, F.; URBANEK, K.; BELTRAMI, A.P.; FINATO, N.; BELTRAMI, C.A.; NADAL-GINARD, B.; KAJSTURA, J.; LERI, A.; ANVERSA, P. Chimerism of the transplanted heart. **New England Journal of Medicine**, v.346, p.5-15, 2002.

RAFII, S. Circulation endothelial precursors: mystery, reality, and promise. **The Journal of Clinical Investigation**, v.105, p.17-19, 2000.

REYES, M.; DUDEK, A.; JAHAGIRDAR, B.; KOODIE, L.; MARKER, P.H.; VERFAILLIE, C.M. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 109, p. 337-346, 2002.

RIECKMANN; K.H.; LOPEZ-ANTUNANO, F.J. Chloroquine resistance of *Plasmodium falciparum* in Brazil detected by a simple in vitro method. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 45, p. 157-167, 1971.

ROBERT, A.; BENOIT-VICAL, F.; DECHY-CABARET, O.; MEUNIER, B. From classical antimalarial drugs to new compounds based on the mechanism of action of artemisinin. **Pure and Applied Chemistry**, v.73, p.1173-1188, 2001.

ROCKETT, K.A.; AWBURN, M.M.; ROCKETTE, E.J.; CLARK, IA. Tumor necrosis factor and interleukin 1 β synergy in the context of malaria pathology. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.50, p. 735-742, 1994.

SAARISTO, A.; KARKKAINEN, M.J.; ALITALO, K. Insights into the molecular pathogenesis and targeted treatment of lymphedema. **Annals of the New York Academy of Science**, v.979, p.94-110, 2002.

SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.P.; CARVALHO, A.C.C. Transplante de células da medula óssea na tratamento da cardiopatia chagásica crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.37, p.490-495, 2004.

SAS Institute, Inc. S. A. S. User's Guide: Statistics, 6^a ed., Cary, N. C., 1987.

SASAKI, M.; HONMOU, O.; AKIYAMA, Y.; UEDE, T.; HASHI, K.; KOCSIS, J.D. Transplantation of an acutely isolated bone marrow fraction repairs demyelinated adult rat spinal cord axons. **Glia**, v.35, p.26-34, 2001.

SATA, M.; SAIURA, A.; KUNISATO, A.; TOJO, A.; OKADA, S.; TOKUHISA, T.; HIRAI, H.; MAKUUCHI, M.; HIRATA, Y.; NAGARI, R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. **Nature Medicine**, v.8, p.403-409, 2002.

SBARBATI, A.; PIETRA, C.; BALDASSARRI, A.M.; GUERRINI, U.; ZIVIANI, L.; REGGIANI, A.; BOICELLI, A.; OSCULAT, F. The microvascular system in ischemic cortical lesions. **Acta Neuropathologica**, v. 92, p.56-63, 1996.

SCHATTEMAN, G.C.; HANLON, H.D.; JIAO, C.; DODDS, S.G.; CHRISTY, B.A. Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v.106, p.571-578, 2000.

SEIN, K.K.; MAENO, Y.; THUC, H et al. Diferencial sequestration of parasited erythrocytes in the cerebrum and cerebellum in human cerebral malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, p. 504-511, 1993.

SHI, Q.; RAFII, S.; WU, M.H.; WIJELATH, E.S.; YU, C.; ISHIDA, A.; FUJITA, Y.; KOTHARI, S.; MOHLE, R.; SAUVAGI, L.R.; MOORE, M.A.; STORB, R.F.; HAMMOND, W.P. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. **Blood**, v.92, p.362-367, 1998.

SHYU, W.C.; LEE, Y.J.; LIU, D.D.; LIN, S.Z.; LI, H. Homing genes, cell therapy and stroke. **Frontiers in Bioscience**, v.11, p.899-907, 2006.

SILLAMUT, K.; WHITE, N.J. Relation of the stage of parasite development in the peripheral blood to prognosis in the severe falciparum malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.87, p. 436-443, 1993.

SILVA, P.R.M.; SILVA, K.L.T.; GONÇALVES FILHO, P.; BARANDAS, J.F.; PEREIRA, G.C. Malária ocular: estudo histopatológico experimental das alterações coriorretinianas. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v.66, p.305-309, 2003.

SILVA, T.H.A.; OLIVEIRA, M.T.; SANTOS, H.F.; OLIVEIRA, A.B.; ALMEIDA, W.B. Estudo de Modelagem Molecular de Complexos Ferriprotoporfirina IX Quinolinocarbinolaminas Antimaláricas: Proposta de um Farmacóforo. **Química Nova**, v.28, p.244-249, 2005.

SILVEIRA, A. C.; RESENDE, D. F. **OPAS Avaliação da Estratégia Global de Controle Integrado da Malária no Brasil, OPAS**. 2001. Disponível em: <http://www.opas.org.br/publicmo.cfm?codigo=42>. Acesso em 31 Ago 2006.

SOARES, M.B.P.; LIMA, R.S.; ROCHA, L.L.; TAKYIA, C.M.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; CARVALHO, A.C.C.; SANTOS, R.R. Transplanted Bone Marrow Cells Repair Heart Tissue and Reduce Myocarditis in Chronic Chagasic Mice. **American Journal of Pathology**, v.164, p.441-447, 2004.

SPRENGERS, R.W.; LIPS, D.J.; MOLL, F.L.; VERHAAR, M.C. Progenitor cell therapy in patients with critical limb ischemia without surgical options. **Annals of Surgery**, v.247, p.411-420, 2008.

STRAUER, B.E.; BREHM, M.; SCHANNWELL, C.M. The therapeutic potential of stem cells in heart disease. **Cell Proliferation**, v.41, p.126-145, 2008.

SZUBA, A.; SKOBE, M.; KARKKAINEN, M.J.; SHIN, W.S.; BEYNET, D.P.; ROCKSON, N.B.; DAKHIL, N.; SPILMAN, S.; GORIS, M.L.; STRAUSS, H.W.; QUERTERMOUS, T.; ALITALO, K.; ROCKSON, S.G. Therapeutic lymphangiogenesis with human recombinant VEGF-C. **The FASEB Journal**, v.16, p.1985-1987, 2002.

TAKAHASHI, T.; KALKA, C.; MASUDA, H.; CHEN, D.; SILVER, M.; KEARNEY, M.; MAGNER, M.; ISNER, J.M.; ASAHARA, T. Ischemia and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. **Nature Medicine**, v.5, p.434-438, 1999.

TATEISHE-YUYAMA, E.; MATSUBARA, H.; MUROHARA, T.; IKEDA, U.; SHINTANI, S.; MASAKI, H.; AMANO, K.; KISHIMOTO, Y.; YOSHIMOTO, K.; AKASHI, H.; SHIMADA, K.; IWASAKA, T.; IMAIZUMI, T. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomized controlled trial. **Lancet**, v.360, p.427-435, 2002.

TAYLOR, T.E., FU, W.J., CARR, R.A., WHITTEN, R.O., MUELLER, J.S., FOSIKO, N.G., LEWALLEN, S., LIOMBA, N.G., MOLYNEUX, M.E. Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. **Nature Medicine**, v.10, p.143-145, 2004.

THUMWOOD, C.M.; HUNT, N.H.; CLARK, I.A. Breakdown of the blood-brain barrier cerebral malaria. **Parasitology**, v. 96, p. 579-589, 1988.

TRAMPUZ, A.; JEREB, M.; MUZLOVIC, I.; PRABHU, R.M. Clinical review: severe malaria. **Critical Care**, v.7, p.315-323, 2003.

TREUTIGER, C.J.; HEDLUND, I.; HELMBY, H.; CARISON, J.; JEPSON, A.; TWUMASI, P.; KWIATKOWSKI, D.; GREENWOOD, B.M.; WAHLGREN, M. Rosette formation in *Plasmodium falciparum* isolates and anti-rosette activity of sera from Gambians with cerebral or uncomplicated malaria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.46, p.503-510, 1992.

TURNER, G. Cerebral malaria. **Brain Pathology**, v.7, p.569-582, 1997.

UDEINYA, I.J.; ADOGYERAM, C.O. Induction of adhesiveness in human endothelial cells by *Plasmodium falciparum* – infected erythrocytes. **The American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, p. 488-495, 1993.

van der HEYDE, H. C.; BAUER, P.; SUN, G.; CHANG, W. L.; YIN, L.; FUSELER, J.; GRANGER, D. N. Assessing vascular permeability during experimental cerebral malaria by a radiolabeled monoclonal antibody technique. **Infection and Immunity**, v. 69, p.3460-3465, 2001.

VOLTARELLI, J.C.; COURI, C.E.; RODRIGUES, M.; STRACIERI, A.B.P.; MORAES, D.A.; PIERONI, F.; NAVARRO, G.; MADEIRA, M.I.A.; SIMOES, B.P. The role of hematopoietic stem cell transplantation for type 1 diabetes mellitus. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.30, p.55-59, 2008.

WAGERS, A.J.; SHERWOOD, R.I.; CHRISTENSEN, J.L.; WEISSMAN, I.L. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. **Science**, v.297, p.2256-2259, 2002.

WAGURO, H.; YAMAHUCHI, I.; KALKA, C.; MURASAWA, S.; MASUDA, H.; HAYASHI, S.; SILVER, M.; LI, T.; ISNER, J.M.; ASAHARA, T. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. **Circulation**, v.105, p.732-738, 2002.

WALKER, O.; SALAKO, L.; SOWUNMI, A.; THOMAS, J.O.; SODEINE, O.; BONDI, F.S. Prognostic risk factors and pos-mortem findings in cerebral malaria in children. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.86, p.491-493, 1992.

WALTER, I.; FLEICHMANN, M.; KLEIN, D.; MÜLLER, M.; SALMONS, B.; GÜNZBURG, W.H.; RENNER, M.; GELBMANN, W. Rapid and sensitive detection of enhanced green fluorescent protein expression in paraffin sections by confocal laser scanning microscopy. **The Histochemical Journal**, v.32, p.99-103, 2000.

WEISSMAN, I.L.; ANDERSON, D.J.; GAGE, F.H. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations, **Annual Review of Cell and Development Biology**, v.17, p.387-403, 2001.

WHITE, N.J.; MILLER, K.; MARSH, K.; BERRY, C.D.; TURNER, R.C.; WILLIAMSON, D.H.; BROWN, J. Hypoglycaemia in African children with severe malaria. **The Lancet**, v.1, p. 708-711, 1987.

WHITE, N.J.; HO, M. The pathophysiology of Malaria. **Advances in Parasitology**. Academic Press, New York. p. 84-173, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global burden of disease: 2004 update. **WHO**, 2008. Disponível em: www.who.int/healthinfo/bodestimates/en/index.html. Acesso em 01 junho 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2008. Disponível em: <http://apps.who.int/malaria/wmr2008/malaria2008.pdf>. Acesso em 15 junho 2009.

WRIGHT, D.H. The effect of neonatal thymectomy on the survival of golden hamsters infected with *Plasmodium berghei*. **British Journal of Experimental Pathology**. v. 49, p. 379-384, 1968.

YOON, Y.S.; MURAYAMA, T.; GRAVEREAUX, E.; TKEBUCHAVA, T.; SILVER, M.; CURRY, C.; WECKER, A.; KIRCHMAIR, R.; HU, C.S.; KEARNEY, M.; ASHARE, A.; JACKSON, D.G.; KUBO, H.; ISNER, J.M.; LOSORDO, D.W. VEGF-C gene therapy augments postnatal lymphangiogenesis and ameliorates secondary lymphedema. **The Journal of Clinical Investigation**, v.111, p. 717-725, 2003.

YOSHIDA, M.; HORIMOTO, H.; MIENO, S.; NOMURA, Y.; OKAWA, H.; NAKAHARA, K.; SASAKI, S. Intra-arterial bone marrow cell transplantation induces angiogenesis in rat hindlimb ischemia. **European Surgical Research**, v.35, p.86-91, 2003.

8. Anexo

8.1. Análise estatística

```

The SAS System
10:11 Tuesday, August 4, 2009
10

The GLM Procedure

Class Level Information

Class          Levels    Values
trat           4         CLORO CMoMO CTMOC NTRAT

Number of Observations Read      112
Number of Observations Used      62

The SAS System
10:11 Tuesday, August 4, 2009
11

The GLM Procedure

Dependent Variable: dias

Weight: lsobrev

Source          DF          Sum of
                Squares    Mean Square    F Value
Model            3          274.742885      91.580962      6.13
Error           58          866.387153      14.937710
Corrected Total  61         1141.130038

Source          Pr > F
Model            0.0011
Error
Corrected Total

R-Square      Coeff Var      Root MSE      dias Mean
0.240764      49.87494      3.864933      7.749250

Source          DF          Type I SS    Mean Square    F Value
trat            3          274.7428846    91.5809615      6.13

Source          Pr > F
trat            0.0011

```


Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
trat	3	274.7428846	91.5809615	6.13

Source	Pr > F
--------	--------

trat	0.0011
------	--------

The SAS System 12
10:11 Tuesday, August 4, 2009

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for dias

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not
the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	58
Error Mean Square	14.93771
Harmonic Mean of Cell Weights	5.344869

NOTE: Cell weights are not equal.

Number of Means	2	3	4
Critical Range	4.733	4.978	5.140

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	trat
A	11.370	27	CMoMO
A			
B A	6.669	16	CTMOC
B			
B	4.389	13	CLORO
B			
B	3.104	6	NTRAT

The SAS System 7
10:11 Tuesday, August 4, 2009

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
trat	4	CLORO CMoMO CTMOC NTRAT

Number of Observations Read	112
Number of Observations Used	112

The SAS System 8
10:11 Tuesday, August 4, 2009

The GLM Procedure

Dependent Variable: sobreviv

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Model	3	1.60381892	0.53460631	4.34
Error	108	13.30691977	0.12321222	
Corrected Total	111	14.91073869		

Source	Pr > F
Model	0.0063
Error	
Corrected Total	

R-Square	Coeff Var	Root MSE	sobrev Mean
0.107561	117.0886	0.351016	0.299787

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value
trat	3	1.60381892	0.53460631	4.34

Source	Pr > F
trat	0.0063

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
trat	3	1.60381892	0.53460631	4.34

Source	Pr > F
trat	0.0063

The SAS System 9
10:11 Tuesday, August 4, 2009

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for sobreviv

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	108
Error Mean Square	0.123212

Number of Means	2	3	4
Critical Range	.1860	.1957	.2022

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	trat
A	0.48808	28	CMoMO
A			
B A	0.31633	28	CTMOC
B			
B	0.21429	28	CLORO
B			
B	0.18045	28	NTRAT

The SAS System 16
10:11 Tuesday, August 4, 2009

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
trat	3	CTMO CTMOC Ntrat

Number of Observations Read	7
Number of Observations Used	7

The SAS System 17
10:11 Tuesday, August 4, 2009

The GLM Procedure

Dependent Variable: t1

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Model	2	7.57928571	3.78964286	1.78
Error	4	8.49500000	2.12375000	
Corrected Total	6	16.07428571		

Source	Pr > F
Model	0.2793
Error	
Corrected Total	

R-Square	Coeff Var	Root MSE	t1 Mean
0.471516	15.06819	1.457309	9.671429

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value
trat	2	7.57928571	3.78964286	1.78

Source	Pr > F
trat	0.2793

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
trat	2	7.57928571	3.78964286	1.78

Source	Pr > F
trat	0.2793

The SAS System 18
10:11 Tuesday, August 4, 2009

The GLM Procedure

Dependent Variable: t2

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Model	2	77.8471429	38.9235714	5.73
Error	4	27.1500000	6.7875000	
Corrected Total	6	104.9971429		

Source	Pr > F
Model	0.0669
Error	
Corrected Total	

R-Square	Coeff Var	Root MSE	t2 Mean
0.741422	17.31907	2.605283	15.04286

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value
trat	2	77.84714286	38.92357143	5.73

Source	Pr > F
trat	0.0669

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
trat	2	77.84714286	38.92357143	5.73

Source	Pr > F
trat	0.0669

The SAS System 19
10:11 Tuesday, August 4, 2009

The GLM Procedure

Dependent Variable: t3

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Model	2	200.3667857	100.1833929	94.79
Error	4	4.2275000	1.0568750	
Corrected Total	6	204.5942857		

Source	Pr > F
Model	0.0004
Error	
Corrected Total	

R-Square	Coeff Var	Root MSE	t3 Mean
0.979337	8.516343	1.028044	12.07143

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value
trat	2	200.3667857	100.1833929	94.79

Source	Pr > F
trat	0.0004

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
trat	2	200.3667857	100.1833929	94.79

Source	Pr > F
trat	0.0004

The SAS System 20
10:11 Tuesday, August 4, 2009

The GLM Procedure
Repeated Measures Analysis of Variance

Repeated Measures Level Information

Dependent Variable	t1	t2	t3
Level of time	1	2	3

MANOVA Test Criteria and Exact F Statistics
for the Hypothesis of no time Effect
H = Type III SSCP Matrix for time
E = Error SSCP Matrix

S=1 M=0 N=0.5

Statistic	Value	F Value	Num DF	Den DF	Pr > F
Wilks' Lambda	0.01731865	85.11	2	3	0.0023
Pillai's Trace	0.98268135	85.11	2	3	0.0023
Hotelling-Lawley Trace	56.74123389	85.11	2	3	0.0023
Roy's Greatest Root	56.74123389	85.11	2	3	0.0023

MANOVA Test Criteria and F Approximations
for the Hypothesis of no time*trat Effect
H = Type III SSCP Matrix for time*trat
E = Error SSCP Matrix

S=2 M=-0.5 N=0.5

Statistic	Value	F Value	Num DF	Den DF	Pr > F
Wilks' Lambda	0.00623837	17.49	4	6	0.0019
Pillai's Trace	1.02646350	2.11	4	8	0.1714
Hotelling-Lawley Trace	154.05634197	123.25	4	2.9091	0.0014
Roy's Greatest Root	154.02230757	308.04	2	4	<.0001

NOTE: F Statistic for Roy's Greatest Root is an upper bound.
NOTE: F Statistic for Wilks' Lambda is exact.

The SAS System 21
10:11 Tuesday, August 4, 2009

The GLM Procedure
Repeated Measures Analysis of Variance
Tests of Hypotheses for Between Subjects Effects

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
trat	2	143.2853571	71.6426786	12.08
Error	4	23.7308333	5.9327083	

Source	Pr > F
trat	0.0202
Error	

The SAS System 22
10:11 Tuesday, August 4, 2009

The GLM Procedure
Repeated Measures Analysis of Variance
Univariate Tests of Hypotheses for Within Subject Effects

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
time	2	66.8445238	33.4222619	16.56
time*trat	4	142.5078571	35.6269643	17.66
Error(time)	8	16.1416667	2.0177083	

Source	Pr > F	Adj G - G	Pr > F	H - F
time	0.0014	0.0119	0.0015	
time*trat	0.0005	0.0075	0.0005	
Error(time)				

Greenhouse-Geisser Epsilon	0.5507
Huynh-Feldt Epsilon	0.9848

The SAS System 23
10:11 Tuesday, August 4, 2009

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for t1

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	4
Error Mean Square	2.12375
Harmonic Mean of Cell Sizes	1.714286

NOTE: Cell sizes are not equal.

Number of Means	2	3
Critical Range	4.370	4.466

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	trat
A	11.150	2	CTMOC
A			
A	9.350	4	Ntrat
A			
A	8.000	1	CTMO

The SAS System 24
10:11 Tuesday, August 4, 2009

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for t2

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	4
Error Mean Square	6.7875
Harmonic Mean of Cell Sizes	1.714286

NOTE: Cell sizes are not equal.

Number of Means	2	3
Critical Range	7.813	7.984

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	trat
A	17.350	4	Ntrat
A			
A	16.300	1	CTMO
A			
A	9.800	2	CTMOC

The SAS System 25
10:11 Tuesday, August 4, 2009

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for t3

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	4
Error Mean Square	1.056875
Harmonic Mean of Cell Sizes	1.714286

NOTE: Cell sizes are not equal.

Number of Means	2	3
Critical Range	3.083	3.150

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	trat
A	15.875	4	Ntrat
A			
A	13.600	1	CTMO
B	3.700	2	CTMOC

8.2. Certificado CEEA/Unicamp



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1078-1, sobre "EFEITO DO TRATAMENTO DA MALÁRIA CEREBRAL COM CÉLULAS-TRONCO ADULTAS EM CAMUNDONGOS INFECTADOS PELO PLASMODIUM BERGHEI ANKA", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo / Helen Cupertino Silva Pinto, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em 30 de agosto de 2006.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1078-1, entitled " _____ ", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on August 30, 2006.

Campinas, 30 de agosto de 2006.


Prof. Dr. Stephen Hyslop
Vice-Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA/IB - Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP - Brasil

Telefone: (19) 3788-6359
Telefax: (19) 3788-6356
E-mail: ceea@cemio.unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>

8.3. Certificado CIBio/Cemib



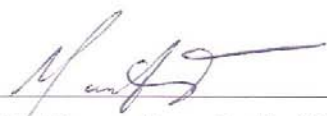
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na
Área da Ciência em Animais de Laboratório - CEMIB
INTERNATIONAL COUNCIL FOR LABORATORY ANIMAL SCIENCE
ICLAS MONITORING / REFERENCE CENTER
cemib@cemib.unicamp.br



Declaração de Aprovação CIBio/CEMIB/UNICAMP

Para quem possa interessar,

Declaro que o projeto sobre: **“Efeito do tratamento da malária cerebral com células-tronco adultas em camundongos infectados pelo *Plasmodium berghei ANKA*”**, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Ana Maria Guaraldo, com nº de protocolo: 05/2008, está de acordo com as instruções normativas que regem a biosegurança na CTNBio para AnGM classe I. Esta aprovação foi concedida na reunião de 18/03/2008, após avaliação pela Comissão Interna de Biosegurança (CIBio) do CEMIB/ UNICAMP, CQB: 237/07, pela qual o projeto será acompanhado.



Pesq. Dr. Marcus Alexandre Finzi Corat
Presidente CIBio/CEMIB/UNICAMP