

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Carolina David Vieira

**DANO PULMONAR DURANTE A MALÁRIA CAUSADA PELO
PLASMODIUM BERGHEI ANKA: INVESTIGANDO O POTENCIAL PROTETOR
DO ÔMEGA 3 RICO EM DHA**

Juiz de Fora 2023

CAROLINA DAVID VIEIRA

**DANO PULMONAR DURANTE A MALÁRIA CAUSADA PELO
PLASMODIUM BERGHEI ANKA: INVESTIGANDO O POTENCIAL PROTETOR
DO ÔMEGA 3 RICO EM DHA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, para obtenção do Título de Mestre
em Ciências Biológicas na área de Imunologia e
DIP. Orientadora: Prof.^a Dr.^a Kézia K. G. Scopel

Juiz de Fora 2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

David, Carolina.

DANO PULMONAR DURANTE A MALARIA CAUSADA PELO PLASMÓDIUM BERGHEI ANKA: : INVESTIGANDO O POTENCIAL PROTETOR DO ÔMEGA 3 RICO EM DHA / Carolina David. -- 2023. 106 p. : il.

Orientadora: Kezia Katiani G Scopel

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2023.

1. Malária Grave. 2. Plasmodium falciparum. 3. SARA. 4. DHA. I. Katiani G Scopel, Kezia , orient. II. Título.

Carolina David Vieira

**DANO PULMONAR DURANTE A MALÁRIA CAUSADA PELO PLASMODIUM
BERGHEI ANKA: INVESTIGANDO O POTENCIAL PROTETOR DO ÔMEGA 3 RICO EM
DHA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas-Imunologia & DIP/Genética & Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Imunologia & Doenças Infectoparasitárias.

Aprovada em 31 de março de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Kézia Katiani Gorza Scopel

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr^a. Juciane Maria de Andrade Castro

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Erick Esteves de Oliveira

Universidade de São Paulo

PROPP 01.5: Termo de Aprovação COORD-PPG-IMUNOLOGIA 1183007 SEI
23071.908733/2023-51 / pg. 6

Juiz de Fora, 13/03/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Erick Esteves de Oliveira Usuário** em 02/06/2023 às 16:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Kezia Katiani Gorza Scovel Professor** em 22/06/2023 às 16:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciane Maria de Andrade Castro Professor** em 22/06/2023 às 20:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Δ a autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-UFJF (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **118** e o código **48749**.

AGRADECIMENTOS

Eis que chegou o momento de expressar meus sinceros agradecimentos a todos que fizeram parte desse momento.

Primeiramente gostaria de agradecer aos membros da minha família, que me deram apoio, colo, estrutura e entenderam os vários momentos em que não pude estar presente para que esse trabalho saísse do papel. Uma atenção especial a minha melhor amiga no mundo, minha mãe, Eveline David, que sofreu junto comigo por cada dificuldade e comemorou comigo por cada conquista, a meu marido, Raphael Vasconcelos, que foi minha base durante todo esse tempo, sempre constante e sempre presente, a minha sogra, Eliana Amélia Silveira, que acreditou em mim mesmo quando eu já estava duvidando, ao meu pai Mauro Vieira, por me ajudar a fazer esse mestrado, e ao Billie, o amor da minha vida, que ficou do meu lado, literalmente, enquanto eu escrevia essa dissertação. Também gostaria de agradecer e dedicar essa dissertação ao meu avô Anderson Gazineu David, que apesar de não estar presente fisicamente, esteve comigo em cada passo desse caminho, sem sua inspiração e ensinamentos eu jamais chegaria aonde cheguei.

Agradeço também a família que a gente escolheu, meus amigos, Diana Rangel, Gustavo Souza e Cinthia Rodolphi que são as pessoas mais legais do mundo.

Agradeço imensamente aos meus amigos do laboratório de parasitologia que me ensinaram muito ao longo desses 3 anos e a minha orientadora Prof.^a Dr.^a Kézia K. G. Scopel que não aceitou menos que o meu melhor e foi a mente por trás desse trabalho incrível. Obrigada Kézia, pela oportunidade, recepção no laboratório de parasitologia, por todos os momentos de aprendizado e crescimento pessoal e acadêmico.

Agradeço também os doutores Juciane de Andrade Castro, Flávia Ribeiro Gomes e Vinicius Rocha por me ajudarem na construção desse trabalho.

A UFJF, em especial ao ICB e todos seus funcionários, e a FAPEMIG por resistirem a tempos sombrios.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Risco de infecção por malária por municípios brasileiros em 2021. Dados do Sivep-Malária atualizados em: 14/3/2022.	21
FIGURA 2: Ciclo biológico das espécies de plasmódios infectantes para o homem. Adaptado de Jensen et al., 2017.	24
FIGURA 3: Fisiologia Pulmonar.....	
FIGURA 4: Patogênese da malária cerebral.....	
FIGURA 5: Patogênese da malária pulmonar grave.	29
FIGURA 6: Mecanismos de ação dos anticorpos na imunidade antimalárica durante o estágio sanguíneo da doença.	
FIGURA 7: Delineamento experimental.	49
FIGURA 8: Estratégia de análise utilizada para fenotipagem das células pulmonares.	59
FIGURA 9: Perfil clínico de camundongos C57BL/6 pré-tratados ou não com ômega 3 rico em DHA e infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	3
FIGURA 10: Perfil parasitêmico e análise de peso corporal de camundongos C57BL/6 pré-tratados ou não com ômega 3 rico em DHA e infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	4
FIGURA 11: Alterações pulmonares em camundongos C57BL/6 pré-tratados ou não com ômega 3 rico em DHA e infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	6
FIGURA 13: Perfil fenotípico de células extraídas do pulmão de camundongos C57BL/6 pré-tratados ou não com ômega 3 rico em DHA e infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	11
FIGURA 14: Perfil fenotípico de células extraídas do pulmão de camundongos C57BL/6 pré-tratados ou não com ômega 3 rico em DHA e infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	13
FIGURA 15: Histologia de tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 pré-tratados ou não com ômega 3 rico em DHA e infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	16

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 : Manifestações clínicas e histológicas da infecção por <i>P. berghei ANKA</i> nos principais modelos murinos: C57/BL/6, CBA e BALB/C.	46
Tabela 2: Informação nutricional do suplemento óleo superconcentrado em DHA(Essential Nutrition).....	52
Tabela 3: Lista de anticorpos usados para marcação das células no tecido pulmonar.	60
Tabela 4: Avaliação dos parâmetros de patologia pulmonar	17

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1: Aprovação pelo CEUA-UFJF.....	41
ANEXO 2: Tabela utilizada para realização das avaliações clínicas dos animais após infecção.....	43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGPI	Ácidos graxos poli-insaturados
BHE	Barreira hemato encefálica
CD 36	Clauster de diferenciação 36
CD36	Clauter de diferenciação 36
CD4	Clauster de diferenciação 4
CD8	Clauster de diferenciação 8
COX-2	Enzima ciclooxygenase 2
CS	Proteína circusporozoíta
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DHA	Ácido docosahexaenoico
ED	Edema
EPA	Ácido eicosapentaenoico
GPA	Glicofosfatidilinositol
HSPGs	Proteoglicanos altamente sulfatados
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular-1
IFN- γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina-10
IL12	Interleucina 12
IL-6	Interleucina 6
LPA	Lesão pulmonar aguda
MC	Malária Cerebral
MSP-1	Proteína 1 de superfície de merozoíto

NO	Oxido Nitrico
NTA	Necrose tubular aguda
OMS	Organização mundial da saúde
PAMP	Partícula molecular associada a patógenos
PbA	<i>Plasmodium berghei ANKA</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PfEMP-1	Proteína de membrana de eritrócito de <i>Plasmodium falciparum</i> 1
PUFAS	Ácidos graxos polissaturados
SARA	Síndrome da angústia respiratória aguda
SNC	Sistema Nervoso Central
TLP	Trap-like protein
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VCAM-1	Proteína de adesão celular vascular-1
N	Normal
NM	Nanômetro

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	A malária: um breve histórico.....	16
1.2	Distribuição atual da malária no mundo	19
1.3	Ciclo evolutivo do parasito no hospedeiro vertebrado	21
1.5	Malária não complicada.....	24
1.6	Malária complicada.....	25
1.6.4	Malária pulmonar.....	26
1.7	Imunidade antimalária	29
1.8	Terapias adjuvantes na malária grave	36
1.9	DHA- ÓLEO DE PEIXE	39
1.10	A IMPORTÂNCIA DO USO DO MODELO MURINO NAS INFECÇÕES MALÁRICAS	43
2	JUSTIFICATIVA.....	47
3	OBJETIVOS.....	48
3.1	Objetivo geral48
3.2	Objetivos específicos	48
4	METODOLOGIA	49
4.1	ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	49
4.1.1	TRATAMENTO COM ÓLEO DE PEIXE RICO EM DHA	51
4.2	INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM <i>PbANKA</i>	52
4.3	AVALIAÇÃO CLÍNICA, PARASITEMIA SANGUÍNEA E DETERMINAÇÃO DE CURVA DE SOBREVIVÊNCIA.....	53
4.4	EUTANÁSIA.....	54
4.5	AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE CELULAR PULMONAR	54
4.6	AVALIAÇÃO DO EDEMA PULMONAR	55

4.7	EXTRAÇÃO DE CITOCINAS DO TECIDO PULMONAR	55
4.8	ELISA DE CITOCINAS	56
4.9	PROCESSAMENTO DO TECIDO PULMONAR PARA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	57
4.10	OBTENÇÃO DE CÉLULAS DO TECIDO PULMONAR.....	57
4.11	IMUNOFENOTIPAGEM DAS CÉLULAS OBTIDAS DO TECIDO PULMONAR	58
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
5	RESULTADOS	3
6	DISCUSSÃO.....	18
7	CONCLUSÃO	26
8	REFERÊNCIA	27

RESUMO

Em pleno século XXI a malária ainda constitui um dos maiores flagelos da humanidade, sendo responsável por milhares de casos clínicos e óbitos ao redor do mundo. Relacionadas em sua maioria a infecções por *Plasmodium falciparum*, as mortes associam-se a múltiplos eventos patogênicos que ocorrem de maneira sistêmica em órgãos como cérebro, pulmões, rins e fígado. Em contraste ao observado para a malária cerebral, a síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) ocorre mais frequentemente em adultos que em crianças sendo considerada uma importante complicação da infecção malárica podendo levar ao óbito. Dentre os fatores que contribuem para o acometimento pulmonar destaca-se a secreção de mediadores inflamatórios, permeabilidade vascular endotelial e aderência de hemácias parasitadas aos capilares endoteliais. O óleo de peixe tem sido amplamente estudado pelo seu potencial de modulação da resposta imunológica, sendo indicado como uma possível alternativa no tratamento da SARA. Assim, esse estudo tem por objetivo avaliar o papel protetor do óleo de peixe rico em DHA a nível pulmonar durante a malária experimental, para tal, camundongos C57BL/6 foram tratados profilaticamente com 3,0 e 6,0 g/Kg de DHA contido em óleo de peixe durante 15 dias procedendo-se, a seguir, a infecção com *Plasmodium berghei* ANKA. Os animais foram avaliados diariamente quanto ao perfil clínico sendo eutanasiados no 7º ou 12º dia para avaliação do perfil histopatológico dos pulmões, avaliação do perfil de citocinas, ocorrência de permeabilidade vascular, edema e perfil celular. Foi possível observar que os animais tratados demonstraram um aumento significativo de sua sobrevivência, assim como uma preservação das atividades motoras clinicamente avaliadas. Do mesmo modo houve a manutenção das barreiras hemato-alveolares e a diminuição de edema pulmonar, que são características patológicas do acometimento pulmonar durante a malária severa. Quando analisados as citocinas pró e anti-inflamatórias, houve uma diminuição de citocinas inflamatórias quando comparadas com o grupo apenas infectado e um aumento de IL-10 em grupos tratados. A análise do perfil fenotípico celular demonstrou uma diminuição de leucócitos totais assim como uma diminuição de linfócitos TCD8 em animais previamente tratados, assim como uma modulação na ativação de macrófagos e células dendríticas. A histopatologia dos animais tratados corroborou com o estudo demonstrando uma diminuição de edema pulmonar, preservação de permeabilidade vascular e ausência de hemorragia.

Palavras chave: malária pulmonar, ômega 3, DHA, Tratamento adjuvante

ABSTRACT

In the 21st century, malaria is still one of the greatest scourges of humanity, being responsible for thousands of clinical cases and deaths around the world. Mostly related to *Plasmodium falciparum* infections, deaths are associated with multiple pathogenic events that occur systemically in organs such as the brain, lungs, kidneys and liver. In contrast to what is observed for cerebral malaria, acute respiratory distress syndrome (ARDS) occurs more frequently in adults than in children and is considered an important complication of malarial infection, which can lead to death. Among the factors that contribute to pulmonary involvement, the secretion of inflammatory mediators, endothelial vascular permeability and adherence of parasitized red blood cells to endothelial capillaries stand out. Fish oil has been widely studied for its potential to modulate the immune response, being indicated as a possible alternative in the treatment of ARDS. Thus, this study aims to evaluate the protective role of fish oil rich in DHA at the pulmonary level during experimental malaria, for this purpose, C57BL/6 mice were prophylactically treated with 3.0 and 6.0 g/Kg of DHA in fish oil for 15 days, followed by infection with *Plasmodium berghei* ANKA. The animals were evaluated daily for the clinical profile, being euthanized on the 7th or 12th day for evaluation of the histopathological profile of the lungs, evaluation of the cytokine profile, occurrence of vascular permeability, edema and cellular profile. It was possible to observe that the treated animals showed a significant increase in their survival, as well as a preservation of clinically evaluated motor activities. Likewise, blood-alveolar barriers were maintained and pulmonary edema was reduced, which are pathological characteristics of pulmonary involvement during severe malaria. When analyzing pro and anti-inflammatory cytokines, there was a decrease in inflammatory cytokines when compared to the only infected group and an increase in IL-10 in treated groups. Analysis of the cellular phenotypic profile showed a decrease in total leukocytes as well as a decrease in CD8 T lymphocytes in previously treated animals, as well as a modulation in the activation of macrophages and dendritic cells. The histopathology of the treated animals corroborated the study, demonstrating a decrease in pulmonary edema, preservation of vascular permeability and absence of hemorrhage.

Keywords: pulmonary malaria, omega 3, DHA, Adjunctive treatment

1 INTRODUÇÃO

1.0 A MALÁRIA: UM BREVE HISTÓRICO

Conhecida, dentre outras denominações, como maleita, paludismo, febre terçã, febre quartã, a malária é uma doença infecctoparasitária causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. Sua transmissão por meio dos mosquitos do gênero *Anopheles* fez com que a doença assolasse a humanidade através dos anos (ESCALANTE *et al*, 1998)

A malária surgiu por volta de dez mil anos atrás, mas foi com o advento da agricultura que teve força para sua disseminação através dos continentes (MU *et al*, 2005). Práticas como desmatamentos, aumento na taxa de natalidade, ampliações do abastecimento de água e de áreas alagadas contribuíram para a multiplicação do mosquito transmissor que passou a se alimentar cada vez mais de sangue humano ao invés de adentrar as matas a procura de animais (ARMELAGOS *et al*, 1991).

As primeiras associações históricas entre a proximidade de áreas alagadas e a incidência de febres na população local foram descritas pelo fisiologista grego Hipócrates nos séculos IV e V a.C. Além disso, existem inúmeras referências às febres intermitentes características da malária na literatura chinesa do primeiro milênio a.C. (SALLERES *et al*, 2004). Podemos encontrar ainda descrições da doença entre os sumérios, chineses, povos da Índia e África, incluindo os povos egípcios (ESCALANTE *et al*, 1998). Em 2010, um estudo publicado na revista científica internacional *Journal of the American Association* sugere que a morte do faraó egípcio Tutancamon pode ter ocorrido em consequência de uma infecção malárica já que no material mumificado foram encontrados traços genéticos de *Plasmodium falciparum* (HAWASS, 2010).

Epidemias da doença, ocorridas na antiguidade também podem ser constatadas através de sítios arqueológicos como os de um cemitério em Lugano datado de 450 d.C. O terreno abrigava um número excessivo de crianças enterradas em um curto espaço de tempo. Restos de plantas características do início do verão indicava o período chuvoso favorável à proliferação do mosquito. A hipótese de que o cemitério seria cenário de uma epidemia de malária foi comprovada através da amplificação de DNA ribossomal de *P. falciparum* extraído de amostras de osso do esqueleto infantil (SALLERES *et al*, 2004).

Pasteur e Koch no final do século XIX realizaram descobertas sobre os microrganismos que mudariam a forma com que a malária era descrita inicialmente, ou seja, como doença que afetava apenas habitantes de áreas pantanosas, para a real busca de seu agente causador. Mas foi Alphonse Laveran que, ao analisar o sangue fresco de um paciente que apresentava febre recorrente, dores no corpo, calafrios e outros sintomas relacionados hoje a malária pôde identificar “pigmentos” presentes em células sanguíneas como leucócitos e eritrócitos que não eram visualizados em sangue de pessoas saudáveis, formulando assim, sua teoria de que a malária era causada por um protozoário e não por uma bactéria como se acreditava até o momento. Sua descoberta foi recebida com ceticismo pela comunidade científica, já que era a primeira vez que a causa de uma doença era atribuída a um país confirmaram suas conclusões. Em 1907, Laveran recebeu o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia pela descoberta do plasmódio e por seus estudos sobre o papel dos protozoários como agentes nas moléstias (COX, 2010).

No contexto da história da doença do mundo observa-se que as grandes epidemias da doença sempre estiveram associadas a intervenções humanas no ambiente. No Brasil, a ocupação desenfreada na região amazônica, impulsionada pela instalação de usinas hidroelétricas, projetos agropecuários e a abertura de garimpos aumentaram significativamente a transmissão da malária no início da década de 1980 (MARQUES, PINHEIRO, 1982). Na época, 97,5% dos casos de malária registrados no Brasil eram provenientes dessa região do país. Desde então, a incidência da malária aumentou em até 3 vezes passando de 52.469 casos em 1970 para 169.871 em 1980 (BARATA, 1995).

No fim do século XIX, ouve o aparecimento de uma epidemia com números alarmantes na Amazônia. O incentivo financeiro aos extratores da borracha, matéria prima preciosa ne época, levaram para a Amazônia as populações mais desgastadas do Brasil. (BARATA, 1995).

O Brasil iniciou então as obras da estrada de ferro com objetivo de dar vazão ao látex boliviano: a Estrada de Ferro Madeira-Mamoré. A estrada ligaria parte de Porto Velho a Guajará-Mirim no rio Mamoré. Apesar dos percalços que levaram milhares de trabalhadores a óbito, a estrada foi concluída, deixando para a época o título de segunda grande epidemia amazônica de malária que pode ser testemunhada por Oswaldo Cruz e Carlos Chagas (CAMARGO, 2003).

Em 1965 a Campanha de Erradicação da Malária, idealizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), baseada no uso do diclorodifeniltricloroetano (DDT) contra os vetores

transmissores e no uso de drogas antimaláricas para erradicação das fontes de infecção (tratamento de pessoas infectadas), foi capaz de eliminar a malária de grande parte do território nacional como as regiões Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul. Entretanto a Amazônia oferecia desafios mais complexos que contribuíram para a falha desse programa. Em sua maioria, as casas da região apresentavam limitações ao uso do DDT, uma vez que, predominavam habitações precárias, sem superfícies que permitissem uma aplicação de forma correta do produto e colocava a estratégia em risco. Sendo assim, o programa não pode se sustentar em cima dessa proposta já que a aplicação do inseticida de ação residual não era possível. Não somente a esse fato, observou-se que a transmissão extradomiciliar era boa parte das transmissões relacionadas a região, o que também comprometia o sucesso dessa estratégia. Somado a isso, começaram a surgir os primeiros sinais de resistência de *P. falciparum* à droga cloroquina devido ao contato massivo da população com a droga em baixas dosagens que facilitaram a seleção natural desses protozoários e tornava o sonho da erradicação ainda mais distante (LOIOLA *et al*, 2002).

Na década de 90 o número de casos atingiu seu ápice com registro de 632.813 casos em 1999. Desses 99,7% ocorreram na Amazônia Legal (composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins). Perante desse cenário preocupante o Ministério da Saúde lançou junto a OMS o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal no ano 2000 em parceria com os municípios e estados amazônicos. Esse plano estava embasado na vigilância epidemiológica, assistência ao paciente, promoção e mobilização social. As estratégias foram iniciadas de forma integrada, visando a determinação das características de cada região. Assim, a gestão foi organizada pelos estados e municípios, demonstrando as particularidades para o controle da malária em cada localidade (BARATA, 1995).

Na atualidade, a malária continua a ser um sério problema de saúde pública em grande parte do continente mundial, sendo, anualmente, responsável por centenas de mortes, sobretudo de crianças abaixo de 5 anos. Nesse sentido, seu controle e erradicação continuam a ser um sério desafio.

1.1 DISTRIBUIÇÃO ATUAL DA MALÁRIA NO MUNDO

Somente cinco espécies de plasmódios das 150 descritas causam malária humana. São elas: *P. falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium malariae*. No Brasil a doença é causada apenas por *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* (FRANÇA *et al*, 2008)

Estudos recentes demonstraram que as espécies de plasmódios que infectam primatas, como *Plasmodium brasilianum* e *Plasmodium simium*, são geneticamente similares a *Plasmodium malariae* e *Plasmodium vivax* de humanos, respectivamente. Essa descoberta levou pesquisadores a concluir que as espécies descritas poderiam infectar tanto humanos quanto primatas não humanos e esses manteriam a malária na natureza. Sendo assim, a vigilância da infecção em macacos foi colocada como de alta importância para os programas de controle da malária (TAZI, AYALA, 2011). Recentemente casos de infecções humanas por *Plasmodium simium* e *Plasmodium cynomolgi*, reforçaram essa hipótese ao serem demonstradas na região litorânea brasileira, mais especificamente áreas de mata atlântica (TAZI, AYALA, 2011).

No cenário mundial, segundo o último relatório da Organização Mundial da Saúde, as mortes por malária reduziram de forma constante no período 2000–2019, passando de 896.000 em 2000 para 562.000 em 2015 e para 558.000 em 2019. A porcentagem do total de mortes por malária em crianças menores de 5 anos reduziu de 87% em 2000 para 77% em 2020 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Contudo, devido as interrupções no serviço de controle da doença (diagnóstico, tratamento e controle de vetores) durante a pandemia de COVID-19, em 2020, os óbitos por malária aumentaram 12% em comparação ao número registrado em 2019, chegando a aproximadamente 627.000 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Vinte e nove países foram responsáveis por 96% dos casos de malária em todo o mundo e seis países – Nigéria (27%), República Democrática do Congo (12%), Uganda (5%), Moçambique (4%), Angola (3,4%) e Burkina Faso (3,4%) – representaram cerca de 55% de todos os casos globalmente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Na Região Africana estima-se que tenham ocorrido 228 milhões de casos clínicos da doença em 2020 contabilizando cerca de 95% dos casos do mundo todo. Isso ocorre devido a pobreza da região e o difícil acesso a população para prevenção e tratamento (WORLD

HEALTH ORGANIZATION, 2021). Nesse mesmo ano, o número de óbitos registrados foi de 602.000, o que representa uma redução de 36% em relação ao verificado em 2019.

Nas Américas, os casos de malária foram reduzidos em 58% (de 1,5 milhão para 0,65 milhão) e incidência de casos em 67% entre 2000 e 2020 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Em contrapartida a República Bolivariana da Venezuela sofreu com o grande aumento no número de casos entre os anos 2000 e 2019 (35 mil para 467 mil, respectivamente) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

No Brasil atualmente 99% da transmissão da malária ainda se concentra na região Amazônica onde a principal espécie é *P. vivax*. Os outros 1% são correlacionados com a região extra-amazônica, com mais frequência nas áreas de Mata Atlântica. Esses casos são em sua maioria importados de outros estados ou países endêmicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Diante do cenário mundial da epidemiologia da malária, em outubro de 2021, a OMS recomendou o amplo uso da vacina RTS,S/AS01 (RTS,S) que obteve 77% de eficácia em estudos clínicos preliminares para crianças que vivem em regiões onde as taxas de transmissão de malária por *P. falciparum* são de moderadas a altas. A recomendação devido uma revisão do pacote completo de evidências sobre a vacina, além de resultados de estudos iniciais coordenado pela OMS que atingiu mais de 830.000 crianças em 3 países africanos desde 2019 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

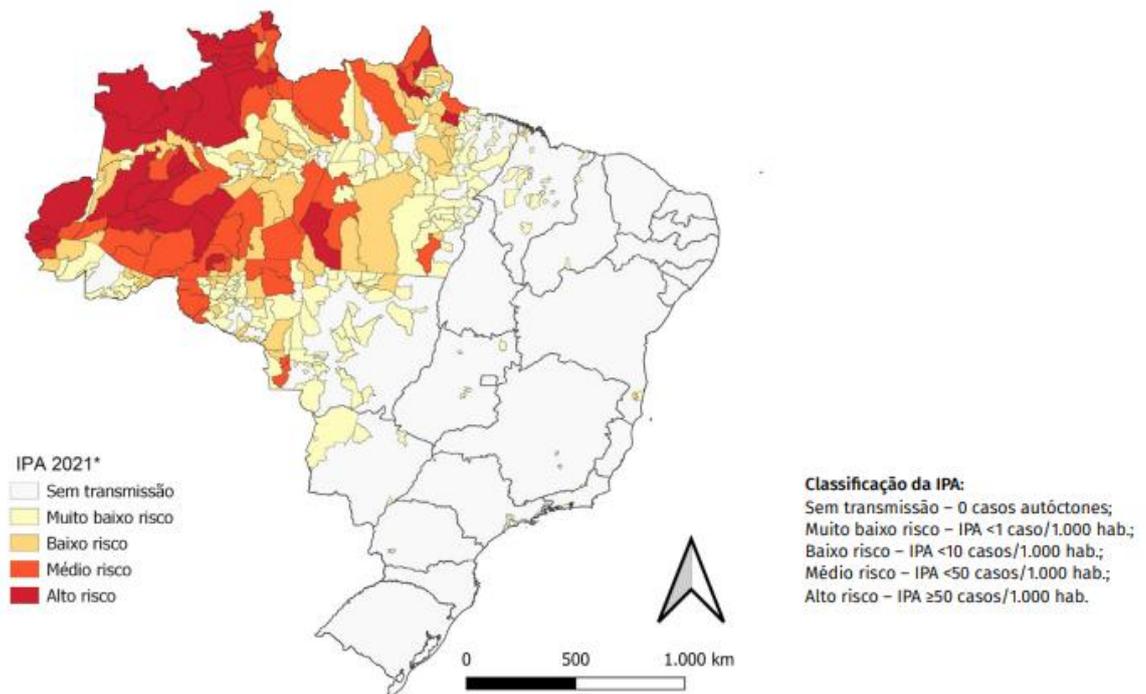


FIGURA 1: Risco de infecção por malária por municípios brasileiros em 2021. Fonte dados do Sivep-Malária atualizados em: 14/3/2022.

1.2 CICLO EVOLUTIVO DO PARASITO NO HOSPEDEIRO VERTEBRADO

Plasmodium spp. são protozoários intracelulares obrigatórios, com um ciclo complexo alternando entre o vetor, os mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles*, e hospedeiros vertebrados. Durante o repasto sanguíneo do mosquito os esporozoítos, formas infectantes do parasito, são injetados na derme do hospedeiro vertebrado juntamente com substâncias vasodilatadoras e anticoagulantes presentes na saliva (COWMAN, 2016)

Uma vez na derme do hospedeiro vertebrado, os esporozoítos podem atingir distintos que vão definir o sucesso da infecção. Um dos caminhos implica em sua retenção na derme após exaustão celular onde serão posteriormente degradados. A *Trap-like protein* (TLP) parece desempenhar um papel importante na saída da derme, pois os esporozoítos que não a expressam apesar de exibirem motilidade normal, não conseguem entrar na circulação sanguínea (TAVARES *et al.*, 2013). Os esporozoítos que adentram os vasos do sistema linfático são drenados até o linfonodo mais próximo onde são degradados (AMINO *et al.*, 2006). Somente aqueles que alcançam a circulação por meio de movimentos tipo “*gliding*” proporcionada

principalmente pela proteína adesiva relacionada a *trombospondina* (TRAP) (TROTTEIN; et al, 1995) e pela *proteína circosporozoíta* (CS) ambas presentes na superfície do parasito, conseguem dar continuidade ao processo infectante (COWMAN et al., 2016; SOLDATI; et al, 2004). . A invasão dos hepatócitos ocorre após os esporozoítos atravessarem a barreira sinusoidal que são as células endoteliais fenestradas e células de Kupffer do fígado (TAVARES et al., 2013)

A invasão dos hepatócitos necessita de ligação da proteína CS a proteoglicanos altamente sulfatados (HSPGs), (HERRERA et al., 2015). Uma vez que a infecção dos hepatócitos é estabelecida, cada parasito intracelular se multiplica assexuadamente por esquizogonia originando, ao longo de 2–10 dias subsequentes, até 40.000 merozoítos (STURM et al., 2006). Cabe ressaltar que os merozoítos hepáticos são liberados para a circulação envoltos em vesículas chamadas merossomas (WHITE, 2003; STURM et al., 2006)). Os merossomas atravessam o espaço de Disse por diapedese, protegendo o *Plasmodium* e fazendo com que o reconhecimento nas células de Kupfer seja prejudicado. No sangue, os merossomas são levados para outros órgãos e, devido às forças de cisalhamento das veias hepáticas e de outras veias maiores, eles se dividem e, então, são levadas ao coração e para os pulmões. A partir daí se acumulam nos capilares pulmonares, onde irá ocorrer a degeneração dos merossomas e a posterior liberação dos merozoítos na microcirculação pulmonar. Essa estratégia garante ao parasito vantagens evolutivas devido a diminuída quantidade de macrófagos nessa região, além da diminuição da velocidade da corrente sanguínea que ocorre devido obstrução dos capilares pelos merossomas promove um acúmulo de eritrócitos, o que facilita o sucesso da infecção pelo parasito (FADOK et al., 2001; LI et al., 2003; STURM et al., 2006; BAER et al., 2007).

Enquanto a fase hepática de desenvolvimento do parasito é silenciosa, a fase sanguínea está associada a todas as manifestações clínicas da doença (SINDEN 1983).

Uma vez na circulação, os merozoítos livres invadem os eritrócitos em um processo rápido, dinâmico e de várias etapas (WEISS et al., 2015). Esse processo rápido é necessário para que o sistema imunológico não seja capaz de impedir completamente a interação entre receptores celulares e ligantes expressos na superfície celular dos parasitos o poderia determinar negativamente o sucesso da infecção (COWMAN; CRABB, 2006).

Dentre as várias proteínas conhecidas dos plasmódios, a *Proteína 1 de superfície de merozoíto* (MSP-1), a *proteína homóloga ligante de reticulócitos* (RHs), e o *antígeno 1 de*

membrana apical (AMA1), são as principais proteínas envolvidas no reconhecimento e invasão dos eritrócitos (COWMAN; CRABB, 2006).

Após invasão eritrocítica, os parasitos dão início a novos ciclos de reprodução assexuada denominada esquizogonia sanguínea. Nesse ponto o parasito passa pelos estágios de trofozoítos jovens, trofozoítos maduros e posteriormente esquizontes multinucleados. O ciclo esquizogônico sanguíneo varia de acordo com a espécie do parasito, demorando 48 horas para as espécies *P. falciparum*, *P. vivax*, e *P. ovale* e 72 h para *P. malariae*. Cada esquizonte é progenitora de milhares de merozoítos sanguíneos que romperão os eritrócitos e darão início a novos ciclos eritrocíticos (COWMAN; CRABB, 2006).

No hospedeiro humano, parte dos parasitos assexuados desenvolvem-se em estágios sexuais masculinos e femininos chamados gametócitos, alguns dos quais podem ser ingeridos por um mosquito durante o repasto sanguíneo. A fertilização subsequente de gametas e o desenvolvimento em esporozoítos dentro do mosquito permitem que esse repasse a infecção a outro ser humano. (SINDEN 1983).

No caso das infecções por *P. vivax* e *P. ovale* outro caminho pode ser tomado pelos esporozoítos que invadem os hepatócitos. Os parasitos dessa espécie têm a capacidade de entrar em uma espécie de latência nas células hepáticas. Esses esporozoítos são chamados de hipnozoítos e quando ativados, geralmente após 3 meses da infecção inicial, levam ao desenvolvimento novamente da doença clínica (COLLINS, JEFFERY, 1999). Esse evento caracteriza as chamadas recaídas tardias da doença.

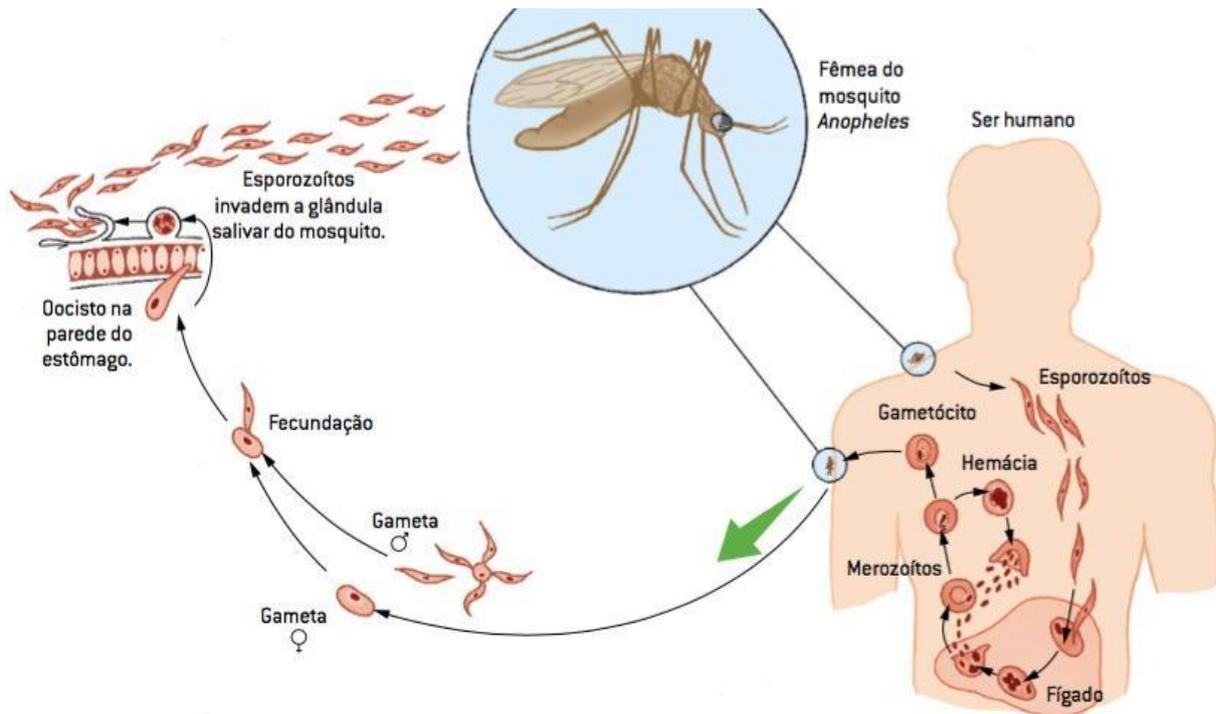


FIGURA 2: Ciclo biológico das espécies de plasmódios infectantes para o homem.

Adaptado de Jensen et al., 2017. As formas esporozoítas do parasito são inoculadas na derme do hospedeiro vertebrado e dão início ao ciclo hepático, onde há o desenvolvimento de merozoítos que serão liberados na corrente sanguínea. Estes são capazes de invadir hemácias, onde ocorrerá o chamado ciclo sanguíneo com consequente formação de trofozoítos jovens, maduros, esquizontes e gametócitos. Os gametócitos quando ingeridos pelo mosquito vetor darão início ao ciclo sexuado do parasito, a partir da formação de esporozoítos e, consequente inoculação em outro hospedeiro vertebrado. Fonte: Adaptado de White, N.J. e colaboradores, 2014.

1.3 MALÁRIA NÃO COMPLICADA

A malária é uma doença complexa e suas manifestações diferem entre crianças e adultos (MILLER *et al*, 2002). As crianças com malária, além dos sintomas clássicos, ficam sonolentas e astênicas, perdem o apetite, sentem muito frio e ainda podem ter vômitos e convulsões devido a febre que varia de 38,5°C a 40°C. Os sintomas nos adultos podem variar de ausentes, em indivíduos imunes, a leve ou grave (TACHADO *et al.*, 1995).

Os sintomas clássicos da malária não diferem entre as espécies de plasmódios infectantes resultando do seu ciclo eritrocítico, mais precisamente do rompimento das hemácias quando, proteínas e subprodutos do metabolismo do parasito como, *glicofosfatidilinositol* (GPI) e *hemozoína* são liberados na corrente sanguínea. A *hemozoína* se apresenta como um ligante dos TLR 9 com a consequente secreção de IL 6, IL 12 e TNF- α . Além da *hemozoína*, o *glicosilfosfatidilinositol* (GPI) é também uma reconhecida partícula molecular associada a

patógenos (PAMP) (DOSTERT *et al.*, 2009). Com o rompimento das hemácias infectadas o paciente passa a apresentar os sintomas clássicos como calafrios, dores de cabeça e o ciclo de febres que podem acometer o paciente infectado a cada 48h (febre terçã) ou a cada 72h (febre quartã) (TACHADO *et al.*, 1995).

A ocorrência da doença com seu sintoma clássico é chamada de malária não complicada, porém, quando não tratada a doença pode evoluir para a forma grave, onde o comprometimento de variados órgãos e sistemas é observado. Nesse caso, a malária grave ou complicada pode levar o indivíduo ao óbito e está na maioria dos casos está relacionada a infecção por *P. falciparum* (TACHADO *et al.*, 1995). Nos anos recentes, contudo, o interesse em *P. vivax* tem aumento devido, sobretudo, aos relatos de malária grave associados a essa espécie (DOSTERT *et al.*, 2009).

1.4 MALÁRIA COMPLICADA

Somente uma pequena minoria de infecções (menos de 1–2%), sobretudo por *P. falciparum*, levam à malária grave (BERENDT *et al.*, 1994). Contudo, durante o estabelecimento dessa síndrome sistêmica, órgãos importantes são acometidos destacando-se cérebro (malária cerebral), pulmões (síndrome do desconforto respiratório aguda (SARA), fígado e rins (insuficiência renal aguda). Em crianças, as três principais complicações da doença são malária cerebral, anemia grave e acidose metabólica. Nas infecções por *P. falciparum* a gravidade da doença é, pelo menos em parte, exacerbada por cargas parasitárias altas e pelos padrões de sequestro de eritrócitos infectados no endotélio vascular o que pode ser interpretado como estratégia de evasão do parasito a mecanismos imunes do hospedeiro (BERENDT *et al.* 1994).

A adesão dos parasitos a células endoteliais dos vasos de pequeno calibre é mediada pela interação receptor-ligante. Os principais receptores que interagem com o eritrócito infectado via *proteína de superfície de merozoito de Plasmodium falciparum* (PfEMP1) são ICAM-1 (cérebro), VCAM-1 (neurônio, fibroblastos e células endoteliais), CD36 (plaquetas), trombospondina, E-selectina e CSA (presente na placenta). (WASSMER *et al.*, 2008). A PfEMP1 é codificada por uma família de aproximadamente 60 genes *var* por genótipo expresso

de forma mutuamente exclusiva, levando à exibição de uma única variante de PfEMP1 na superfície do eritrócito a cada ciclo esquizogônico (SCHOFIELD; GRAU, 2005).

A inflamação local e tecidual decorrente da citoaderência leva a um aumento da expressão de integrinas de adesão endotelial que contribuem para o acúmulo de leucócitos no local, que, por sua vez, produzem *quimiocinas* (CXCL10, CCL5, CCL2) capazes de recrutar neutrófilos, macrófagos, células T, células NK que por sua vez darão continuidade ao processo inflamatório (SCHOFIELD; GRAU, 2005).

Os principais eventos característicos da malária grave são a Malária cerebral, Insuficiência renal aguda, Malária placentária, Anemia Grave e Malária pulmonar, que será mais amplamente abordada a seguir.

1.4.1 Malária pulmonar

O conceito de Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA), foi apresentado pela primeira vez em 1967 por Ashbaugh e colaboradores e foi atualizado em 2012 para determinar critérios mais precisos, dando fidedignidade para pesquisas clínicas e definição da conduta terapêutica ao paciente (VAN DEN STEEN *et al*, 2013).

A publicação da Definição de Berlim pela “The ARDS Task Force” classifica a SARA em grau leve, moderada ou grave. Além disso, os critérios de período clínico, imagem torácica, origem do edema e oxigenação são levados em consideração (VAN DEN STEEN *et al*, 2013). Quando ao período clínico, o paciente deve apresentar sintomas em um período de 1 semana após a infecção atingir o sistema pulmonar, afetando a respiração. A imagem torácica deve apresentar opacidade bilateral, sendo identificada por radiografia ou tomografia computadorizada. Finalmente, a classificação da SARA em leve, moderada ou grave é classificada devido ao grau de hipoxemia, mensurada pela relação entre a pressão arterial parcial de O₂ (PaO₂) e a fração inspirada de oxigênio (FIO₂).

Sendo assim, a SARA leve compreende uma PaO₂/FIO₂ ≤ 300 mm Hg e > 200 mmHg); a SARA moderada a relação PaO₂/FIO₂ é ≤ 200 mmHg e > 100; e na SARA grave a PaO₂/FIO₂ é ≤ 100 mmHg, em níveis de pressão positiva expiratória final (PEEP) ou pressão positiva contínua nas vias aéreas CPAP ≥ 5 mmHg. A elevação do espaço morto fisiológico e

diminuição da complacência pulmonar também são observados (VAN DEN STEEN *et al*, 2013).

A lesão pulmonar aguda (LPA) e a SARA já foi relatada em casos complicados de malária em todo o mundo. Ela é uma consequência do aumento da permeabilidade da membrana capilar alveolar, gerando acúmulo do líquido rico em proteínas na região intrapulmonar. A função pulmonar é comprometida devido a um distúrbio da ventilação com a perfusão. Nesta fase a ventilação ocorre normalmente, porém, o sangue circula através de alvéolos colapsados e o pulmão edematoso não participa das trocas gasosas, não ocorrendo difusão (LEWIS, MARTIN, 2004).

A patologia pulmonar mais significativa, induzida pela malária é o edema pulmonar agudo. Esse quadro possui as mesmas características clínicas do edema pulmonar cardiogênico agudo, exceto que as pressões de enchimento do lado direito não são elevadas, a menos que tenham sido administrados fluidos intravenosos em excesso (TAYLOR *et al.*, 2006)

A citoaderência na microcirculação pulmonar gera a evolução do quadro envolvendo edema intersticial, engrossamento do septo alveolar e diminuição do lúmen dos capilares com a ativação endotelial e recrutamento da resposta inflamatória, levando a quadros de lesão pulmonar, que pode permanecer em pacientes mesmo após o tratamento com drogas antimaláricas. Além disso, a malária eleva as citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , que estão, por sua vez, relacionadas ao aumento de expressão de moléculas de adesão endotelial, além de IL-1, IL-6, e IL-8 que podem contribuir para a elevação de líquido entre o alvéolo e o capilar, resultando, assim, em edema pulmonar, que posteriormente irá caracterizar SARA (TAYLOR *et al*, 2012).

Outro fator que aumenta a inflamação tecidual é o acúmulo de hemozoína, que aumenta o peso pulmonar e edema alveolar em modelos experimentais, além de ser uma substância frequentemente observado em autópsia de crianças que faleceram devido ao quadro de malária grave na África (VAN DEN STEEN *et al*, 2013).

Estudos demonstram que a diminuição da presença de pneumócitos do tipo II desencadeia um desequilíbrio no transporte de fluídos, além de diminuir a produção de surfactante. O surfactante, como já demonstrado no tópico de fisiologia pulmonar, é constituído por um complexo de componentes principalmente fosfolipídeos, além de conter proteínas, colesterol, glicolipídeos e ácidos graxos livres e são responsáveis pela manutenção da tensão

superficial. Sendo assim, a diminuição do surfactante leva a uma diminuição da complacência pulmonar, aumento da elastância estática pulmonar, áreas de atelectasia e extravasamento de fluido ao espaço alveolar (Van Den Steen et al, 2013).

Assim, a obstrução dos capilares e vênulas, mais a inflamação local exacerbada em conjunto com a lesão da barreira alvéolo-capilar, causa a síndrome do desconforto respiratório agudo (TAYLOR *et al*, 2012).

Dispneia e tosse são os principais sintomas da doença pulmonar induzida pela malária, podendo alguns pacientes também relatarem precordialgia. A dispneia pode começar abruptamente e progredir rapidamente. Os sinais físicos refletem a gravidade do envolvimento pulmonar subjacente e incluem respiração difícil, taquipneia, cianose periférica e central, crepitações inspiratórias e sibilos expiratórios (TAYLOR *et al.*, 2002). O pulso venoso jugular não é elevado a menos que haja sobrecarga de fluido concomitante. Em pacientes gravemente hipóxicos, confusão e agitação podem estar presentes e não podem ser diferenciadas do envolvimento cerebral (TAYLOR *et al*, 2002).

A SARA associada à malária grave é uma patologia que atinge entre 5% e 20% das pessoas infectadas por *P. falciparum*, das quais cerca de 80% veem a óbito mesmo quando submetidas a tratamento hospitalar com terapia intensiva (SERCUNDES *et al*, 2022).

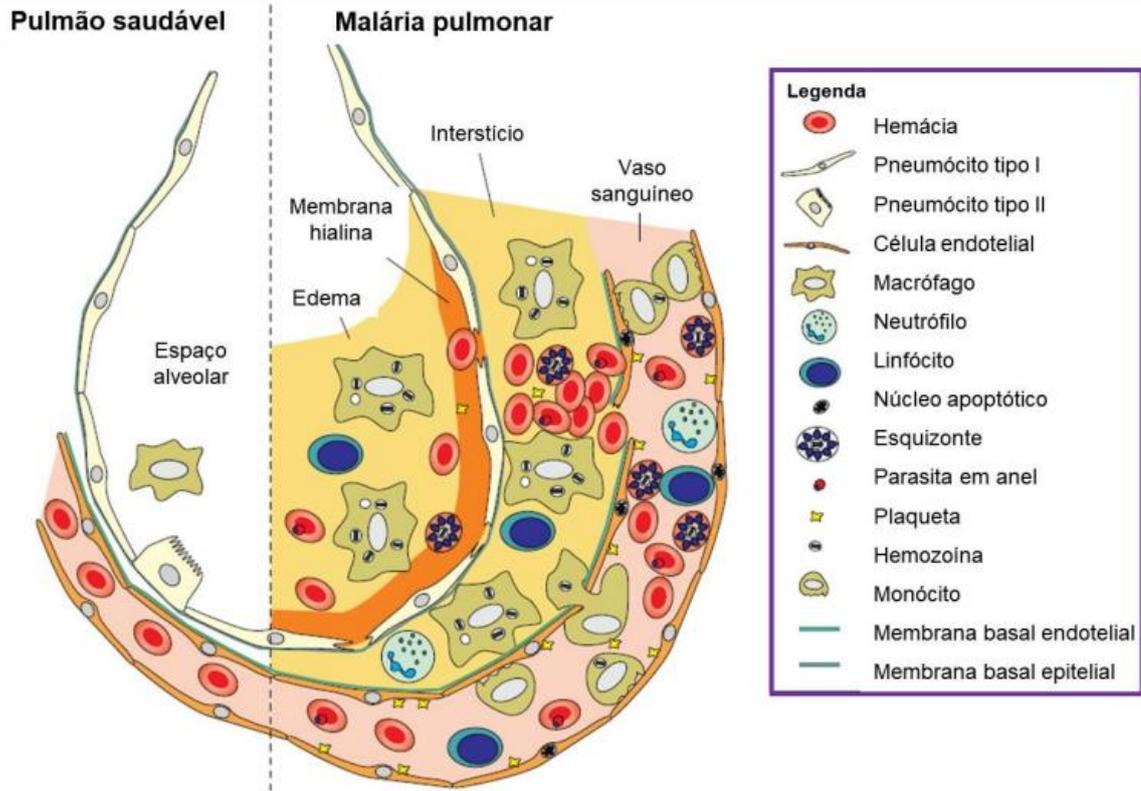


FIGURA 3: Patogênese da malária pulmonar grave. Sequestro de eritrócitos infectados são capazes de amplificação a imunopatologia local. A hemozoína encontrada em fagócitos aumentam a inflamação pulmonar. Além disso, há um aumento massivo de marginação e infiltrado de células inflamatórias, principalmente monócitos ou macrófagos, e presença de plaquetas em vasos sanguíneos, tecido intersticial e alvéolos. A lesão e apoptose das células endoteliais levam a um aumento da permeabilidade vascular e micro-hemorragias. Fonte: Adaptado de VAN DE STEEN et al., 2013

1.5 IMUNIDADE ANTIMALÁRICA

A ausência de uma resposta imunológica robusta, eficiente e durável contra os plasmódios ainda norteiam a inexistência de uma vacina antimalárica. A diversidade de componentes que podem nortear o processo imunológico vai de idade, estado imunológico do hospedeiro até o complexo ciclo do parasito e suas formas de evasão do sistema imune. A seguir abordaremos o papel das diversas populações celulares que interagem propiciando o controle da infecção malárica até que a resposta imune adaptativa esteja estabelecida.

A resposta imune é o fator de suma importância para o controle de qualquer infecção. Assim, seu estabelecimento é fundamental tão logo a infecção seja iniciada. Em pacientes com

primeira infecção, a resposta imune inata é de suma importância para o controle da parasitemia sanguínea para que respostas imunes posteriores como a adaptativa passa se iniciar (ARTAVANIS-TSAKONAS; RILEY, 2002; BACCARELLA *et al.*, 2004; COHEN *et al* 1961; DOOLAN *et al*, 2009; STEVENSON; RILEY, 2004).

Na fase eritrocítica a resposta do hospedeiro imune é mediada pela produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF α e IFN- γ , o que caracteriza um perfil de resposta Th1 (ARTAVANISTSAKONAS *et al.*, 2003).

Dentre as várias populações celulares que atuam no combate inicial a infecção malárica destacam-se: macrófagos, neutrófilos, linfócitos T CD4 e T CD8, células dendríticas, células Natural Killers (NK), dentre outras. A seguir abordaremos de forma sucinta o papel de cada uma delas (ARTAVANISTSAKONAS *et al.*, 2003).

Durante a resposta imune, a presença de produtos derivados de eritrócitos infectados estimula células mononucleares do sangue periférico a produzir TNF- α , IL-12 e IFN- γ que auxiliarão na ativação de células NK, macrófagos e células T que agirão com intuito de eliminar o parasito do sistema circulatório (ARTAVANISTSAKONAS *et al.*, 2003). Das células do sistema imune inato, as células NK se destacam por sintetizar grandes quantidades de IFN- γ que é considerado de grande importância no controle da parasitemia sanguínea, como demonstrado em infecções por *P. chabaudi* (MOHAN *et al*, 1997). Por outro lado, as células NK não possuem capacidade de sozinhas acabarem com os parasitos circulantes (STEVENSON; RILEY, 2004). Elas são ativadas pelas citocinas IL-12 e IL-18 que por sua vez são sintetizadas por células apresentadoras de antígenos, e seguindo o processo inflamatório vão, por sua vez, sintetizar IFN- γ citocina primordial para ativação de linfócitos e macrófagos (ARTAVANIS-TSAKONAS; RILEY, 2002).

Os macrófagos, assim como os monócitos e células dendríticas são células precursoras de células mieloides e possuem papel primordial na infecção e resposta imunológica de plasmódios. Os macrófagos têm origens diversas. Os teciduais, são originados no saco vitelino e fígado fetal, no estágio pré-natal, sendo programados de forma específica por fatores locais (VAROL, *et al* 2015), eles possuem nomenclaturas distinta como micróglia (cérebro), células de Kupffer (fígado) e macrófago alveolar (pulmão) (POLARD, 2009). Essas células são caracterizadas por possuírem vida longa e por se autorrenovam (MORALES-NEBREDA, *et al* 2015). Os macrófagos também se originam de monócitos circulantes recrutados do sangue para o tecido. Sendo assim, os macrófagos, teciduais ou recrutados, são singulares para a resposta

imunológica, desenvolvimento tecidual, homeostasia e/ou reparo do tecido. A quantidade de macrófagos presentes em cada tecido/órgão é balanceada entre macrófagos recrutados e teciduais (MORALES-NEBREDA, *et al* 2015). Este balanço é normalmente regido de forma multifatorial como por exemplo a presença de patógeno. Mas, não importando o seu *locus* original eles possuem capacidade plástica e podem apresentar fenótipos distintos em resposta a diferentes patógenos e citocinas presentes em seu microambiente. A capacidade dessas células de apresentarem diferentes fenótipos funcionais, em resposta a patógenos e de citocinas, culminou em uma descrição para auxiliar o estudo dos mesmos de dois subtipos: os classicamente ativados (M1), e os alternativamente ativados M2 (MANTOVANI *et al*, 2005).

Macrófagos M1 são induzidos por PAMPs, DAMPs e citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α . Eles têm a capacidade microbicida e tumoricida elevada, e sintetizam citocinas e mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 β , IL-6, TNF- α e óxido nítrico (MANTOVANI *et al*, 2005). Apesar de serem fundamentais para o sistema imunológico, principalmente frente a patógenos intracelulares, sua ativação de ser controlada. Os mediadores e citocinas pró-inflamatórias sintetizados pelos macrófagos M1 quando não refreados podem levar a danos teciduais e a patologias graves (SZEKANECZ, KOCH, 2007).

Na malária, a elevação de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos esplênicos é conhecidamente apresentada em conjunto a casos complicados da doença (GAZZINELLI *et al*, 2014). Por outro lado os macrófagos M2, foram subdivididos em M2a, M2b, M2c e M2d para poder contemplar todos os outros tipos de macrófagos que podem ser induzidos por mediadores distintos e com funções que os diferenciam (MARTINEZ, GORDON, 2014). Ainda assim ainda, as características plásticas dos macrófagos não são contempladas. Eles possuem funções variadas dependendo do sinal ou conjuntos de sinais que esta célula está processando no momento (MARTINEZ, GORDON, 2014).

Os neutrófilos são identificados por polimorfonucleares, originados da medula óssea a partir de progenitor mieloide e podem ser encontrados em grande quantidade no sangue (NÉMETH *et al*, 2020). Elas têm função de primeira linha de defesa do hospedeiro contra espécies que invadem tecidos. Quando na circulação sanguínea estão constantemente vigiando qualquer sinal de entrada de patógeno (LEY *et al*, 2018). Quando identificada infecção, os neutrófilos saem da circulação sanguínea e iniciam o processo migração celular para o tecido, desde o rolamento e ativação da selectinas e integrinas no endotélio até a entrada completa da célula no tecido. Apesar de já ser conhecida a heterogeneidade dos neutrófilos nas mais variadas

patogênicas, eles possuem três principais mecanismos de atividade antimicrobianas: fagocitose, degranulação e liberação das redes extracelulares de neutrófilos (NETs) (GIACALONE *et al.*, 2020).

Os linfócitos TCD8⁺ exercem função contra as formas exo-eritrocíticas dos parasitos (MALIK *et al.*, 1991). A resposta imunológica primordial desse tipo celular se baseia na síntese de TNF- α e IFN- γ . Além disso destroem os parasitos dos hepatócitos por meio da secreção de granzimas e perforinas oriundos do seu citoplasma celular, e por via de óxido nítrico capas de interromper o desenvolvimento do parasito dentro do hepatócito (MONTES DE OCA *et al.*, 2016; SEGUIN *et al.*, 1994). Os linfócitos TCD8⁺ são estimuladas nos linfonodos via IL-2 sintetizadas por células TCD4⁺ ativadas (AMANTE *et al.*, 2010).

Já foi demonstrado na literatura o papel fundamental das T CD4⁺ durante a proteção contra a infecção malárica (PINZON-CHARRY *et al.*, 2010; STANISIC; GOOD, 2015). Elas são ativadas por IL-12 produzidas por células dendríticas (AMANTE *et al.*, 2010), coordenam a resposta imunológica liberando citocinas e substâncias de lise celular em todas as fases do ciclo do parasito. Eles também são capazes de auxiliar os linfócitos B na resposta antigênica culminando na produção de anticorpos e são capazes de ativar linfócitos T CD8⁺ e macrófagos ao longo da resposta imune via IFN- γ . As células auxiliares T CD4⁺ somada a citocina pro-inflamatória IFN- γ controlam a parasitemia sanguínea, possibilitando um controle da infecção (AMANTE *et al.*, 2010). Por outro lado, a presença de células TCD4⁺, assim como as células TCD8⁺, possuem papel fundamental contra a malária complicada, uma vez que, aumenta o aparecimento de lesões tecidual. Também está relacionada a citoaderência. (AMANTE *et al.*, 2010; HERMSEN *et al.*, 1997).

Contudo, apesar das diversas populações celulares não serem são capazes de bloquear completamente o desenvolvimento parasitário durante a infecção malárica, seu funcionamento orquestrado é fundamental para controle inicial da infecção.

1.6 FISILOGIA PULMONAR

Uma das alterações clínicas decorrentes da infecção malárica ocorre no sistema respiratório. Este sistema, é composto pelo pulmão e suas estruturas internas, sendo responsável pela respiração, ou seja, entrada e saída de ar. Essa troca de gases, é fundamental para o funcionamento dos tecidos e órgãos do corpo, pois, por meio dela, são eliminados os dejetos

celulares, que são careados até o sistema respiratório. Essa função, é chamada de homeostase. Além da homeostase, o sistema respiratório também está envolvido em funções como fonação, olfato, termorregulação (perda de calor) e manutenção do equilíbrio acidobásico (DORMANS, 1996).

A captação de oxigênio e eliminação de dióxido de carbono, são funções do sistema respiratório. Este é, juntamente com o gradil costal e os músculos do tronco e abdômen, responsável pela ventilação pulmonar. Essa, permitirá que o ar contido no ambiente, consiga entrar por diferença de pressão para dentro dos pulmões, realizando assim, no final do trato respiratório a sua captação pelo sistema circulatório, permitindo o oxigênio ser difundido a nível celular. Para isso, esse sistema respiratório possui zonas ou porções condutoras, que permitem que o ar chegue até sua parte final (alvéolo pulmonar) e neste local, consiga entrar para o sistema circulatório. O local onde termina a zona condutora é chamado de zona troca ou respiratória, e é definido por se diferenciar em não somente conduzir o ar, dentro e fora dos pulmões, mas também realizar a troca entre oxigênio e dióxido de carbono, definido como hematose (DORMANS, 1996).

As zonas condutoras caracterizam-se como as estruturas responsáveis por levar ar para a parte interna e externa da zona respiratória, ocorrendo a troca gasosa o aquecimento, a umidificação e a filtragem do ar, para posteriormente chegar a região de troca gasosa, mais distal (CONSTANZO, 2014). As zonas condutoras dividem-se em dois brônquios, sendo um para cada lobo pulmonar, que se subdividem em brônquios menores, que irão posteriormente se dividir novamente. Ao todo, são 23 divisões nas vias aéreas que diminuem progressivamente. A vias são revestidas por células secretoras de muco e células ciliadas, que promovem a proteção do tecido impedindo a entrada, ou, diminuindo a entrada de partículas indesejadas (CONSTANZO, 2014). O processo respiratório é dividido em duas fases: a primeira, descrita como inspiração, traz para o interior dos pulmões o oxigênio enquanto, na segunda o dióxido de carbono é, então, expirado (CONSTANZO, 2014).

As paredes das vias condutoras são compostas por músculo liso, que possui inervação simpática e parassimpática. Os Neurônios simpáticos adrenérgicos ativam receptores β_2 na musculatura brônquica lisa que farão o relaxamento e dilatação das vias aéreas. Somado a esse fato, os receptores β_2 são ativados por epinefrina proveniente da circulação que recebida da medula suprarrenal e pelos agonistas β_2 adrenérgicos como o isoproterenol (DORMANS, 1996). Em antagonismo, os neurônios parassimpáticos colinérgicos ativam receptores

muscarínicos, que iniciam a contração e constrição das vias aéreas, causando resistência e complicações no processo de ventilação (DORMANS, 1996).

Ao final da zona de condução, está a zona respiratória, onde encontram-se os alvéolos e outras estruturas que participam das trocas gasosas com os bronquíolos respiratórios, os ductos alveolares e os sacos alveolares. Os bronquíolos são partes de transição, podendo ajudar ou fazer trocas gasosas pequenas ao longo do trajeto (CONSTANZO, 2014).

Apesar de características diferentes, a zona respiratória apresenta semelhanças com as vias aéreas proximais: ambas possuem cílios e musculatura lisa. Em contrapartida, são correlacionados como parte da região de trocas gasosas devido ao fato de brotarem ocasionalmente alvéolos de suas paredes, o que permite a realização da hematose durante o trajeto. A partir deles, surgem os ductos alveolares que se revestem de alvéolos, porém são ausentes de cílios e apresentam apenas pouca musculatura lisa (DORMANS, 1996; CONSTANZO, 2014). Eles se finalizam em sacos alveolares, que, por sua vez, também são revestidos por alvéolos (CONSTANZO, 2014).

Os alvéolos são protuberâncias que aparecem das paredes dos bronquíolos respiratórios, dos ductos alveolares e dos sacos alveolares. Em todo lobo pulmonar possui aproximadamente 300 milhões de alvéolos (DORMANS, 1996) com cerca de 200 µm de diâmetro/cada. A hematose entre os gases alveolares e o sangue do capilar pulmonar pode ocorrer facilmente pelos alvéolos devidos suas paredes delgadas margeando um grande perímetro que permite a difusão (CONSTANZO, 2014).

As paredes alveolares são envoltas por fibras elásticas e por células epiteliais, chamadas pneumócitos tipo I e tipo II. Os pneumócitos tipo II são os precursores do chamado surfactante pulmonar (substância indispensável na função de reduzir a tensão superficial dos alvéolos) e possui capacidade regenerativa para os pneumócitos tipo I e tipo II (CONSTANZO, 2014). O surfactante pulmonar é uma substância primordial na fisiologia pulmonar. Ele pode ser encontrado em todas as espécies que respiram através de pulmões. Na ausência do surfactante, o líquido presente entre o alvéolo e o ar apresenta uma tensão superficial alta, que força o colapso das estruturas pulmonares. O surfactante se interpõe às moléculas de água na superfície alveolar, diminuindo a tensão superficial, fazendo com que essa tensão se aproxima de zero no final da expiração momento em que a superfície do alvéolo está reduzida, evitando assim, a atelectasia ou colapso dos alvéolos pulmonares (FREDDI *et al*, 2013).

Os alvéolos possuem células com capacidade de fagocitar patógenos chamadas macrófagos alveolares. Os macrófagos alveolares mantêm os alvéolos sem a presença de ácaros, sujidades e restos celulares, uma vez que os alvéolos não contêm cílios para executar essa função. Estes macrófagos fagocitam as substâncias *ex vivo* e migram para os bronquíolos, onde os batimentos dos cílios os carregam para as vias aéreas superiores e faringe, onde podem ser engolidos ou expectorados (CONSTANZO, 2014).

As paredes alveolares são revestidas por capilares arteriais, advindos do sistema cardíaco direito; ele é expulso do ventrículo direito e carregado para os pulmões pela artéria pulmonar, se dividindo por toda zona respiratória (CONSTANZO, 2014). Assim como pode ser visto em outros órgãos, a regulação do fluxo sanguíneo pulmonar é feita pela alteração da resistência das arteríolas pulmonares. Diferenças na resistência arteriolar pulmonar são controladas por fatores locais, como por exemplo o O₂ (DORMANS, 1996).

A circulação brônquica é o abastecimento sanguíneo para as vias condutoras aéreas (não participantes das trocas gasosas) e é uma fração ínfima do fluxo sanguíneo pulmonar total (FREDDI *et al*, 2013).

Portanto, alterações na estrutura, condução, troca ou perfusão pulmonar alteram todos os outros sistemas dependentes, causando alterações sistêmicas. Devido ao funcionamento orquestrado do órgão captando oxigênio e mantendo a homeostase, alterações sistêmicas e alterações ventilatórias podem prejudicar as trocas gasosas, causando efeitos adversos aos sistemas corporais.

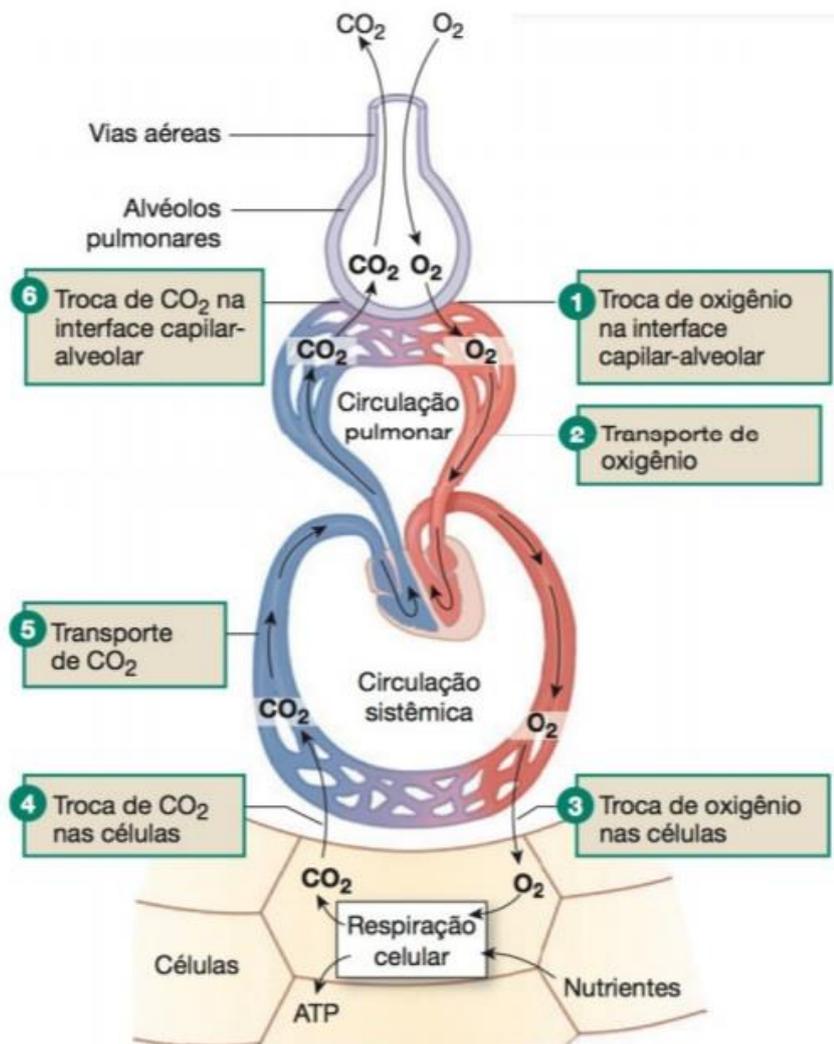


FIGURA 4: **Fisiologia Pulmonar.** Os sistemas respiratório e circulatório cooperam com a função de movimentar o O₂ e o CO₂ entre o ar e as células caracterizando assim a hematose. Adaptado de SILVERTHORN 2017.

1.7 TERAPIAS ADJUVANTES NA MALÁRIA GRAVE

Podemos chamar de terapia adjuvante todo tratamento que é feito de forma complementar a um tratamento usual e pré-estabelecido de uma doença (SILVA, 2009). As terapias adjuvantes são capazes de interagir em rotas biológicas específicas alteradas pela malária ou, em estágio final de processos induzidos pela doença (JOHN *et al*, 2010).

As terapias adjuvantes podem envolver quimioterapias, com o uso de probióticos e pré-bióticos como reguladores da microbiota residente (PIMENTEL, 2011), imunomoduladores (JOHN *et al*, 2010), transfusões de sangue (SABA, 2021) ou o uso de alimentos específicos (SAPIENZA, TATIT 2005).

Bienvenu *et al* 2008 estudou o efeito da eritropoietina considerando o efeito neuroprotetor. No estudo foi utilizado a eritropoietina como terapia adjuvante na fase aguda da malária cerebral para aumentar a taxa de sobrevivência. O tratamento adjuvante com eritropoietina é capaz de proporcionar um novo processo terapêutico para a malária cerebral, combinando a ação eficaz do antimalárico e uma substância neuroprotetora (BIENVENU *et al*, 2008). A eritropoietina demonstrou efeito na redução de lesão isquêmica do sistema nervoso central e do coração (CASALS-PASCUAL *et al*, 2008). A eritropoietina mostrou ainda a capacidade de manter íntegra a barreira hemato encefálica em estudo realizado *in vitro* utilizando de modelo de barreira hemato encefálica bovina (MARTÍNEZ-ESTRADA *et al*, 2013).

Corticosteroides são substâncias anti-inflamatórias capazes de proteger a barreira hemato encefálica, e diminuir a pressão intracraniana e a resposta inflamatória. Eles são considerados um dos primeiros agentes adjuvantes testados em estudos em malária grave. Porém, dois estudos que utilizavam dexametasona em diferentes doses em adultos no Sudeste Asiático (JOHN *et al*, 2010; MISHRA *et al*, 2009) e um estudo menor com crianças da Indonésia com malária cerebral (MISHRA *et al*, 2009) não mostraram diferença do processo de doença com o uso do corticóide. Em contrapartida, em um dos estudos, a dexametasona foi associada ao aparecimento e aumento de complicações e possíveis efeitos colaterais como sangramento gastrointestinal, sepse e coma, dificultando a recuperação do paciente (JOHN *et al*, 2010; MISHRA *et al*, 2009).

Quelantes de ferro como a deferoxamina foram eleitos como substâncias com potencial antimalárico devido sua ação de retenção de ferro, substância fundamental para as vias metabólicas do parasito (GORDEUK, LOYEVSKY, 2002). Ensaios com deferoxamina e quelante de ferro oral (Deferiprona) não apresentaram diminuição na mortalidade de crianças com malária cerebral (GORDEUK *et al* 1992), ou em adultos com malária grave (MOHANTY *et al*, 2002), porém, os estudos demonstraram um aumento de tempo de depuração do parasito foi menor no grupo de tratamento com quelante de ferro (JOHN *et al*, 2010). Resultados preliminares em crianças originárias de Zâmbia, com malária cerebral, demonstraram que o tratamento com a substância foi descrito com uma rápida diminuição da febre, das

convulsões e um tempo de coma reduzido (GORDEUK *et al* 1992), porém um estudo maior, randomizado não mostrou efeito sobre a mortalidade (MISHRA *et al*, 2009).

A albumina, por sua vez, parece melhorar o fluxo da microcirculação e reduzir a hipovolemia e, então, diminuir a acidose láctica. Em crianças com malária e com sinais de acidose metabólica, ensaios clínicos em fases de teste II demonstraram que o uso de albumina diminuiu a mortalidade em 4% em comparação com solução salina, especialmente em crianças em coma (JOHN *et al*, 2010). Outro estudo comparando a albumina e o colóide sintético Gelofusine também demonstrou uma vantagem no uso da albumina (AKECH *et al*, 2006).

A suplementação de vitamina D tem sido usada nos mais diversos estudos de doenças infecciosas e doenças autoimunes. Nesse contexto, Xiyue e colaboradores (2014) demonstraram que a administração oral de vitamina D melhorou os níveis séricos de calcifediol e diminuiu os níveis de citocinas inflamatórias circulantes (IFN- γ e TNF- α). A inibição das respostas Th1 somada à expressão reduzida de quimiocinas CXCL9 e CXCL10 e moléculas de adesão celular ICAM-1, VCAM-1 e CD36 resultaram na diminuição do acúmulo de células T CD8+ no cérebro e melhoraram a integridade da barreira hemato encefálica (XIYUE *et al*, 2014).

A transfusão sanguínea também tem sido descrita como um possível adjuvante no tratamento da malária grave. Em um estudo recente, a transfusão de sangue total resultou em substancial melhora da sobrevivência de camundongos com malária cerebral experimental em estágio avançado tratados com arteméter (SABA *et al*, 2021).

Nos últimos anos uma maior importância tem se dado aos ácidos graxos poli-insaturado da família do ômega 3, o EPA e DHA, uma vez que tem se demonstrado a atividade anti-inflamatória desses compostos. Os mecanismos de ação dos ácidos graxos poli-insaturados são considerados amplos, uma vez que, possuem a capacidade de balancear mecanismos inflamatórios das células. Essas substâncias podem modular propriedades de dinâmica de membrana, tal como, modulam a expressão de genes que atuam na produção de mediadores inflamatórios ativos (RODRÍGUEZ-CRUZ; SERNA, 2017). O DHA, por sua vez, está associado a redução no risco de diversas doenças, e até mesmo alguns tipos de tumores (SLAGSVOLD *et al.*, 2010).

O uso do ômega 3 tem demonstrado a capacidade de potencializar atividades quimioterápicas ou até mesmo reduzir os efeitos colaterais do uso de alguns medicamentos

(FREITAS; CAMPOS, 2019), devido suas propriedades antiproliferativas, pró-apoptóticas, anti-angiogênicas e anti-metastáticas, podendo ser utilizado como eficiente adjuvante em tratamentos quimioterápicos (MERENDINO *et al.*, 2013).

O uso do DHA já é descrito como de suma importância na manutenção da função neural, uma vez que é relacionado a saúde neurológica e a melhora na saúde do sistema nervoso central, principalmente durante o desenvolvimento embrionário (SUN *et al.*, 2018). É importante substância descrita na diminuição do risco de desenvolvimento da doença de Alzheimer (YASSINE *et al.*, 2017), assim como em doenças como depressão, bipolaridade, doença de Parkinson e Esclerose Amiotrófica Lateral (ZÁRATE *et al.*, 2017). Uma das moléculas sintetizada a partir do DHA, a neuroprotectina D-1, é capaz de agir na proteção do cérebro contra doenças neurodegenerativas e envelhecimento (ECHEVERRÍA *et al.*, 2017).

Nesse sentido, valendo-se de sua conhecida propriedade anti-inflamatória neste trabalho propomos utilizar o ômega 3 rico em DHA com composto adjuvante na profilaxia contra danos pulmonares induzidos pela infecção malárica experimental.

1.8 DHA- ÓLEO DE PEIXE

A sinergia das diferentes células imunes e a regulação de sua atividade são de importância crucial para a montagem de um sistema imunológico eficaz. Essa tarefa é, sempre, orquestrada por citocinas e quimiocinas, moléculas essas secretadas por células, incluindo, mas não restritas a células imunológicas, que, atraem células específicas para o local da infecção e regulam sua ativação ou supressão (SOKOL, LUSTER, 2015).

Muito se fala sobre a importância de uma alimentação saudável e equilibrada para o funcionamento do organismo em máxima homeostase, incluindo o sistema imunológico. Alguns fatores ofertados pela dieta têm propriedades imuno-reguladoras, como os macronutrientes ácidos graxos. O impacto dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) dietéticos no sistema imunológico tem sido investigado há décadas, com foco especial nos ácidos graxos ômega-3 α -linolênico (ALA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) (SOKOL, LUSTER, 2015).

O ALA é encontrado em nozes e sementes, enquanto EPA e DHA são os principais componentes do óleo de peixe (PASCHOAL, VINOLO et al, 2013). EPA e DHA também podem ser sintetizados a partir de ALA (CALDER, 2016), um processo que envolve várias etapas orquestradas por múltiplas elongases, dessaturases e β -oxidases (WIKTOROWSKA-OWCZAREK et al, 2015).

Os óleos de peixe contêm níveis elevados, mas variáveis, de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa ômega-3 (n-3 LC-PUFA), incluindo ácido eicosapentaenóico (EPA; 20:5n-3) e ácido docosahexaenóico (DHA; 22:6n-3), bem como pequenas quantidades de ácido docosapentaenóico (DPA; 22:5n-3). (BANG et al. 1971). Os óleos de peixe mais abundantemente produzidos e disponíveis globalmente são óleo de anchova (*Engraulis ringens*), óleo de capelim (*Mallotus villosus*), óleo de menhaden (*Brevoortia tyrannus*) e óleo de arenque (*Clupea harengus*), todos os quais contêm quantidades variáveis de n-3 LC PUFA, mas são caracterizados por maiores concentrações de EPA do que DHA (TURCHINI et al. 2009; SOKOL, LUSTER, 2015).

Comparado ao EPA, o DHA contém uma cadeia de carbono mais longa (22 vs 20) e uma ligação dupla adicional (6 vs 5) por molécula, que é considerada a razão para os diferentes efeitos metabólicos entre as duas moléculas. Por exemplo, foi relatado que o DHA tem uma influência maior na fluidez da membrana e, portanto, na atividade da proteína da membrana e dos canais iônicos (HASHIMOTO et al. 1999). Há também evidências crescentes para os diferentes papéis e ações dos metabólitos bioativos derivados de EPA e DHA, como eicosanóides, metabólitos de lipoxigenase e docosanóides (SERHAN, 2005). Além disso, foi demonstrado que o DHA e o EPA dietéticos têm um destino metabólico diferente em modelos animais, sendo o DHA preferencialmente retido sobre o EPA e o EPA sendo mais β -oxidado do que o DHA (GHASEMIFARD et al. 2015)

Os metabólitos derivados de ômega-3 têm importantes funções imuno-reguladoras. Esses metabólitos são geralmente conhecidos como mediadores pró-resolução e podem ser classificados em diferentes famílias – prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, maresinas, protectinas e resolvinas. Sua síntese é orquestrada por enzimas ciclooxigenase, lipoxigenase ou citocromo P450 (RODRIGUES et al 2016).

São descritos na literatura mecanismos da modulação do sistema imune pelo óleo de peixe, como a mudança da composição e função das membranas de células do sistema imunológico, mudança no padrão de eicosanóides produzidos, modificação no perfil de

citocinas, regulação da expressão gênica e da proliferação de linfócitos T (CALDER, 2016). Em experimentos com animais ou em experimentos com humanos, a suplementação com o ômega 3 é capaz de modificar o perfil de ácidos graxos na membrana das células, porém esse processo ocorre de forma dependente de tempo (YAQOOB *et al.*, 2000; FABER *et al.*, 2011) e de dose (REES *et al.*, 2006). Estas mudanças de composição da membrana mudam a produção de eicosanóides e a formação de “rafts” lipídicos. Os eicosanóides são mediadores lipídicos da inflamação que incluem prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX), leucotrienos (LT) e lipoxinas (LX) (CALDER, 2016; SOKOL, LUSTER, 2015).

Para a produção dos eicosanóides são utilizados os lipídios presentes nos fosfolipídios das membranas celulares envolvidas durante a inflamação. O ácido araquidônico é usualmente mais presente nas membranas celulares e por esse motivo é o mais utilizado para a síntese de eicosanóides, levando a produção de prostaglandinas e tromboxanos da série 2 e leucotrienos e lipoxinas da série 4 (CALDER, 2016). Uma vez em grades quantidades no organismo, os PUFAs n-3 competem com os outros ácidos graxos para a composição da membrana, e assim, são capazes de formar, a partir dos ácidos graxos EPA e DHA, prostaglandinas e tromboxanos da série 3 e leucotrienos e lipoxinas da série 5. Os eicosanóides produzidos a partir do EPA e DHA tem maior característica anti-inflamatória (TREBBLE *et al.*, 2003). Uma parcela disso se deve a diminuição do ácido araquidônico disponível, mas também se deve a uma ação direta do EPA reduzindo a atividade e expressão da enzima COX-2, responsável pela síntese de prostaglandinas após um estímulo inflamatório (BAGGA *et al.*, 2003).

O Óxido nítrico (NO) é considerado um mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas, podendo destruir patógenos e células tumorais. Sendo assim, macrófagos tratados com DHA e estimulados com LPS demonstraram diminuição na produção de NO, assim como uma diminuição na enzima iNOS. Essa ação se deve a interferência nas vias de sinalização intracelulares relacionadas com a regulação da iNOS (AMBROZOVA *et al.*, 2010). Khair-El-Din *et al.* (1996) demonstrou que o DHA reduz a produção de NO por macrófagos estimulados *in vitro* com IFN- γ e LPS. Por outro lado, De Lima *et al.* (2006) demonstraram que doses diminuídas de PUFAs n-6 e n-3 (DHA e o EPA) aumentaram a produção de NO em macrófagos estimulados com LPS, uma vez que, em altas doses reduzem a produção de NO nas mesmas células. Sendo assim, parece provável que óleo de peixe em doses maiores de DHA do que o EPA possa produzir diferentes benefícios à saúde.

Os estudos que demonstraram evidências da relação entre a ingestão de ácidos graxos poli-insaturados n-3 (PUFAs n-3, ou ômega-3) e inflamação pela primeira vez foram demonstradas nos estudos epidemiológicos obtidos por Kromann e Green, em 1980. Eles avaliaram durante 25 anos populações de esquimós do distrito de Upernavik, Groelândia e registraram uma baixa incidência de doenças autoimunes e inflamatórias, como psoríase, asma e diabetes tipo 1 nessa população, assim como a ausência de esclerose múltipla, quando comparada com a população da Dinamarca. A maior diferença encontrada na população de esquimós foi a alta ingestão de peixes ricos em PUFAs n-3 (SIMOPOULOS, 2002).

Pesquisas recentes têm demonstrado o potencial do DHA frente a doenças inflamatórias. O óleo de peixe rico em DHA teve efeitos significativos no tratamento de lúpus em estudo feito com modelo murino. Nesse estudo o DHA foi capaz de reduzir os níveis de anticorpos anti-dsDNA séricos, deposição de imunocomplexos nos rins e a proteinúria. Além disso, o óleo de peixe rico em DHA reduziu os níveis séricos de IL-18 e a clivagem dependente de caspase-1 de pró-IL-18 em IL-18 madura nos rins. Finalmente, o óleo de peixe rico em DHA suprimiu as ativações de fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K), proteína quinase B (Akt) e NF- κ B mediadas por lipopolissacarídeos (LPS) no rim, aumentando significativamente a sobrevivência desses animais (HALEDE *et al.*, 2010). Baseando-se nessas informações em 2018, o grupo de especialistas da Sociedade Europeia de Nutrição Clínica e Metabolismo (ESPEN) recomendou o uso de óleo de peixe rico em ômega-3 na nutrição enteral e parenteral, por seus benefícios clínicos gerais devido aos seus efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores (CALDER, *et al.* 2018) resultando em redução da taxa de infecção e do tempo de internação hospitalar em pacientes clínicos e cirúrgicos internados em UTI (CALDER, *et al.* 2018). Em conexão com essas observações, vários mediadores lipídicos pró-resolução sintetizados a partir de EPA e DHA já mostraram proteção e resolução de lesões pulmonares agudas na SARA (HAMILTON *et al.*, 2018). O ômega-3, na forma de óleo de peixe, principalmente rico em EPA e DHA, também tem sido utilizado como tratamento em vários ensaios clínicos em nutrição enteral e parenteral em pacientes com SARA no adulto (HAMILTON *et al.*, 2018). Cabe ressaltar que a nutrição enteral parece ser mais eficiente para a recuperação de pacientes com SARA. Adicionalmente esse estudo mostra os benefícios significativos obtidos em apenas alguns dias (28 dias) de tratamento na mortalidade (-36%), bem como na duração da ventilação e no tempo de permanência na UTI em pacientes que receberam suplementação enteral de ômega-3 (LANGLOIS *et al.* 2019).

Experimentos com animais também mostraram um impacto benéfico de dietas ricas em ômega-3 contra pneumonia aguda quando os animais foram expostos a infecções microbianas. Sharma *et al* utilizaram camundongos infectados por *Klebsiella pneumoniae* com dietas controle ou enriquecidas com ômega-3. Eles relataram que a suplementação dietética de ômega-3 pode exercer um efeito benéfico geral através da regulação positiva das defesas imunes específicas e inespecíficas do hospedeiro (SHARMA, *et al.* 2013).

Hinojosa *et al* usaram camundongos infectados por via intranasal com *Streptococcus pneumoniae*. A taxa de sobrevivência aumentou significativamente no grupo da dieta ômega-3 o que esteve positivamente correlacionado com redução da carga bacteriana. Em tecidos de animais alimentados com ômega-3, foi possível medir uma diminuição significativa nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (HIOJOSA *et al*, 2003).

Considerando todos esses resultados, a administração de ômega-3 parece uma estratégia razoável na SARA. Uma revisão recente sugeriu o uso sistemático de ômega-3 se nutrição enteral ou parenteral for indicada em pacientes com Covid-19 admitidos na UTI. O fator anti-inflamatório dos componentes do ômega 3 agiram de forma protetora contra a tempestade de citocina causada pelo vírus da COVID-19 ajudando a evitar a instalação da SARA nos pacientes (THIBAUT, *et al.* 2020).

1.9 A IMPORTÂNCIA DO USO DO MODELO MURINO NAS INFECÇÕES MALÁRICAS

O uso de modelo animal em estudos científicos é utilizado há centenas de anos pela comunidade científica mundialmente e a graças a eles, uma grande evolução científica aconteceu permitindo, de certa forma, a sobrevivência do ser humano. Os avanços em processos farmacológicos, vacinas e técnicas cirúrgicas, dentre outros, somente foram possíveis graças ao uso de animais experimentais (MEDANA *et al.*, 1997).

Modelos experimentais em animais vêm sendo utilizados devido às dificuldades de acompanhamento e avaliação das características patológicas nos indivíduos. Estes modelos se tornaram amplamente utilizados principalmente devido à facilidade de manuseio e observação e criação de camundongos em laboratório, além disso, o seu ciclo de vida pode ser mantido em

laboratório por meio de transmissão cíclica, permitem que se trabalhe com uma variação de linhagens, ciclos vitais curtos (gestação, amamentação e puberdade), padronização genética e do ambiente (MEDANA et al., 1997).

Em relação a malária, devido às dificuldades éticas em se estudar os processos patológicos relacionados a síndrome da malária grave, o uso de animais de experimentação se tornou de fundamental relevância. Dessa forma o uso de camundongos associado à sua infecção por espécies de plasmódios distintas, oferece a oportunidade de desvendar mecanismos imunológicos, histopatológicos e de sobrevivência envolvidos na doença, que só seriam possíveis em análises *post-mortem* (LAMB et al., 2006). No entanto, é importante ter ressalvas quando se relaciona o modelo animal à doença humana. A exacerbação dos resultados obtidos no modelo murino de malária grave para humanos deve ser feita com cautela, uma vez que apresentam diferenças significativas entre as espécies humana e murino.

O modelo murino é considerado o mais utilizado em pesquisas devido principalmente a suas similaridades com a malária cerebral em humanos, principalmente com relação à resposta imunológica e nos sinais e sintomas que dependem da interação entre a linhagem do camundongo e do tipo de plasmódio usado (HUNT, 2003). Os *Plasmodium* são divididos em dois grupos principais: o grupo *berghei*, composto por *Plasmodium berghei*, *P. yoelii* e *P. y. nigeriensis*, e o grupo *vinckei* contém *P. vinckei* e *P. chabaudi* (KILLICK, 1978). As especificidades entre as espécies de *Plasmodium* murino os tornam ideais no estudo da malária humana grave (MEDANA et al., 1997).

Em modelo murino, o leucócito é a células mais presente durante o sequestro na microcirculação cerebral de camundongos, e não os eritrócitos, como na malária grave humana (ADAMS et al., 2000; NEILL, HUNT, 1992). Por outro lado, a presença de monócitos no endotélio cerebral já foi visualizada na MC pediátrica (GRAU, KOSSODO, 1994).

Uma grande parcela dos estudos utiliza a infecção por *P. berghei* ANKA, que demonstra uma divisão segura entre linhagens de camundongos resistentes (BALB/c e A/J) e susceptíveis (C57Bl/6 e CBA) a malária grave. A susceptibilidade dos animais C57Bl/6 e CBA são derivadas da predisposição de resposta imunológica caracterizada pelo perfil Th1 que permite que os animais desenvolvam um quadro da doença similar a encontrado no ser humano. Já é descrito na literatura que camundongos susceptíveis e infectados com a cepa ANKA apresentam angústia respiratória com acidose láctica, anemia e nefrite, indicando que eles desenvolvem sinais e sintomas clínicos semelhantes à observada na malária causada pelo *P. falciparum* (VAN

DER HEYDE *et al.*, 2001). Elas também apresentam mudanças no perfil neurológicos e sintomas típicos da MC (coma, paralisia e crise epiléptica), assim como mudanças cerebrais microscópicas, como ativação de células endoteliais e micróglia, vistas em pacientes acometidos pela doença (MEDANA *et al.*, 1997). Por outro lado, as linhagens resistentes possuem diferentes manifestações clínicas ao plasmodium, podendo morrer por volta do 20º dia após a infecção apresentando um quadro de anemia grave originado por hiperparasitemia, e não apresentando sinais e sintomas de acometimento cerebral (KOSSODO, GRAU, 1993).

Parâmetros avaliados	BALB/c	CBA	C57BL/6
Início da morte	21 a 28 dias	7 a 14 dias pós-	6 a 10 dias
	pós-infecção	infecção	pós-infecção
Síndrome da angústia Nefrótica		*	*
Sequestro microvascular (eritrócitos parasitados)		*	*
Sequestro microvascular (Leucócitos)		*	*
Angústia Respiratória		*	*
Presença de Edema		*	*
Acidose Lática		*	*
Anemia	*	*	*
Coma		*	*
Ativação de células endoteliais		*	*
Paralisia ou Hemiplegia		*	*
Convulsão		*	*
Hiperparasitemia	*	*	*

Tabela 1 : Manifestações clínicas e histológicas da infecção por *P. berghei* ANKA nos principais modelos murinos: C57/BL/6, CBA e BALB/C.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar da queda no número de casos, a malária ainda é uma doença de difícil controle, principalmente em regiões subdesenvolvidas do globo. Por esse motivo, medidas que visam a prevenção da doença, o tratamento ou a diminuição de sequelas nos quadros graves são de suma importância.

Os atuais tratamentos antimaláricos utilizados em pacientes com malária grave têm o potencial de reverter o quadro clínico com a diminuição da parasitemia, mas não de reduzir a resposta inflamatória, o que poderia resultar em uma diminuição de danos teciduais, e, conseqüentemente, a ocorrência de sequelas (SALLERES *et al*, 2004). Um dos principais órgãos afetados pela adesão de eritrócitos na micro vasculatura são os pulmões, órgão vital do corpo humano. Nesse sentido, medidas que possam contribuir para a prevenção de quadros de falência e lesão pulmonar grave, ou que auxiliem no tratamento de síndromes relacionadas são necessárias.

Para o desenvolvimento de estudos relacionados a malária grave, o uso de animais como modelo experimental tem grande importância, visto que, o estudo em humanos é limitado apenas para análises *post-mortem*. Atualmente o modelo experimental para malária grave mais comumente aceito são as infecções por *Plasmodium berghei ANKA* em camundongos das linhagens CBA ou C57BL/6. Estes, apesar de apresentarem algumas diferenças no comparativo com os quadros clínicos humanos, apresentam semelhanças significativas em relação ao desenvolvimento da malária grave humana, como a inflamação tecidual, a adesão de eritrócitos no endotélio, déficits cognitivos, respiratórios e motores e rápido desenvolvimento do quadro clínico (VAN DER HEYDE *et al.*, 2001).

O DHA tem sido objeto de estudo em diversas comorbidades pulmonares, desde doenças autoimunes como fibrose cística, até doenças virais como a COVID 19, devido ao seu potencial anti-inflamatório. Nesse sentido, valendo-se do potencial anti-inflamatório do DHA, propomos com esse estudo avaliar o papel dessa macromolécula na infecção murina por *Plasmodium berghei ANKA*, em doses de 3,0 g/Kg e 6,0 g/Kg tendo-se como alvo as alterações pulmonares decorrentes da doença.

3 OBJETIVOS

3.0 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação alimentar com ômega 3 ricos em DHA, no desenvolvimento de lesões pulmonares em camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Avaliar o perfil clínico dos camundongos pré-tratados com óleo de peixe rico em DHA e infectados com *P. berghei* ANKA;

2- Avaliar o perfil parasitêmico e a taxa de sobrevivência dos camundongos pré-tratados com óleo de peixe rico em DHA e infectado com *P. berghei* ANKA;

3- Investigar a integridade da barreira pulmonar dos camundongos pré-tratados com óleo de peixe rico em DHA e infectado com *P. berghei* ANKA;

4- Investigar ocorrência de edema pulmonar dos camundongos pré-tratados com óleo de peixe rico em DHA e infectado com *P. berghei* ANKA;

5- Determinar *in situ* (homogenato de pulmão) os níveis) de citocinas pró e anti-inflamatórias dos camundongos pré-tratados com óleo de peixe rico em DHA e infectado com *P. berghei* ANKA;

6- Determinar o perfil fenotípico de distintas populações celulares (linfócito TCD4+, TCD8+, monócitos e neutrófilos) nos pulmões dos camundongos pré-tratados com óleo de peixe rico em DHA e infectado com *P. berghei* ANKA;

7- Verificar a ocorrência de alterações histopatológicas nos pulmões dos camundongos pré-tratados com óleo de peixe rico em DHA e infectado com *P. berghei* ANKA.

4 METODOLOGIA

4.0 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para esse estudo foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6, com idade entre 6 e 8 semanas, obtidos do centro de Biologia da reprodução pertencente a Universidade Federal de Juiz de Fora. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno em grupos de no máximo 5 animais por gaiola, com água filtrada e ração (Nuvital) *ad libitum*. As gaiolas foram mantidas durante todo o tempo em que os animais não estavam sendo manipulados em estantes ventiladas com temperatura e ciclo de luz controladas. O uso desses animais atendeu as recomendações da comissão de ética em experimentação animal (protocolo 06/2022)

Para que os objetivos específicos fossem alcançados determinou-se o seguinte desenho experimental:

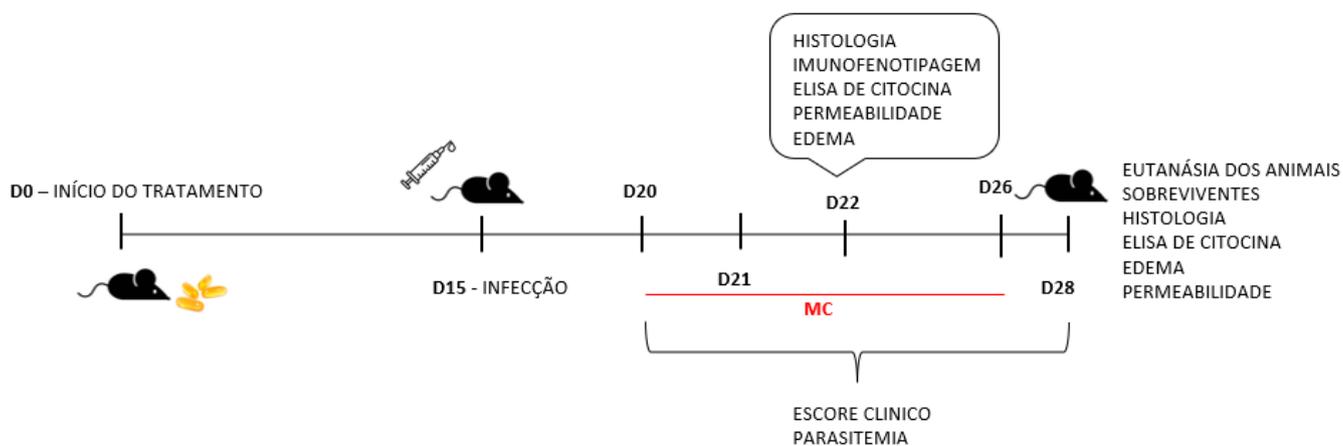


FIGURA 5: Delineamento experimental. Os animais foram tratados previamente 15 dias antes da infecção pelo *Plasmodium beghei* ANKA. Os dias críticos, relacionados ao desenvolvimento da malária grave, referem-se aos dias 20 a 26 (5º a 10º dia após infecção) onde os animais com escore ≤ 8 foram eutanasiados. Os animais sobreviventes foram eutanasiados todos no dia 28 (12º dia após infecção).

O tratamento com o óleo de peixe rico em DHA foi iniciado 15 dias (D0) antes da infecção experimental (D15) com *Pb.* ANKA sendo mantido até o dia 28, último dia do estudo.

A partir da infecção os animais foram avaliados diariamente quanto ao perfil clínico, parasitemia e taxa de sobrevivência até o final do seguimento.

Foram definidos 4 pontos de eutanásia conforme descrito a seguir:

D20: 5º dia após infecção com o objetivo de avaliarmos o perfil histopatológico (hemorragias, obstruções celulares e inflamação) dos pulmões.

D21: 6º dia após infecção com o objetivo de avaliarmos o perfil histopatológico dos pulmões.

D22: 7º dia após infecção, esse é um período crítico para o estabelecimento da MC. Nesse dia, parte dos animais foram eutanasiados para avaliação patológica, perfil celular, presença de edema e ocorrência de permeabilidade vascular e perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias nos pulmões.

D28: 12º dia após infecção, após o período crítico de desenvolvimento de MC, foram avaliados perfil patológico, e perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias nos pulmões.

Até o final do experimento dados de parasitemia e perfil clínico foram adquiridos.

Os grupos experimentais foram definidos como a seguir:

1. **Controle:** Animais tratados com água e sem infecção.
2. **Grupo infectado:** Animais tratados com água e infectados por *P. berghei* ANKA.
3. **Grupo tratado com 3,0 g/Kg:** Animais tratados com dose diária de 3g/Kg de DHA e infectados por *P. berghei* ANKA.
4. **Grupo tratado com 6,0 g/Kg:** Animais tratados com dose diária de 6g/Kg de DHA e infectados por *P. berghei* ANKA.

4.0.1 TRATAMENTO COM ÓLEO DE PEIXE RICO EM DHA

O tratamento dos animais foi realizado utilizando-se o óleo de peixe rico em DHA da marca Essential Nutrition (DHA 1000 mg – high concentration oh DHA OMRGA 3). As informações da tabela nutricional (ANEXO 1) foram utilizadas para obtenção de duas concentrações de DHA usadas neste estudo: 3 e 6 g/Kg. Para a realização do tratamento, o óleo contido nas cápsulas gelatinosas foi retirado e armazenado, apenas pelo tempo do ajuste de concentração, em um vidro âmbar. Cada animal recebeu diariamente, via gavagem, 200 µL do composto na concentração ajustada em água. O tratamento foi iniciado 15 dias antes da infecção com *Pb* ANKA permanecendo até o 10º dia decorridos da mesma.

Informações

Nutricionais

Porção de 3g

Composição	Quantidade por porção	%V.D.(*)	
Valor Energético	0,9 kcal= 3,7kj	1%	
Gorduras Totais	0,1g	6%	
Gorduras Saturadas	0g	*	
Gorduras Trans	0g	*	
Gorduras	0,01g	*	
Monoinsaturadas			
Gorduras	Poli-	0,06g	*
insaturadas			
EPA	0,01g	*	
DHA	0,05g	*	
Vitamina E	0,2mg	*	

Tabela 2: Informação nutricional do suplemento óleo superconcentrado em DHA na porção para os animais do grupo de 3g/Kg (Essential Nutrition).

4.1 INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *PBANKA*

Inicialmente, uma ampola contendo *Pb ANKA* criopreservado foi descongelada em temperatura ambiente. Após o descongelamento 200 microlitros do sangue infectado foram inoculados via intraperitoneal em 2 camundongos repique. Entre os 4 e 6 dias decorridos da infecção foram confeccionados esfregaços sanguíneos finos de ponta de cauda com o objetivo de determinar a parasitemia circulante. Nesse caso foi coletada uma gota de sangue que após estirada sobre a lâmina de microscopia e seca ao ar foi fixada com metanol. A seguir procedeu-se a coloração da mesma com Giemsa a 10% por 20 minutos. Então o esfregaço foi analisado em microscópio óptico (Olympus CX41) lente de aumento de 100X. Para a determinação de parasitemia foram contadas a quantidade total de hemácias parasitadas em um universo de mil hemácias. Quando a parasitemia alcançou a taxa de 4 a 8% os animais foram anestesiados com

NaCl 0,9%, 2% de xilazina e 10% de quetamina, via intraperitoneal (i.p), sendo o sangue coletado por punção cardíaca, utilizando seringa heparinizada.

O sangue coletado foi, então, diluído em tampão fosfato salino 1X (PBS 1x) e centrifugado a 300 g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido em 10 mL de PBS 1x e centrifugado novamente 300 g por 10 min. Na sequência, as hemácias foram contadas na câmara de Neubauer e, a partir da parasitemia obtida do esfregaço sanguíneo do animal repique, a concentração de hemácias parasitadas foi reajustada para 10^5 células/ 200 μ L. A infecção de cada animal foi realizada por via i.p. de acordo com os grupos experimentais definidos anteriormente.

4.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA, PARASITEMIA SANGUÍNEA E DETERMINAÇÃO DE CURVA DE SOBREVIVÊNCIA

No 4º dia após a realização da infecção experimental com PbA os parasitos sanguíneos começam a ser detectados no sangue circulante. A partir desse momento iniciou-se a avaliação clínica dos animais seguindo o protocolo descrito por Carrol e colaboradores (2010). Brevemente, esse protocolo é baseado em uma escala rápida de coma e comportamento murino (RMCBS – rapid murine coma and behaviour scale) onde a análise de parâmetros comportamentais e neurológicos de forma periódica, permite determinar o momento em que se estabelece o quadro grave de MC. Durante a aplicação do teste comportamental são observados 10 parâmetros que devem ser pontuados de 0 a 2, onde 0 significa total disfuncionalidade do parâmetro e 2 total proficiência do parâmetro. Ao todo são avaliados 10 parâmetros: marcha, equilíbrio, comportamento exploratório, força, fuga ao toque, posição do corpo, força dos membros, reflexo do pavilhão auricular, reflexo plantar, agressão e *grooming*. Conforme a pontuação do animal reduz, também deve ser reduzido o intervalo de tempo de avaliação: 20 pontos: avaliação a cada 24 horas; 19 a 16 pontos: 12 horas; 15 a 11 pontos: 4 horas; 10 a 6 pontos: 2 horas. Quando a pontuação referente a essa análise clínica alcança somatório menor ou igual a 8 o animal deve ser eutanasiado para evitar sofrimento.

Para acompanhamento da parasitemia, uma gota de sangue da veia caudal foi obtida diariamente e utilizada para a confecção de um esfregaço sanguíneo fino. Cada esfregaço foi fixado com metanol por 3 minutos e corados com Giemsa a 10% por 20 min. Após secagem, a

parasitemia sanguínea foi definida por meio da razão obtida entre o total de hemácias infectadas em um universo de 1000 hemácias. As parasitemias foram determinadas por meio de análise dos esfregaços em microscópio ótico (aumento de 100X). Durante a análise clínica dos animais, os óbitos foram anotados para determinação da taxa de sobrevivência.

4.3 EUTANÁSIA

Animais apresentando sinais clínicos compatíveis com malária cerebral e com escore abaixo de 8 foram imediatamente direcionados para eutanásia. Para tal, os mesmos foram anestesiados com solução anestésica (NaCl 0,9%, 2% de xilazina e 10% de quetamina), via i.p., seguindo-se exsanguinação por punção cardíaca para posterior obtenção de soro após centrifugação (300 g por 15 minutos). Após o sangue ser coletado, procedeu-se com a perfusão cardíaca que se baseia na aplicação de 40 mL de PBS 1X diretamente no coração do animal. A perfusão tem por finalidade retirar do vaso sanguíneo células (eritrócitos ou leucócitos) que não estejam aderidas ao mesmo.

Após perfusão, o pulmão do animal foi retirado da caixa torácica, lavado em PBS 1X e dividido ao meio. A metade direita foi armazenada em paraformolaldeído 4% e direcionada para a histologia, enquanto metade esquerda foi armazenada em soro fetal bovino em temperatura de -80 °C para posterior obtenção de homogenato para dosagem de citocinas *in situ*.

Os animais que sobreviveram ao período crítico de MC (D6 ao D11) foram eutanasiados no 12º dia após a infecção seguindo-se mesmo procedimento descrito acima.

4.4 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE CELULAR PULMONAR

A técnica de Azul de Evans foi utilizada nesse estudo como fator de medição de integridade celular, uma vez que o corante se liga a albumina sérica como veículo para circulação na corrente sanguínea não atravessando o endotélio vascular, exceto em condições de danos. Para tal, o animal foi anestesiado com uma combinação de NaCl 0,9%, 2% de xilazina

e 10% de quetamina, i.p., e isoflorano inalatório. Após anestesia, 200 µL do corante Azul de Evans a 2% (Sigma- Aldrich) foi injetado no plexo orbital de cada animal. Após 1 hora, os animais foram novamente anestesiados com solução de NaCl 0,9%, 2% de xilazina e 10% de quetamina, i.p., e eutanasiados com perfusão de 10 mL de PBS 1X.

A seguir, os pulmões foram retirados da caixa torácica, lavados em PBS 1X e, então, mergulhados em 2 mL de Formalina (Sigma-Aldrich) seguindo-se incubação do órgão por 48h a 37°C para eluição do corante extravasado para o tecido (STEELE e WILHELM, 1966). A determinação da absorbância referente ao corante extravasado foi feita por meio de espectrofotômetro a uma densidade de 620 nm. A seguir a absorbância foi normalizada de acordo com o peso dos órgãos do animal e calculada através equação $y=0,0013+0,0243$.

4.5 AVALIAÇÃO DO EDEMA PULMONAR

Para avaliação de ocorrência de edema pulmonar foi utilizado o protocolo descrito por Padua e colaboradores (2017). Brevemente, animais que demonstraram ou não sinais de malária grave foram anestesiados e eutanasiados por hipovolemia por punção cardíaca. Nesse caso não foi realizada perfusão com PBS 1X. Após retirada da caixa torácica, o órgão de cada animal foi lavado em PBS 1X, seco em papel toalha e, então, pesado e armazenamento em microtubo. A seguir, os tubos contendo os órgãos foram acondicionados com a tampa aberta em placa aquecedora por 48 horas a 60 °C, sendo novamente pesados. O edema foi determinado tomando-se para cálculo o peso inicial do órgão (úmido) dividido por peso final em 48h (peso seco).

4.6 EXTRAÇÃO DE CITOCINAS DO TECIDO PULMONAR

Após eutanásia do animal o lobo pulmonar esquerdo foi coletado e armazenado em soro fetal bovino inativado e mantido a -80 °C até o momento do uso. Para a extração do homogenato para posterior dosagem de citocinas, o tecido pulmonar foi macerado em solução para extração de citocinas (0,4 M NaCl, 0,05% Tween-20, 0,5% albumina de soro bovino, 0,1 mM de fluoreto

de fenilmetilsulfonila, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10mM de EDTA, 0,02% de aprotinina – para cada 100 mg de tecido usou-se 1000 µL de solução de extração) até total dissociação do tecido. Após esse processo a solução obtida foi centrifugada a 2000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi, então, aliquotado em volumes de 100 µL em microtubos e armazenados a -80 °C até o momento da realização do ensaio Elisa para detecção de citocinas.

4.7 ELISA DE CITOCINAS

A dosagem in loco de citocinas foi feita de acordo com recomendações do fabricante do kit de ELISA utilizado (BD). Foram sensibilizadas Placas de 96 poços com anticorpo de captura nas proporções: para dosagem de IL-10, TNF- α e IFN- γ utilizou-se diluição de 1:250 de anticorpo de captura. Os anticorpos de captura para IL-10 e TNF- α foram diluídos em tampão fosfato de sódio 0,2 M (0,087 M de Na₂HPO₄, 0,12 M de NaH₂PO₄, qsp 1 L, pH 6,5) enquanto os anticorpos de captura para IFN- γ foram diluídos em tampão carbonato de sódio 0,1 M (0,084 M de NaHCO₃, 0,018 M de Na₂CO₃, qsp 1 L, pH 9,5). Após a sensibilização, a placa de 96 poços foi incubada a 4 °C por 24 horas. Depois de incubadas elas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween 0,05% e o bloqueio de sítios inespecíficos foi feito adicionando-se a cada poço 200 µl de solução diluente (PBS 1x acrescido de soro fetal bovino). A diluição da curva padrão utilizada foi feita de forma seriada, partindo-se de 4000 pg/mL até o ponto mínimo de 31,25 pg/mL. As placas foram lavadas novamente e adicionou-se 50 µL de solução diluente contendo anticorpo de detecção na seguinte proporção: IL-10 1:250, TNF- α 1:500, IFN- γ 1:250 e foram incubadas a temperatura ambiente durante 1 hora. As placas foram, então, lavadas e foi adicionado a cada poço 50 µL de enzima avidina-peroxidase diluída em solução diluente e incubadas por 30 minutos. Foi feito novamente a lavagem das placas e adicionou-se 50 µL de substrato (TMB) por 15 minutos a temperatura ambiente. Após esse período a reação da enzima com o substrato foi interrompida utilizando 50 µL/poço de ácido sulfúrico a 2 N e foi lida em espectrofotômetro a 450 nm. A concentração de citocinas foi determinada a partir da equação de regressão linear, obtida pelos valores das absorbâncias referentes à curva padrão de cada citocina.

4.8 PROCESSAMENTO DO TECIDO PULMONAR PARA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Foram aplicadas as colorações de Hematoxilina-Eosina nas lâminas com cortes histológicos do tecido pulmonar para a análise das alterações teciduais. O processo de coloração foi feito com a imersão das lâminas em 3 banhos de xilol, de duração de 10 minutos (primeiro banho) e 5 minutos (segundo e terceiro banhos), para desparafinização. Depois, para hidratação dos tecidos, as lâminas foram imersas em banhos de 1-3 minutos cada, em solução de álcool absoluto, álcool 95%, álcool 80%, álcool 70%, e 5 minutos em água e mais 5 minutos em água destilada. Após esse processo as lâminas foram submersos em corante Hematoxilina (corante ácido) por 2 minutos, depois foi feita a lavagem em água corrente por 5 minutos. Após a lavagem foi realizada imersão em corante Eosina (corante básico), por 30 segundos a 2 minutos seguido de lavagem em água corrente por 1 minuto. Para finalizar, as lâminas foram imersas em quatro banhos de álcool (70%, 80%, 95% e 100%) por 1 minuto em cada tanque e depois em três banhos de Xilol por 2 minutos cada. A análise histológica foi realizada utilizando-se objetiva de 10x e 20x.

4.9 OBTENÇÃO DE CÉLULAS DO TECIDO PULMONAR

Para a determinação do perfil fenotípico das células pulmonares após eutanásia os camundongos foram perfundidos com 20 mL de PBS 1X. A seguir, foram retirados da caixa torácica, cortados em pequenos pedaços e incubados em 1 mL em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com penicilina (100 U/MmL) e estreptomicina (100 µg/mL) e liberase (ROCHE), na concentração de 128 µg/mL. Após 1 hora de incubação em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ 500 µL de RPMI contendo 5% de SFB e 0,01% de DNase gelado foram adicionados em cada amostra. Então o tecido pulmonar foi macerado contra uma rede de naylon (Cell strainer 70 µm - BD Biosciences®) com o auxílio de um embolo de seringa. A suspensão celular foi então, transferida para tubos de 15 mL e centrifugada por 10 minutos na rotação de 300g a 23 °C. O sobrenadante foi -descartado e o sedimento de células preparadas para citometria.

4.10 IMUNOFENOTIPAGEM DAS CÉLULAS OBTIDAS DO TECIDO PULMONAR

A determinação das populações celulares do tecido pulmonar de animais previamente tratados com óleo de peixe rico em DHA e infectados com Pb ANKA foi realizada por citometria de fluxo. As células do macerado pulmonar, obtidas e processadas como descrito nos itens anteriores foram transferidas para uma placa de 96 poços em fundo “V” e centrifugadas a 500 g por 10 minutos. Descartamos o sobrenadante e em seguida as células foram ressuspensas com 50 µl do marcador de viabilidade celular (LIVE/DEAD™ Fixable Violet Dead Cell Stain Kit, Invitrogen), diluído de acordo com as instruções do fabricante. A placa foi incubada, protegida da luz, a 4 °C por 30 minutos. Finalizada a incubação as células foram lavadas com 100 µl de PBS 1X contendo 5% de SFB e centrifugadas por 10 minutos a 500 g. Foi descartado o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 50 µl de tampão FACS (PBS 1X acrescido de 5% SFB) contendo cada um dos anticorpos de superfície (Tabela 1) seguindo-se incubação por 20-30 minutos a 4 °C protegido da luz. Depois as células foram fixadas e permeabilizadas utilizando o kit tampão de fixação e permeabilização (BD Biosciences) e, posteriormente, incubadas com o mix de anticorpos intracelulares (Tabela 1) diluídos no tampão de permeabilização (Perm/Wash) por 30-40 minutos a 4 °C protegido da luz. Finalizada a incubação, as células foram lavadas 2 vezes com 150-200 µl do tampão Perm/Wash. As amostras foram passadas em um citômetro de fluxo (CytoFlex ou FACS Canto II) e os dados analisados no programa FlowJo (TreeStar, Estados Unidos). As estratégias de análise serão demonstradas na Figura 8.

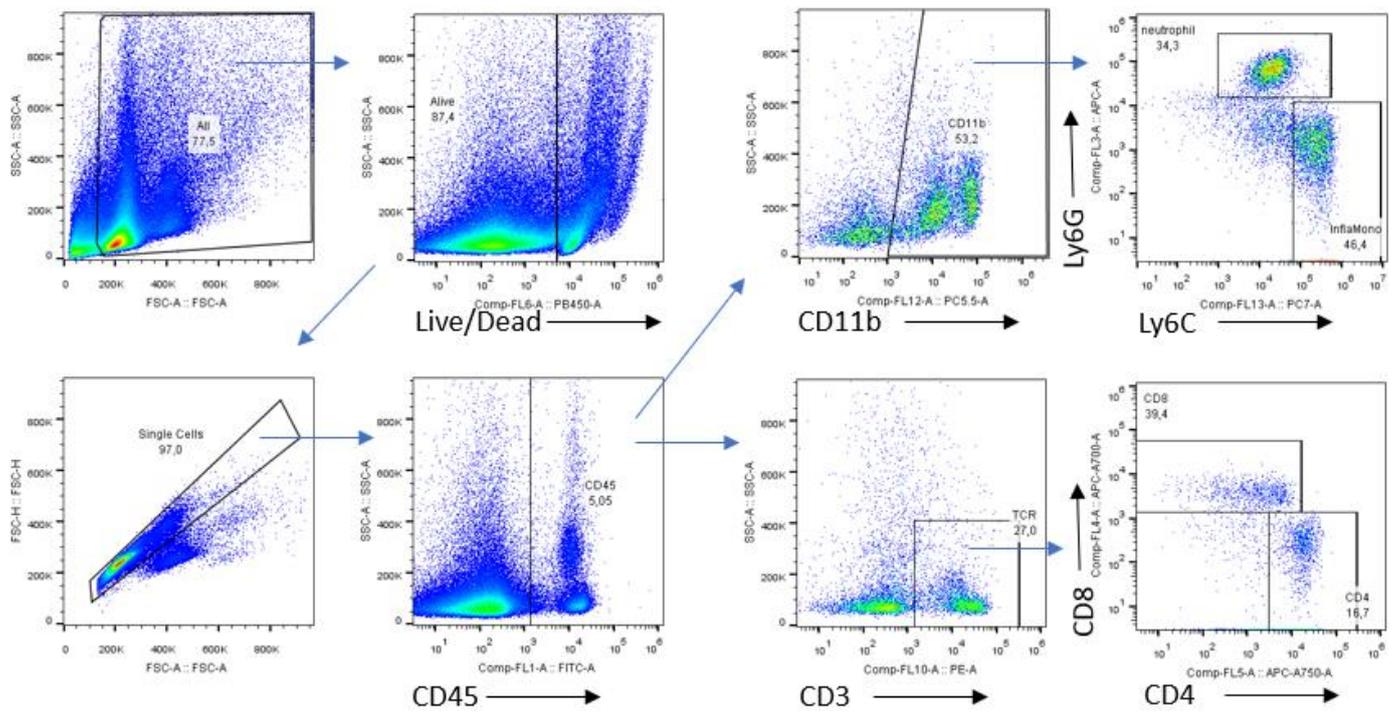


FIGURA 6: Estratégia de análise utilizada para fenotipagem das células pulmonares.

Localização	Diluição	Marcador	Canal/Fluorocromo	Clone	Marca
Superfície	0,3:100	SiglecF (CD170)	PE	1RNM44N	eBioscience
		CD11c	PercpCy 5.5	HL-3	BD
		I-A/I-E	BB 515	2G9	BD Horizon
		Ly6C	APC Cy7	AL-21	BD Pharmingen
		Ly6G	SB600	1 A8	eBioscience
		CD11b	Alexa Fluor 700	M1/70	BD Pharmingen
		CD206	Pe- Cy7	MR6F3	eBioscience
		CD45	FITC	30F11	BD Pharmingen
		F4/80	Texa Red	T45-2342	BD Horizon
		TCR	PE	H57-597	BD Pharmingen
		CD4	APC-H7	GK1.5	BD Pharmingen
		CD8	Alexa Fluor 700	53-6.7	BD Pharmingen
		FC Block	*	93	eBioscience
		Intracelular	1:100	CD68	eFluor 660
iNOS	APC-eFluor 780			CXNFT	eBioscience

Marcadores	Populações avaliadas
CD45	Leucócitos Totais
TCR	Linfócitos Totais
CD3+CD4	Linfócitos CD4
CD3+CD8	Linfócitos CD8
CD11	Células Mieloides
CD11b+LY6C ^{hi} +LY6G	Monócitos inflamatórios
CD11b+LY6C ^{INT} +LY6G	Neutrófilos
CD45+CD68+CD11c	Macrófagos/Células dendríticas
CD206	Receptor de manose

Tabela 3: Lista de anticorpos usados para marcação das células no tecido pulmonar.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism (versão 6.0). A estatística foi feita através de testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, em seguida foram feitos testes One-Way Anova, com pós teste de Tukey e Krustal-Wallis quando necessário para comparações múltiplas e teste T para comparações pareadas.

5 RESULTADOS

Óleo de peixe rico em DHA protege camundongos C57BL6 contra sintomas graves de malária aumentando sua sobrevivida

O presente estudo avaliou inicialmente o efeito do óleo de peixe com alta concentração de DHA na evolução da infecção malárica por *P. berghei* ANKA em camundongos C57BL/6.

Os resultados demonstraram que ao contrário do observado no grupo controle infectado (PbA), onde 100% dos animais evoluíram para o quadro de malária grave sendo eutanasiados entre o 6º e 8º dia após infecção, 70 e 79% daqueles que receberam 3 e 6 g/kg de DHA, respectivamente, sobreviveram ao período crítico da doença não apresentando qualquer sinal de doença grave (Figura 9, A e B). Esses animais apresentaram ao longo de toda a avaliação clínica funções motoras preservadas e bom estado geral sendo eutanasiados no 12º dia decorridos da infecção.

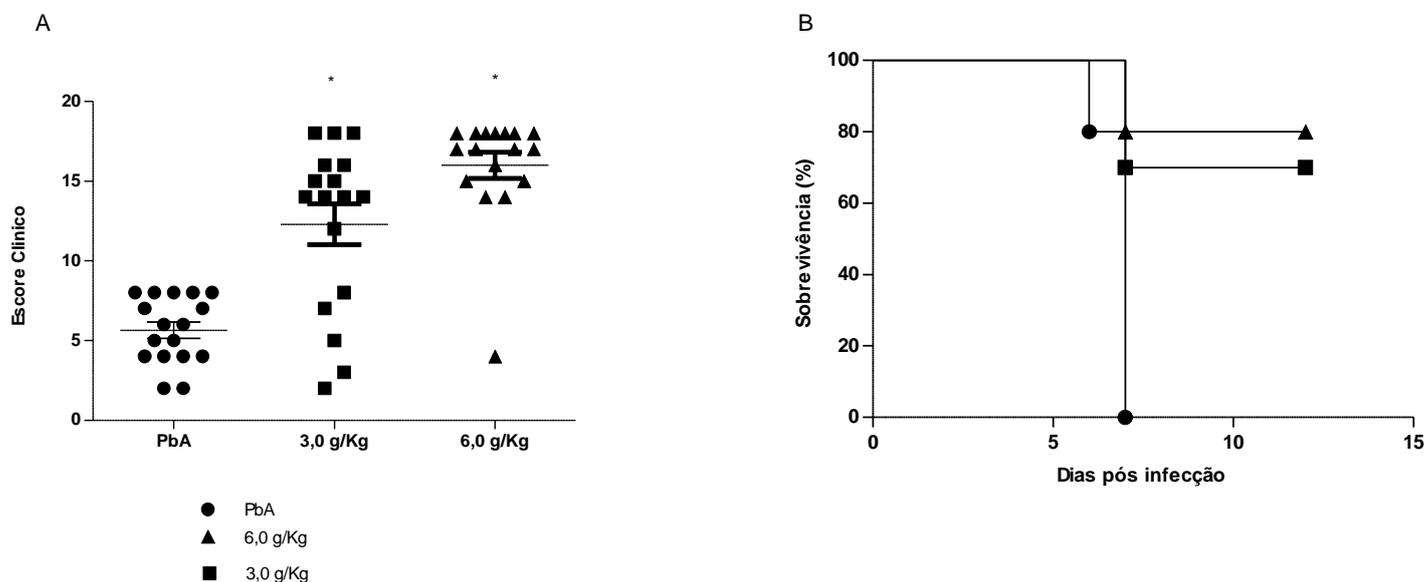


FIGURA 7: Perfil clínico de camundongos C57BL/6 pré-tratados ou não com ômega 3 rico em DHA e infectados com *Plasmodium berghei* ANKA. A: Representação do perfil clínico dos camundongos ao longo do estudo com um 17 animal em cada grupo experimental somando 3 experimentos; ANOVA $*p < 0,012$. B: Taxa de sobrevivência de 55 animais por grupo experimental dos 6 experimentos realizados; ANOVA $*p = 0,005$.

Óleo de peixe rico em DHA controla a parasitemia sanguínea e peso dos camundongos C57BL/6 nos primeiros dias de infecção

Para investigar o efeito do óleo de peixe com alta concentração de DHA na parasitemia sanguínea dos animais infectados, esfregaços estendidos foram confeccionados diariamente a partir de uma gota de sangue coletada da ponta de cauda. Os resultados demonstraram que nos primeiros dias da infecção (5^o ao 7^o dpi) os níveis de parasitos circulantes se mantiveram estatisticamente reduzidos nos animais tratados em relação ao que não receberam o óleo. Independentemente da dose utilizada esses níveis se mantiveram baixos até o momento da eutanásia (12^o dia) (Figura 10 A).

Interessantemente, durante o experimento notou-se que os animais não tratados e os animais tratados profilaticamente com óleo de peixe rico em DHA com 3,0 g/kg tiveram uma perda de peso significativa ($p < 0,0001$, $p = 0,0060$, respectivamente) após a infecção. Em contrapartida, os animais tratados com 6,0 g/kg do óleo mantiveram o peso após infecção (Figura 10 B).

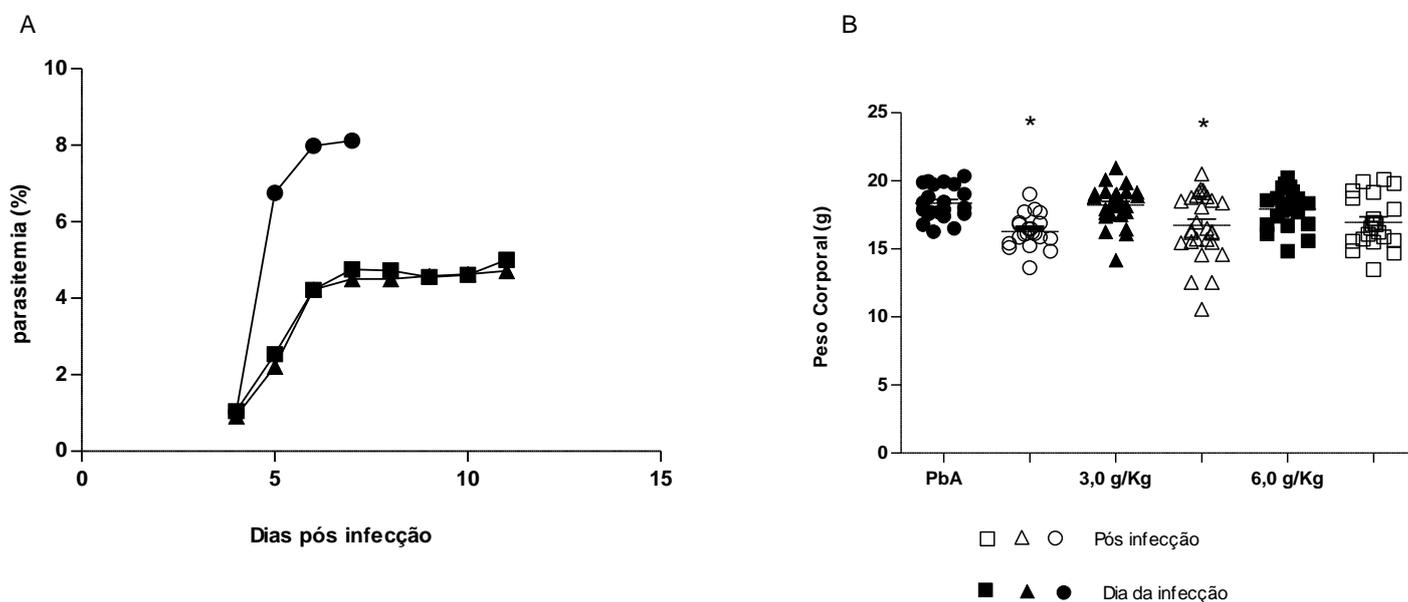


FIGURA 8: Perfil parasitêmico e análise de peso corporal de camundongos C57BL/6 pré-tratados ou não com ômega 3 rico em DHA e infectados com *Plasmodium berghei* ANKA. A: Frequência de parasitos circulantes de 21 animais em cada grupo experimental somando de 3 experimentos e; B: Peso corporal (g), observados em 35 animais de cada longo do estudo (teste t * $p < 0,000$, teste t * $p = 0,006$, respectivamente)

Óleo de peixe rico em DHA protege contra a permeabilidade vascular e edema pulmonar em camundongos C57BL/6

Visto que animais tratados com óleo de peixe rico em DHA foram protegidos contra sintomas neuronais graves da infecção causados por *P. berghei* ANKA o que refletiu na sobrevivência dos mesmos, nós investigamos, a seguir, o efeito do óleo a nível pulmonar. Especificamente foi investigada a ocorrência de permeabilidade vascular alveolar e de edema pulmonar em animais eutanasiados no 7º dpi.

Para a análise da permeabilidade vascular foi utilizada a técnica de azul de Evans. Nesse caso, o corante extravasado para o tecido é recuperado e avaliado quanto a sua concentração por meio da análise da densidade óptica. Os dados, ilustrados na Figura 11 A, demonstram que pulmões de animais tratados com óleo rico em DHA foram protegidos contra danos vasculares (Figura 11 A). Por outro lado, a maior concentração de azul de Evans observada nos pulmões de animais somente infectados alertam para a ocorrência dessa patologia. Não houve diferença entre a concentração de azul de Evans observada nos pulmões dos animais tratados e controle (Figura 11 A).

A ocorrência do edema pulmonar, por sua vez, foi determinada por meio da razão; peso úmido/peso seco do órgão. Corroborando o dado de permeabilidade pulmonar é possível verificar que essa razão entre animais controle (não infectados) e infectados tratados foi similar independentemente da dose de DHA. Por outro lado, animais infectados não tratados apresentaram razão de peso (úmido/seco) significativamente superior a observada nos outros grupos experimentais sugerindo, portanto, ocorrência de edema.

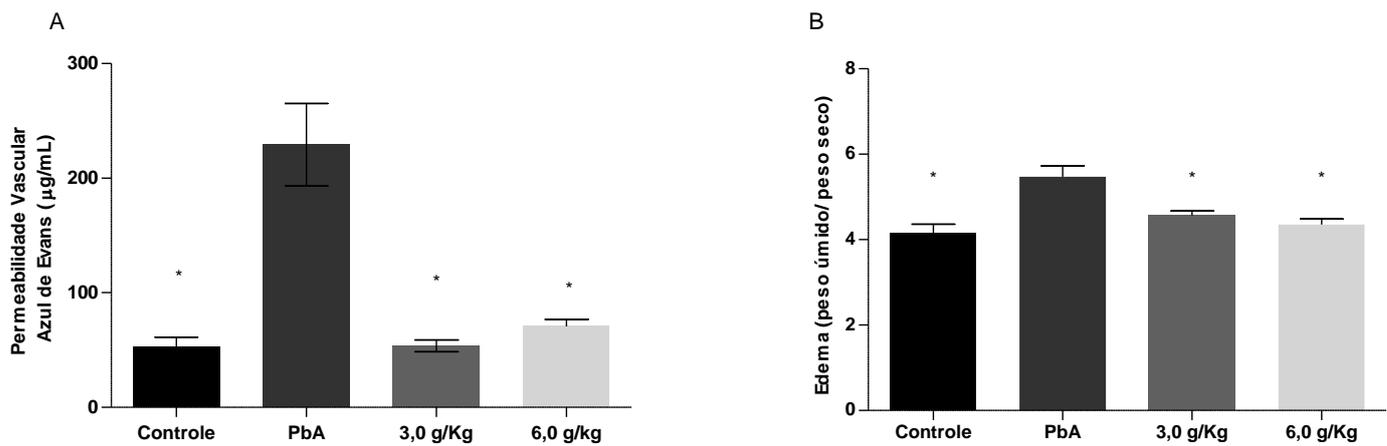


FIGURA 9: Alterações pulmonares em camundongos C57BL/6 pré-tratados ou não com ômega 3 rico em DHA e infectados com *Plasmodium berghei* ANKA. A: Permeabilidade vascular endotelial pulmonar realizada em 34 animais divididos entre os grupos experimentais (ANOVA * $p = 0,0004$). B: Edema pulmonar de 53 animais divididos entre os grupos experimentais (ANOVA * $p = 0,0002$)

Óleo de peixe rico em DHA reduz os níveis de citocinas pró-inflamatórias no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6

Considerando os estudos que sugerem o potencial anti-inflamatório do DHA avaliamos, a seguir, o perfil de citocinas pro- (IFN- γ e TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10) no tecido pulmonar dos animais pertencentes aos grupos experimentais; especificamente no 7º e 12º dia decorridos da infecção.

Conforme ilustrado, no 7º dia do estudo os níveis de IFN- γ e TNF- α estiveram significativamente aumentadas no grupo de animais infectados que não receberam DHA tanto em relação ao grupo não infectado quanto àqueles infectados, porém, tratados profilaticamente com o óleo contendo DHA (Figura 12 A e B). Animais tratados, os quais sobreviveram a infecção (12º dia do estudo), também mantiveram níveis reduzidos dessas citocinas.

Em relação a IL-6, avaliada somente no 12º dia do estudo, (Figura 12 C) nota-se que os níveis dessa citocina estiveram significativamente reduzidos nos pulmões dos animais tratados com DHA em relação aos animais somente infectados. Os níveis de IL-6 observados nos animais tratados, independentemente da dose, foram similares ao observado no grupo controle (não infectado).

Entre as citocinas com perfil anti-inflamatório, independentemente do momento da análise, IL-10 esteve significativamente aumentada nos grupos tratados com o ômega 3 rico em DHA quando comparado ao observado nos pulmões de animais infectados e sem tratamento prévio (Figura 12 D).

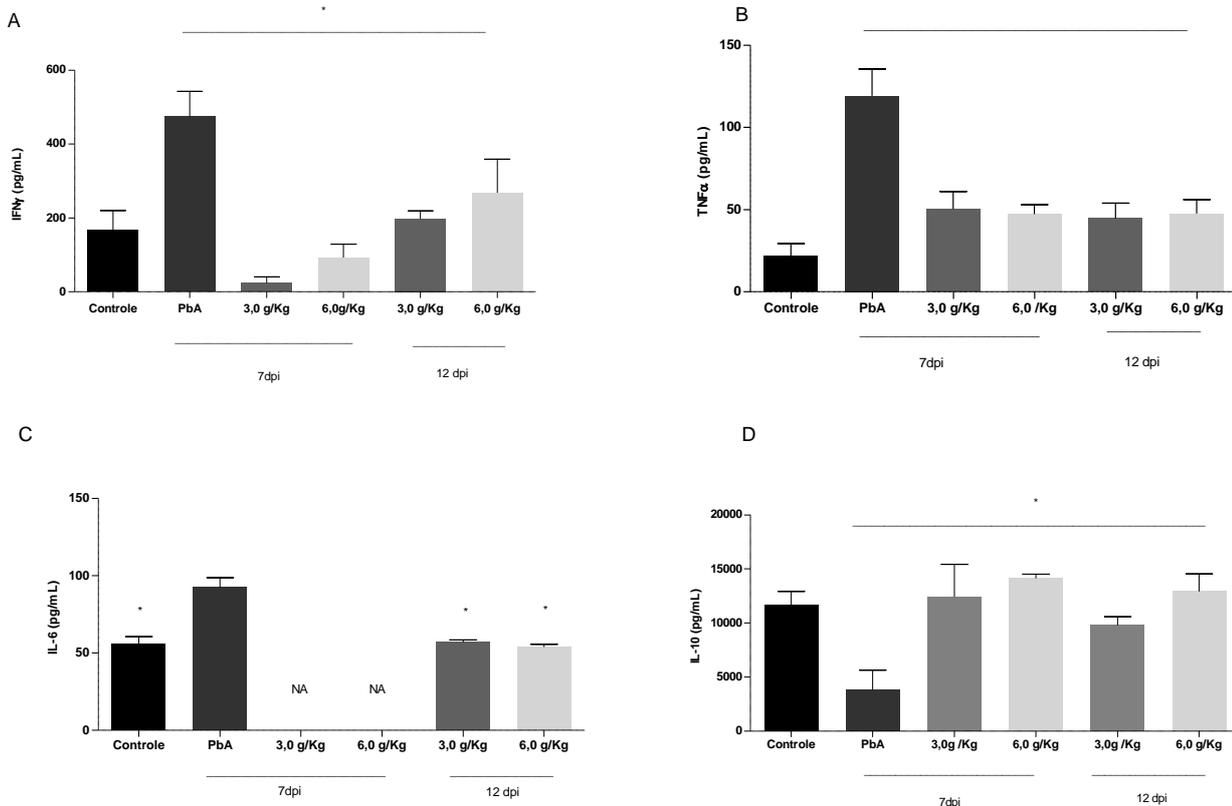


FIGURA 10: Níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias detectadas em homogenato de pulmão de camundongos C57BL/6 pré-tratados ou não com ômega 3 rico em DHA e infectados com *Plasmodium berghei* ANKA. Foi utilizado um número total de 22 animais divididos entre os grupos experimentais no 7º dia após a infecção e 15 animais divididos entre os grupos experimentais no 12º após a infecção A: IFN- γ (ANOVA * $p = 0,002$); B: TNF α (ANOVA * $p < 0,000$) C: IL-6 (ANOVA * $p = 0,003$) D: IL-10 (ANOVA * $p = 0,036$). Análises realizadas no 7º e 12º dias decorridos da infecção malárica experimental.

Óleo de peixe rico em DHA altera o perfil fenotípico das células do tecido pulmonar de camundongos C57BL/6

Considerando que os resultados provenientes de todas as análises realizadas até este ponto do estudo para os grupos tratados com 3,0 e 6,0 g/kg de DHA foram similares entre si e diante da eminente necessidade de uso cada vez mais reduzido de animais na experimentação, a análise *in situ* (no pulmão) das populações celulares de caráter mielóide e linfóide foi realizada com base no grupo tratado com a dose menor de DHA, ou seja, 3,0 g/kg.

Tratando-se das células linfóides observa-se que leucócitos (CD45⁺) e linfócitos T totais (TCR⁺) tiveram frequências elevadas, em relação as células CD45⁺, em pulmões de animais somente infectados. Por outro lado, frequências reduzidas dessas células foram observadas em animais tratados com 3,0 g/kg de DHA e em animais controles (não infectados) (Figura 13 D e 1E).

Os percentuais das subpopulações de linfócitos T, linfócitos T CD4 (CD3+CD4⁺) e T CD8 (CD3+CD8⁺), foram avaliados em relação a população de células CD45⁺ totais presentes no pulmão (Figura 13 F e 1G). Observa-se que o percentual de linfócitos T CD4 esteve significativamente reduzido nos pulmões dos animais somente infectados e naqueles tratados com DHA e infectados em relação ao observado nos pulmões de animais controles (Figura 13 F). Por outro lado, a frequência de linfócitos T CD8 esteve significativamente elevada nos animais somente infectados em relação aos controles e aqueles tratados com 3,0 g/kg de DHA (Figura 13 G)

Analisando-se a Figura 13 A é possível observar que pulmões provenientes de animais infectados que não receberam tratamento profilático com DHA apresentaram frequência significativamente maior de células expressando o marcador CD11b (marcador de células mielóides) em relação ao proveniente de animais controle e daqueles profilaticamente tratados antes da infecção. O mesmo pode ser observado em relação a população de monócitos inflamatórios (CD11b⁺Ly6C^{hi}Ly6G⁻) e neutrófilos (CD11b⁺Ly6C^{int}Ly6G⁺) (Figure 13 B e 13 C). Para essas populações, respectivamente, nota-se em animais infectados e não tratados com DHA frequência 11, 25 e 5 vezes maior em relação aos animais controle. Em relação aos animais pertencentes ao grupo tratado com 3,0 g/kg de DHA observa-se frequências 5, 3,3 e

2,7 vezes inferiores para células CD11b+, monócitos inflamatórios e neutrófilos, respectivamente.

Com exceção dos monócitos inflamatórios que estiveram em maior frequência em pulmões de animais tratados em relação aos controles não infectados, as taxas observadas para as demais populações celulares foram similares entre esses grupos (Figura 13 A, B e C).

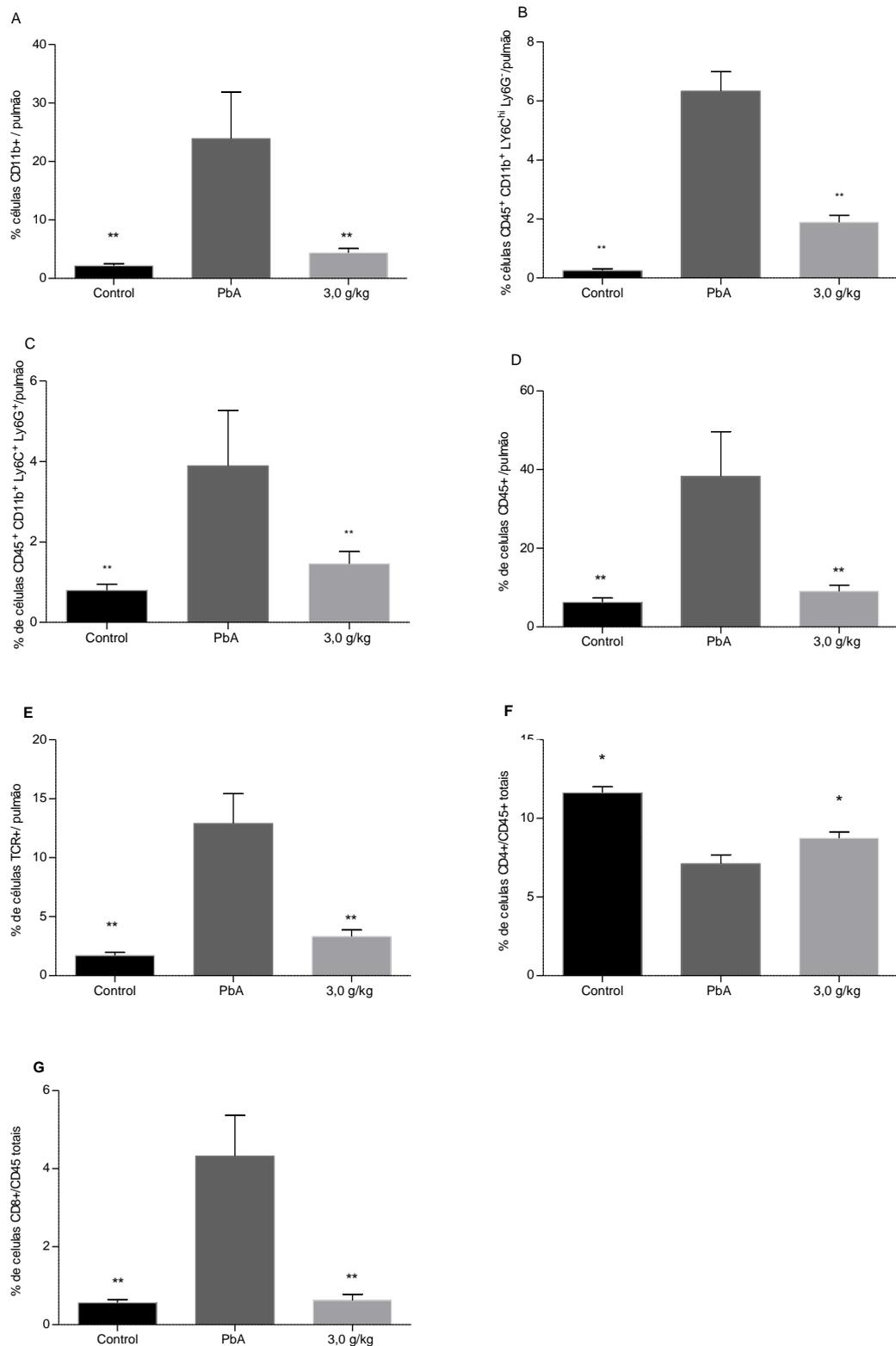


FIGURA 11: Perfil fenotípico de células extraídas do pulmão de camundongos C57BL/6 pré-tratados ou não com ômega 3 rico em DHA e infectados com *Plasmodium berghei* ANKA. Foi utilizado um número total de 17 animais divididos entre os grupos experimentais A: Células mieloides, $p = 0,003$. B: Monócitos inflamatórios, $p = 0,002$. C: Neutrófilos, $p = 0,015$. D:

Leucócitos totais, $p = 0,005$. E: Linfócitos Totais, $p = 0,002$. F: Taxa de LT CD4+ na população de leucócitos totais, $p = 0,002$. G: Taxa de LT CD8+ na população de leucócitos totais, $p = 0,007$.

Óleo de peixe rico em DHA altera a expressão de iNOS em macrófagos/células dendríticas provenientes do tecido pulmonar de camundongos C57BL/6

Considerando que iNOS e o CD206 são utilizados como marcadores de células com perfil pró e anti-inflamatório, respectivamente, nós investigamos a seguir a expressão deles em populações de células $CD45^+CD68^+CD11c^+$ (macrófagos/células dendríticas). Conforme ilustrado na Figura 14 A, a frequência de células provenientes dos pulmões expressando $CD68^+CD11c^+$ em relação a população total de leucócitos $CD45^+$ esteve significativamente elevada em animais tratados com DHA e infectados com PbA em relação aos controles não infectados e naqueles somente infectados. Interessantemente, porém, ao analisarmos a MIF para o marcador iNOS observamos que apesar da frequência da população $CD68^+CD11c^+$ ter estado aumentada no grupo de animais tratados com 3,0 g/kg de DHA, esse grupo apresentou a menor média de MIF em relação aos grupos controle e infectado somente (Figura 14B).

Em relação ao marcador CD206, as MIF foram similares entre todos os grupos avaliados (Figura 14C).

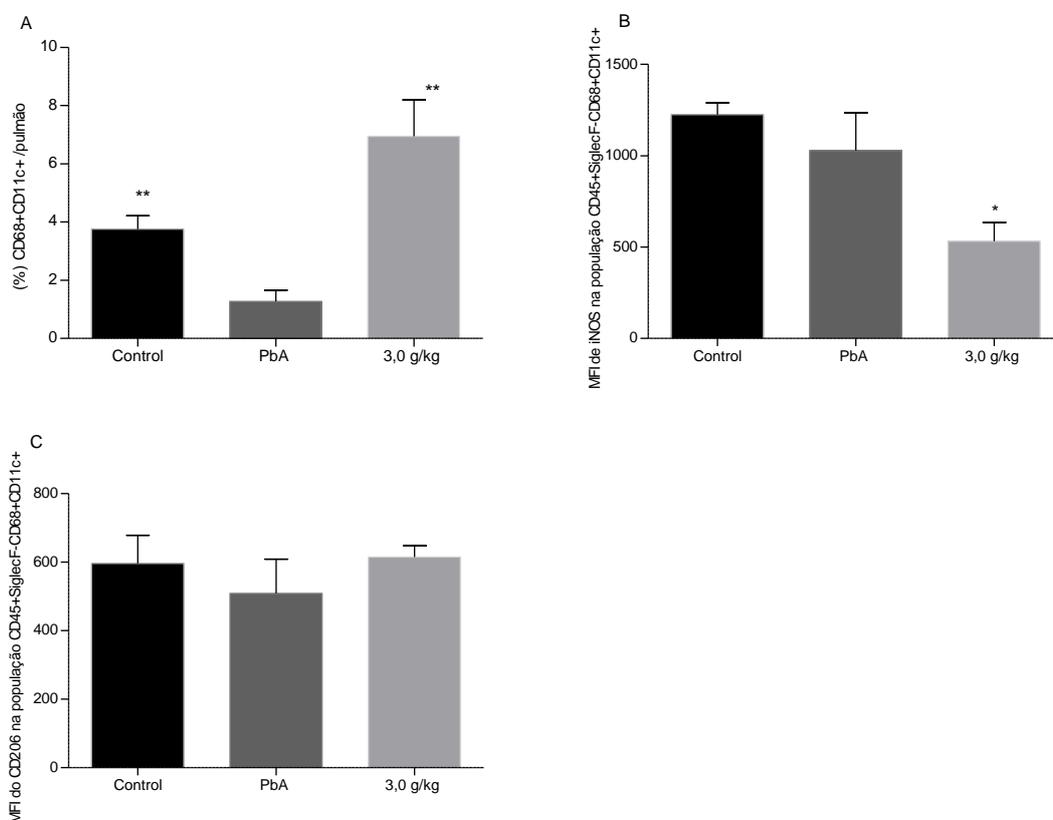


FIGURA 12: Perfil fenotípico de células extraídas do pulmão de camundongos C57BL/6 pré-tratados ou não com ômega 3 rico em DHA e infectados com *Plasmodium berghei*

ANKA. Foi utilizado um número total de 17 animais divididos entre os grupos experimentais. A: CD68+C11c, $p = 0,010$. B: MIF de INOS/ CD45+CD68+CD11c, $p = 0,001$. MIF do CD206/ CD45+CD68+CD11c+, $p >0,05$.

O óleo de peixe rico em DHA protege contra as alterações pulmonares a nível histológico

Considerando que as análises anteriores indicam que o tratamento com óleo de peixe rico em DHA é capaz de proteger as funções pulmonares contra as injúrias causada pela infecção malárica, nós investigamos se tal proteção estende-se a níveis teciduais. As análises foram realizadas nos dias 7, 12 e 20 após a infecção por PbA. Os dias 7-12 são considerados críticos para o desenvolvimento de malária grave.

Como ilustrado na Figura 15, em contraste do observado nos animais controles (não infectados-Figura 15 A) nos pulmões de animais infectados com PbA (Figura 15 B) e não tratados com o óleo de peixe, eutanasiados no dia 7 da infecção, ocorreu intenso extravasamento de transudado levando ao afastamento do vaso do alvéolo, caracterizando o edema pulmonar (ED e barra demonstrativa de afastamento de brônquio e vaso). Observa-se ainda presença de hemorragia vascular (Seta), assim como intensa hipertrofia da musculatura lisa (círculo) e contração brônquica (CB). Apesar de todos esses parâmetros estarem presentes nos pulmões de animais tratados com 3,0 g/Kg (Figura 15 C, E e G) e 6,0 g/Kg (Figura 15 D, F e H) de óleo de peixe rico em DHA, com exceção da hemorragia vascular que esteve ausente em todos os animais tratados, tais alterações foram significativamente menos intensas que aquelas observadas nos animais somente infectados.

Quando o influxo de células inflamatórias para o tecido pulmonar (*) e produção de muco (cabeça de seta) foram analisados não houve diferença entre os grupos tratados e não tratados (Figura 15 e Tabela 4).

Independentemente do grupo experimental (animais tratados com 3,0 g/Kg e 6,0 g/kg de DHA) e do parâmetro avaliado, as observações feitas no dia 7 podem ser extrapoladas para dia 12 e dia 20 (Tabela4).

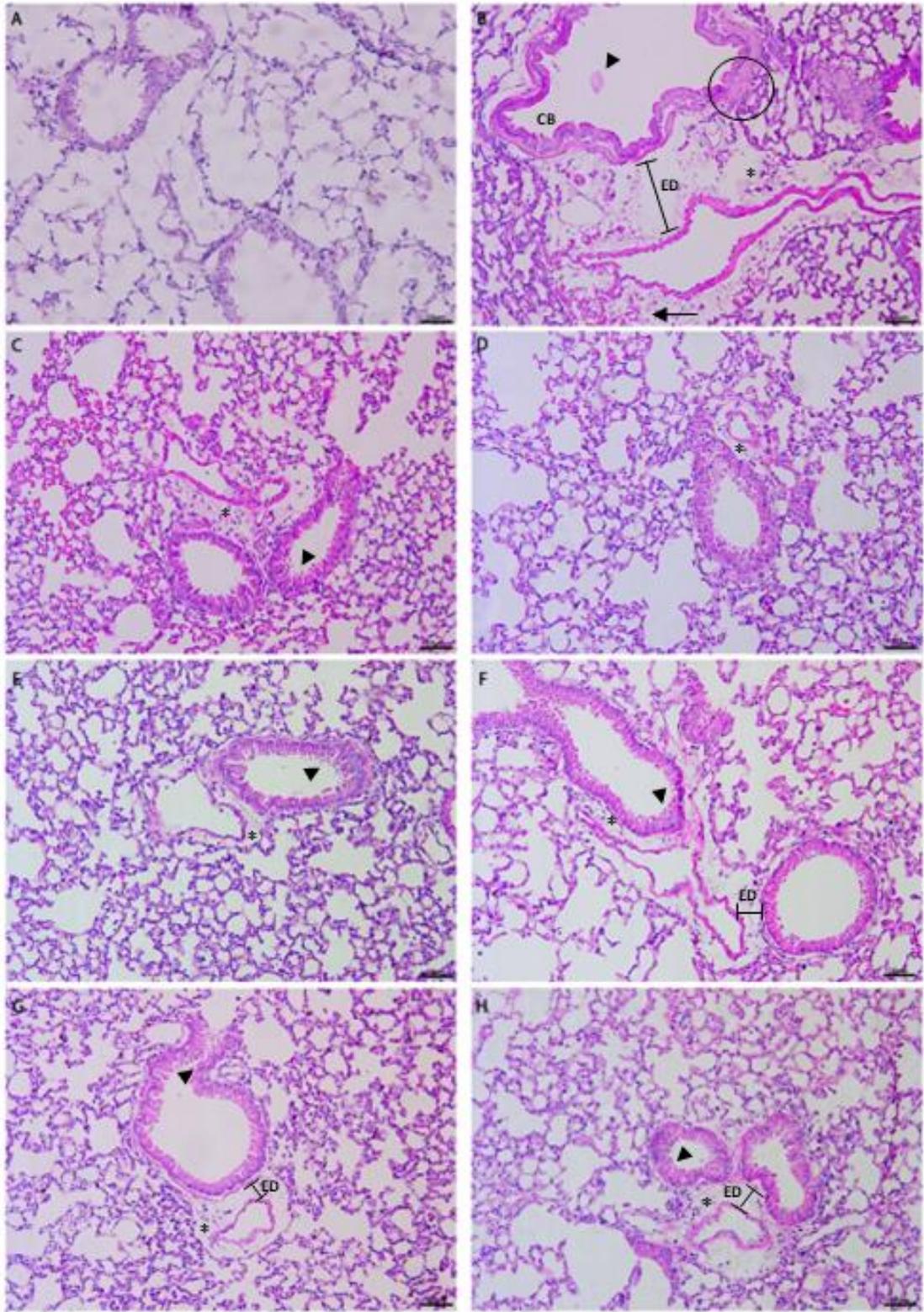


FIGURA 13: Histologia de tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 pré-tratados ou não com ômega 3 rico em DHA e infectados com *Plasmodium berghei* ANK. Foi utilizado um número total de 40 animais divididos entre os grupos experimentais. A : Pulmão dos animais controle; B pulmão dos animais somente infectados com PbA no 7º dia de infecção; C e D: Pulmão de animais tratados com 3,0 e 6,0 g/kg no 7º dia de infecção, respectivamente, E e F: Pulmão de animais tratados com 3,0 e 6,0 g/kg no

12º dia de infecção; G e H: Pulmão de animais tratados com 3,0 e 6,0 g/kg no 20º dia de infecção
Aumento de 10x.

Grupo	Dia de infecção	Edema perivascular	Hipertrofia do musculo liso	Hemorragia alveolar	Hemorragia vascular	Infiltrado vascular	Contração brônquica	Muco
PbA	7º	++++	++++	+++	++++	+++	+++ ++	+++
3,0 g/Kg	7º	+	++	+	—	++	++	+++
6,0 g/Kg	7º	+	+	—	—	++	++	+++
3,0 g/Kg	12º	+	+	+	—	++	++	+++
6,0 g/Kg	12º	+	++	+	—	++	++	++

Tabela 4: Avaliação dos parâmetros de patologia

As lâminas histológicas dos animais foram codificadas e submetidas por análise as cegas, onde foram observados os seguintes parâmetros: edema perivascular, hipertrofia do musculo liso, hemorragia alveolar, hemorragia vascular, infiltrado vascular, contração brônquica e muco. Cada parâmetro recebeu uma nota que correspondia a porcentagem de alterações patológicas encontradas. Na tabela, encontramos as médias de intensidade de acometimento de cada patologia pulmonar avaliada por grupo (PbA, 3,0 g/Kg, 6,0 g/Kg) e por dias de infecção (7º e 12º). Quando comparamos os grupos PbA e os grupos tratados, notamos que as estruturas fisiológicas pulmonares dos animais tratados foram preservadas, com exceção do muco e infiltrado celular, onde foram analisadas alterações compatíveis nos dois grupos. Essas alterações perduraram mesmo após saírem dos dias críticos da infecção.

6 DISCUSSÃO

O combate à malária mostra-se de grande importância visto que milhares de casos são registrados anualmente principalmente no continente africano. Há muitos anos investimentos são realizados para combater a transmissão da doença e diminuir os casos graves, e essas estratégias efetivamente foram capazes de diminuir com o passar do tempo a incidência da doença em muitas regiões do globo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Apesar dos esforços, os números de casos e mortes por malária no mundo estão longe de atingirem os patamares estabelecidos pela ONU e países associados pela erradicação da malária no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Com números que chegam a atingir de 5 a 20% dos casos de infecção por *Plasmodium falciparum*, as complicações pulmonares podem levar a hospitalizações e sequelas dos pacientes (SERCUNDES *et al.*, 2022). Portanto, a busca por adjuvantes capazes de impedir ou minimizar patologias pulmonares associadas a malária são de extrema importância. Nesse sentido, o uso de modelos experimentais, especialmente camundongos, tem sido de grande importância. Nesse sentido, o presente estudo objetivou avaliar o efeito da suplementação alimentar com ômega 3 rico em DHA, em doses de 3,0 g/Kg e 6,0 g/Kg no desenvolvimento de lesões pulmonares em camundongos C57BL/6 infectados com PbA. Para tal foram avaliados parâmetros como a sobrevivência, escore clínico, peso corporal, parasitemia, edema pulmonar, preservação da barreira capilar-alveolar, dosagem de citocinas *in locu*, alterações teciduais pulmonares e perfil celular pulmonar.

Nossos achados iniciais suportam os dados da literatura sobre a resistência e a suscetibilidade ao desenvolvimento de malária grave em camundongos C57BL/6. Nosso estudo confirmou que todos os animais C57BL/6 parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA e não tratados morrem entre os dias 6 e 7 após infecção, com sinais clínicos sugestivos de danos neurológicos e respiratórios. Nosso estudo mostra ainda que a suplementação alimentar dos animais com óleo de peixe rico em DHA é capaz de aumentar sua sobrevivência em relação à animais apenas infectados.

A malária grave possui altas taxas de mortalidade e morbidade nos pacientes acometidos, podendo gerar sequelas mesmo após o tratamento com antimaláricos tradicionais (HAINAULT *et al.*, 1993). O presente estudo comprovou que as elevadas taxas de sobrevivência

em animais tratados estiveram vinculadas a uma boa condição clínica ao longo de todo o estudo. Além disso, nenhum ganho de peso foi observado para o grupo de animais que receberam a suplementação com o óleo. Esse achado não é surpreendente visto que estudos com roedores demonstraram que ao acrescentarem os ácidos graxos ômega 3 na ração destes animais foi visto uma redução do acúmulo de gordura, mesmo em dietas com alto teor de lipídios (HAINAULT *et al.*, 1993; RUZICKOVA *et al.*, 2004). Estudos em humanos, analisaram os efeitos dos ácidos graxos ômega 3 na saúde cardiovascular, porém, até o momento, nenhum teve por objeto específico identificar aumento de peso corporal frente a suplementação (TODORIC *et al.*, 2006). Por outro lado, estudos que utilizam o ômega 3 como neuroprotetor contra o Alzheimer viram um progressivo aumento de peso corporal frente a suplementação, que pode ser correlacionado a melhora cognitiva dos pacientes e melhora na mecânica associada a alimentação (SANTOS, CARDOSO, 2019). Nos estudos de SanchezLara *et al.* (2014) e Aredes *et al.* (2019) também não foram demonstrados ganho significativo de peso em indivíduos que receberam o ácido graxo ômega 3 durante a dieta (SANCHEZLARA *et al.* 2014; AREDES *et al.*, 2019). A ausência de danos fisiológicos ao suplementar a alimentação dos animais não pode ser apenas medida pelo aumento ou redução de peso corporal. A mudança na massiva ingestão de ácidos graxos pelos animais pode causar mudanças na microbiota intestinal, para isso, mais testes ainda precisam ser feitos.

Em relação a parasitemia circulante, observou-se que os grupos suplementados com ômega 3 ricos em DHA em ambas as doses mantiveram níveis diminuídos quando comparados com os animais apenas infectados com PbA. Desde 1957, Godfrey demonstrou que alterações na dieta podem influenciar o desenvolvimento da malária em camundongos. A infecção por *Plasmodium berghei* foi suprimida nos camundongos, quando receberam uma dieta rica em óleo de fígado de bacalhau e naqueles que receberam vitamina “E” (GODFREY, 1997). Por outro lado, dieta suplementada com óleo de peixe, (menhaden, anchova ou salmão) porém, deficiente em vitamina E, também se mostrou capaz de reduzir a parasitemia sanguínea em animais infectados com *Plasmodium yoelii* (LEVANDER *et al.*, 1990). Nesse mesmo sentido, camundongos que tiveram alimentação suplementada com ácidos graxos saturados, EPA e DHA, fortificados com alfa-tocoferol foram capazes de controlar a parasitemia e apresentaram maior taxa de sobrevivência após serem experimentalmente infectados com *P. yoelii* (FUJIKAWA, *et al.* 1993).

Quando avaliamos a integridade da barreira hemato-alveolar em animais que não receberam suplementação com óleo de peixe rico em DHA, foi possível observar lesão

pulmonar aguda evidenciada pelo aumento na concentração de azul de Evans no tecido pulmonar no 7º dia após infecção com PbA, corroborando estudos prévios (LEGASSÉ *et al*, 2016). Entretanto, os animais do grupo tratado com o ômega 3 apresentaram barreira hemato-alveolar íntegra uma vez que apresentaram uma concentração significativamente menor de corante extravasado para o tecido. Nossos resultados mostraram também um aumento do peso do pulmão nos animais apenas infectados por PbA, o que ocorre devido a um aumento de líquido extravasado para o espaço virtual entre capilar e alvéolo caracterizando edema pulmonar. O edema, entretanto, se manteve próximo dos parâmetros de homeostase pulmonar nos animais tratados com óleo de peixe rico em DHA, em ambas as doses testadas. O aumento da permeabilidade vascular pulmonar e ocorrência de edema pulmonar são as principais características da patologia da malária grave no pulmão, e, segundo os dados apresentados, é possível inferir que ambas tem uma associação multifatorial podendo ser caracterizadas por acúmulo de líquido na região hemato-alveolar devido ao rompimento de vasos sanguíneos causados pelo sequestro de parasitos no endotélio e consequente isquemia capilar (OBERLI *et al*, 2016) ou ao aumento da infiltração de leucócitos polimorfonucleares, impulsionados por citocinas inflamatórias, principalmente TNF- α . Essa citocina, em especial, contribui para lesionar o interstício pulmonar e o endotélio vascular favorecendo a permeabilidade capilar e o extravasamento de líquido do espaço intra para o extravascular, com formação de edema (MAKNITIKUL *et al*, 2017). Observamos, portanto, uma eficiência nos mecanismos de prevenção da SARA uma vez que: há preservação da estrutura pulmonar conseguindo, portanto, manter íntegra a permeabilidade membranar, diminuição do líquido extrapulmonar no grupo tratado, mantendo a distância alvéolo capilar e assegurando uma melhor qualidade de difusão com hematose presente, além de reduzido processo inflamatório prevenindo, portanto, a lesão pulmonar grave. Sabe-se que na SARA, o edema com infiltrado intra e extra alveolar, dificulta a ventilação e a perfusão, gerando hipoxemia grave e, consequente, comprometimento sistêmico. O infiltrado pode comprometer o órgão e, em casos de um tratamento inespecífico ou ineficaz, o dano pode ser letal (SUKIRITI *et al*, 2014). Em várias ocasiões o diagnóstico de SARA é mal interpretado e até mesmo confundido com pneumonia viral, como já demonstrado em casos reportados de pacientes com baixas clínicas pulmonares graves devido a infecção com *P. falciparum*, na região da Arábia Saudita, onde foram inicialmente diagnosticados como uma infecção por MERS-CoV (ELZEIN, *et al*, 2017).

A geração de resposta inflamatória no tecido pulmonar necessita de modulação entre as citocinas pró inflamatórias e anti-inflamatórias (ANSTEY *et al*, 2002), valendo-se dessa

informação, a seguir investigamos os níveis de citocina pro- e anti-inflamatórias no tecido pulmonar de animais pré-tratados com ômega 3 e posteriormente infectados com PbA. Nossos resultados mostraram que a infecção com promoveu um aumento no perfil das citocinas inflamatórias TNF- α , IFN- γ e IL-6 nos camundongos infectados com PbA, enquanto que os animais tratados com ômega 3 rico em DHA apresentaram perfil diminuído dessas citocinas (tanto no dia 7^o quanto no 12^o dia da infecção).

Ao analisarmos o perfil de IL-10, citocina imunorreguladora (SHANLEY *et al*, 2000), observamos aumento de seus níveis no 7^o dia após a infecção, o qual persistiu até o 12^o dia em camundongos C57BL/6 parasitados e tratados. Em contraste, níveis reduzidos dessa citocina foram observados no tecido pulmonar de animais C57BL/6 apenas infectados. A gravidade na infecção por *P. falciparum* e *P. vivax* está descrito devido, principalmente, à síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IFN γ e IL-6 (GONÇALVES *et al*, 2012). Em estudos que utilizaram modelo murino de infecção por *P. berghei*, *P. yoelii* ou *P. chabaudi* foi possível inferir as mesmas funções dessas citocinas no desenvolvimento da malária (STEVENSON, RILEY, 1997). Essas citocinas são descritas como produtoras do aumento da expressão de moléculas de adesão, como E-selectina e ICAM-1 nas células endoteliais e, conseqüentemente, a citoaderência da hemácia parasitado e leucócitos ao endotélio vascular. Ao longo da malária cerebral, Rudin e colaboradores já descreveram a importância do TNF- α no desenvolvimento da doença, uma vez que, camundongos knockout para o receptor TNF- α e TNF- β mostraram completa resistência ao desenvolvimento de complicações cerebrais, após a infecção com PbA (RUDIN *et al*, 1997). Somado a isso, embora o TNF- α esteja relacionada com eliminação do patógeno, um desequilíbrio em seus níveis pode causar disfunção endotelial significativa e piorar a citoaderência de eritrócitos parasitados na microvasculatura (CUNNINGTON *et al*, 2013). No contexto pulmonar, citocinas IL-6, TNF- α e IFN- γ e quimiocinas estão envolvidas no desenvolvimento da SARA induzida durante a malária grave experimental (FRANKE-FAYARD *et al* 2004) assim como na SARA originada de quadros infecciosos sistêmicos ou locais (MONTEIRO *et al*, 2014).

O papel regulador da citocina IL-10 durante o desenvolvimento da malária grave na infecção por PbA já descrita por Schmidt e colaboradores, 2018 (SCHIMIDT *et al*, 2018). Nesse estudo foi visualizada a diminuição da expressão de mRNA de IL-10 no baço e no cérebro (TOEWNS, 2001), juntamente a elevação na citoaderência nesses tecidos (KUMAR, ENGWERDA, 2019).

Considerando o perfil anti-inflamatório observado no tecido pulmonar, investigamos a seguir o perfil fenotípico de células recrutadas para o pulmão durante a infecção em animais tratados ou não com óleo de peixe. Ao longo do processo inflamatório, os monócitos são células fundamentais recrutadas para o tecido onde irão responder aos estímulos, se diferenciar e sintetizar mais mediadores importantes para a doença e/ou controle da infecção (ANSTEY *et al*, 2002). Durante várias patologias, os monócitos desempenham funções essenciais para o controle da doença. O processo patológico da malária pulmonar grave ainda vem sendo esclarecido, mas já se sabe que grande parte dos leucócitos infiltrantes são células mononucleadas que causam disfunção durante a troca de gases devido a seu acúmulo no tecido (ANSTEY *et al*, 2002). Por outro lado, os monócitos são essenciais durante a malária onde é célula fagocitária, apresentadora de antígeno e produtora de citocinas (DOBBS *et al*, 2020).

No tecido, encontramos aumento no percentual de células mielóides, assim como monócitos inflamatórios em animais apenas infectados quando comparados com os animais tratados com 3,0 g/Kg que, apesar de aumentados se comparados com o grupo controle, ainda estiveram reduzidas quando comparadas com o grupo PbA. Como supracitado, a citoaderência nas superfícies endoteliais resultam em lesões pulmonares agudas e no imediato recrutamento de monócitos da corrente sanguínea. Os monócitos recrutados permanecem nos pulmões como macrófagos oriundos de monócitos e são importantes na destruição de hemácias aderidas infectados com *Plasmodium* por meio de fagocitose (LAGASSÉ *et al*, 2016).

Nossos dados revelaram também uma diminuição significativa de neutrófilos no tecido pulmonar dos animais tratados com 3,0 g/Kg de óleo de peixe rico em DHA quando comparados com os animais PbA. Já é amplamente esclarecida a importância do recrutamento de neutrófilos para o tecido durante a eliminação de diversos patógenos. Eles são as primeiras células imunológicas a chegar no sítio de infecção e participam no processo de fagocitose e eliminação de patógenos utilizando mecanismos dependentes de espécies reativas de oxigênio (ROS) e mecanismos independentes de oxigênio (ERUSLANOV *et al*, 2005). Na infecção por *Plasmodium spp.*, o recrutamento de neutrófilos é fundamental para a depuração do parasito no baço (SENGUPRA *et al*, 2019). Somado a isso, alguns trabalhos têm feito correlações com a presença dessas células com a injúria pulmonar (SERCULES *et al*, 2019), lesão hepática (ROCHA *et al*, 2015) e complicações cerebrais (PORCHERIE *et al*, 2011). Vandermosten e colaboradores fizeram um estudo com várias espécies de plasmódios em conjunto com uso de diferentes linhagens de camundongos. Os camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* NK65 apresentaram um aumento no número total de neutrófilos no BAL (aspirado bronco-

alveolar) 9 dias após a infecção. Por outro lado, a infecção com PbA em camundongos DBA/2 não apresentou elevação de neutrófilos no BAL até o 19º dia após a infecção. A infecção com PbA em camundongos BALB/c não levaram a mudanças no infiltrado de neutrófilo até 15º após a infecção (VENDERMOSTEN, 2018).

Em humanos, EPA e DHA parecem aumentar a ativação de neutrófilos com aumento da geração de radicais superóxidos em resposta a infecção por *P. falciparum* (KUMARATILAKE *et al*, 1997). Em pacientes com malária *falciparum* concentrações mais baixas de peróxidos lipídicos e óxido nítrico permitem que uma infecção persista, enquanto níveis parecem indicar uma tentativa de superar a infecção (ARUAN KAMAR, DAS 1999).

Nossos dados de fenotipagem *in situ* mostram uma diminuição de linfócitos totais nos animais dos grupos previamente tratados em relação aos grupos apenas infectados. As células T possuem um papel fundamental no desenvolvimento da resposta imune (MORENO-PÉREZ *et al* 2013), sendo assim, foram comparadas as porções CD4 e CD8 dos linfócitos totais. Os linfócitos CD4 estiveram diminuídos nos grupos tratado e nos grupos apenas infectados quando comparados com o grupo controle. Esse fato chama a atenção, quando isolado, devido à proximidade do resultado, porém, apesar de amplamente recrutado nos grupos tratados com óleo de peixe rico em DHA, quando confrontado com os outros resultados gerados pelo presente trabalho é possível inferir uma característica reguladora para essas células uma vez que já foi demonstrado anteriormente a característica reguladora de il-10 durante a malária (LEORATTI *et al*, 2012; MCCALL *et al* 2007) e que células dendríticas plasmocitóides estimuladas por CpG ODN via TLR9 causam uma diferenciação de células *naive* em células T reguladoras (MCCALL *et al* 2007). Isso também poderia tender diretamente no aumento da proporção de células T reguladoras com o intuito de modularem a resposta imunológica durante a malária. Essa característica reguladora corrobora diretamente com os dados de preservação de lesão pulmonar também descritos pelo presente trabalho.

Além do aumento individual dos marcadores leucocitários avaliados neste estudo no grupo PbA, observou-se o aumento da proporção de células T CD8 no tecido pulmonar dos animais. Os linfócitos TCD8+ tem como principal papel a ação contra as formas exo-eritrocíticas do Plasmodium (MALIK *et al.*, 1991). A resposta de TCD8+ é baseada na síntese de TNF- α e IFN- γ (dados que também correspondem ao perfil de citocinas encontrados), onde eliminam os parasitos dos hepatócitos por meio de grânulos granzimas e perforinas presentes em seu citoplasma celular, atuando por meio da via do óxido nítrico que interrompe o

desenvolvimento do parasito dentro do hepatócito (MONTES DE OCA *et al.*, 2016; SEGUIN *et al.*, 1994). Essas células são fundamentais ao longo da resposta imunológica devido a liberação de citocinas e substâncias de lise celular em todas as fases do ciclo do parasito.

Nos pulmões o aumento de linfócitos TCD8+ pode ter correlação com outro tipo de patologia pulmonar importante, a redução de surfactante devido a perda de Pneumócitos tipo II, uma vez que, seu potencial citotóxico é capaz de causar apoptose nessas células essenciais da fisiologia pulmonar (SCACCABAROZZI *et al* 2018). Os Pneumócito tipo II são células do tipo pneumócito, encontrada no pulmão. Essas células são produtoras de surfactante que são responsáveis pela manutenção da tensão superficial. Estudos demonstram que a diminuição de pneumócitos do tipo II iniciam um desequilíbrio no transporte de fluídos, além de reduzir a produção de surfactante dificultando assim a hematose (SCACCABAROZZI *et al* 2018). Sendo assim a diminuição de células T CD8+ no grupo dos animais tratados com óleo de peixe rico em DHA promove uma preservação da complacência pulmonar.

Considerando que iNOS é utilizado como marcador de células com perfil inflamatório (ANTEY, WEINBERG *et al*, 1996) nós investigamos a expressão dos mesmos em populações de macrófagos/células dendríticas, uma vez que, as mesmas estiveram aumentadas tanto em animais tratados e infectados com PbA. Corroborando com as evidências de perfil regulador do óleo de peixe rico em DHA e da análise de perfil de citocinas, esse grupo, apesar de aumentado, apresentou uma média menor de média de intensidade de fluorescência (MIF) em relação ao grupo somente infectado. Esse dados corroboram com a teoria reguladora do óleo de peixe rico em DHA, uma vez que, apesar de aumentas, essas células aparentam produzir de forma muito reduzida iNOS, substância conhecida na literatura por causar lesão nos tecidos.

A citocina TNF- α é responsável por grande parte do controle do desenvolvimento do parasita e é capaz de ativar a produção de fator inibitório da migração do macrófago, sendo sintetizada durante a ativação macrofágica e induzindo, nessas células, a síntese de óxido nítrico (NO) via iNOS e de citocinas inflamatórias (CLARK, BUUD *et al*,2006; GAZZINELI, KALATARI *et al.*,2014). O NO produzido através de iNOS já foi relacionado com várias patologias relacionadas a malária grave, principalmente devido sua característica citotóxica (GAZZINELI, KALATARI *et al.*,2014).

O fator inibitório de migração de macrófago era descrito como um fenômeno capaz de induzir inibição da migração de macrófagos derivados de linfócitos T (DAVID, 1966). Mais recentemente ele foi descrito como citocina multifuncional capaz de interferir na patogenia de

várias doenças humanas, incluindo sepse e choque séptico (BERNHAGEN, CALANDRA *et al.*, 1993;), síndrome do desconforto respiratório agudo (DONNELLY, BUCALA *et al.*, 1997) e doenças inflamatórias e auto-imunes como a artrite reumatóide (GREGERSEN, BUCALA *et al.*, 2003), glomerulonefrite (LAN, GARCIA *et al.*, 2000), doenças inflamatórias intestinais (de JONG ABADIA-MOLINA *et al.*, 2001) e malária (MCDEVITT, XIE *et al.* 2006). Os dados da literatura, juntamente com os dados apresentados por esse trabalho, nos levam a supor que o óleo de peixe rico em DHA modificou os perfis de citocinas inflamatórias, que culminou em uma mudança no perfil imunológico, onde foi visto uma diminuição expressiva de moléculas citotóxicas que estão envolvidas, principalmente, na patologia pulmonar.

No presente estudo a análise histopatológica dos pulmões dos animais PbA revelou que camundongos infectados que vieram a óbito no sétimo dia de infecção, apresentaram um extenso e severo edema alveolar por transudato devido a desequilíbrio osmótico juntamente com focos hemorrágicos nos capilares pulmonares. Também foi possível observar focos hemorrágicos intra-alveolares e hipertrofia de musculatura lisa pulmonar. Em contrapartida, os animais tratados com ambas as doses de óleo de peixe rico em DHA tiveram sua permeabilidade vascular preservada, resultando em diminuição de edema e ausência de focos hemorrágicos intra e extra- alveolar. Nos dados histológicos do influxo de células inflamatórias, curiosamente não houve diferença entre os animais tratados e os animais apenas infectados pelo PbA, assim como o muco encontrado. Se tratando do influxo de células inflamatórias, ao analisamos os dados juntamente com as informações da fenotipagem celular *in situ* acredita-se que, apesar de haver intenso recrutamento de células inflamatórias para o pulmão, essas possuem um perfil regulador em animais tratados com ambas as doses de óleo de peixe rico em DHA, como já foi identificado em estudos com Ômega 3 onde o perfil de células recrutadas para doenças inflamatórias tem característica reguladora (MCCALL *et al.* 2007) e pelo aumento de citocinas Il-10 (SOKOL, LUSTER, 2015; SCHIMIDT *et al.*, 2018). Quanto a caracterização de muco no presente trabalho, por sua vez, a presença em ambos os grupos pode estar relacionado com o aspecto crônico da doença (LIPPERT, GUNCKEL *et al.*, 2008), uma vez que não foi utilizado nenhum antimalárico associado, os animais tratados permaneceram infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA.

Se tratando de patologias pulmonares a nível histológico, é descrito durante a malária pulmonar grave por *P. falciparum* a adesão de eritrócitos parasitados nos capilares alveolares, causando congestão da microcirculação pulmonar, com grande número de monócitos e neutrófilos que, frequentemente, contêm hemozoína fagocitada (TAYLOR *et al.*, 2012). Outras

alterações possíveis são também a presença de septos alveolares espessados e congestionados, hemorragia intra-alveolar e edema pulmonar. Nas formas mais graves, estes achados podem incluir a formação de membranas hialinas (TAYLOR *et al.*, 2012). Estas descobertas apoiam ainda mais a hipótese de que o septo alveolar é o principal local das alterações pulmonares observadas na malária grave (TAYLOR *et al.*, 2012).

O presente estudo não demonstrou a determinação da via de ação do óleo de peixe rico em DHA, assim como se limitou a sugerir juntamente com dados bibliográficos o fator imunorregulador ao DHA, uma vez que, o óleo utilizado possui em sua composição fatores como o EPA e a vitamina E que já foram correlacionadas também a modulações imunológicas.

Os resultados apresentados aqui constituem importantes achados no que diz respeito a infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA e o tratamento profilático com óleo de peixe rico em DHA. Foram observadas evidências que nos permitem inferir a proteção do óleo de peixe rico em DHA na malária grave pulmonar, uma vez que, foi observado um aumento na sobrevivência e no perfil clínico dos animais, a preservação da permeabilidade vascular resultando em diminuição de edema nos animais, uma mudança no perfil de citocinas e de células inflamatórias recrutadas para os pulmões dos animais e uma preservação a nível histológico das estruturas funcionais do pulmão dos animais tratados.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos por esse estudo nos permitem inferir que o uso contínuo de óleo de peixe rico em DHA é capaz de proteger contra danos letais induzidos pela infecção malárica experimental, incluindo aqueles que afetam as funções pulmonares. Essa conclusão fundamenta-se no fato de que animais tratados apresentaram:

- 1- Aumento da sobrevida e preservação das funções clínicas;
- 2-integridade da barreira vascular e ausência de edema pulmonar, duas das principais patologias da malária pulmonar;
- 3-redução e/ou ausência de danos histopatológicos no pulmão como hemorragias alveolares e vasculares, edema, contração brônquica e hipertrófica da musculatura lisa.

4-perfil anti-inflamatório de citocinas no tecido pulmonar;

5-redução de células citotóxicas no tecido pulmonar.

8 REFERÊNCIA

ABDALLA, S. H. Peripheral blood and bone marrow leucocytes in Gambian children with malaria: numerical changes and evaluation of phagocytosis. **Annals of Tropical Paediatrics**, v. 8, n. 4, p. 250–8, 1988.

ADAMS, S; BROWN, H; TURNER, G. Breaking down the blood-brain barrier: signaling a path to cerebral malária?. **Trends in parasitology**, v. 18, n. 8, p. 360-366, 2002.

AGBENYEGA, T. et al. Glucose and lactate kinetics in children with severe malaria. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, n. 4, p. 1569–1576, 2000.

AKECH S, GWER S, IDRO R, FEGAN G, EZIEFULA AC, NEWTON CR, LEVIN M, MAITLAND K. Volume expansion with albumin compared to gelofusine in children with severe malaria: results of a controlled trial. **PLoS Clin Trials**, v.1, p. 21, 2006.

AMANI, V. et al. Cloned lines of *Plasmodium berghei* ANKA differ in their abilities to induce experimental cerebral malaria. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 9, p. 4093– 4099, 1998.

AMANTE, F. H. et al. Immune-Mediated Mechanisms of Parasite Tissue Sequestration during Experimental Cerebral Malaria. **J Immunol**, v. 185, n. 6, p. 3632–3642, 2010.

AMINO, R. et al. Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. **Nature Medicine**, v. 12, n. 2, p. 220–4, 2006.

AMINO, R.; THIBERGE, S.; MARTIM, B. Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. **Nature Medicine**, v. 12, n. 2, p. 220–4, 2006.

ANSTEY NM, WEINBERG JB, HASSANALI MY, MWAIKAMBO ED, MANYENGA D, MISUKONIS MA, ARNELLE DR, HOLLIS D, MCDONALD MI, GRANGER DL. Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression. **J Exp Med.**, v.184, p.557-67, 1996

ANSTEY, N. M. et al. The pathophysiology of vivax malaria. n. April, 2009.

AREDES MA, CAMARA AO, PAULA NS, FRAGA KYD, CARMO MDGT, CHAVES GV. Efficacy of ω -3 supplementation on nutritional status, skeletal muscle, and chemoradiotherapy toxicity in cervical cancer patients: A randomized, triple-blind, clinical trial conducted in a middle-income country. **Nutrition.**, p.67-68, 2019.

ARMELAGOS, G.J.; GOODMAN, A.H.; JACOBS, K.H. The origins of agriculture: population growth during a period of declining health. **Population & Environment**, v. 13, n. 4, p. 9-22, 1991.

ARTAVANIS-TSAKONAS, K.; RILEY, E. M. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. **Journal of immunology** (Baltimore, Md. : 1950), v. 169, n. 6, p. 2956–2963, 2002.

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, n. 2, p. 145– 152, 2003.

ARUN KUMAR, C.; DAS, ONU Peróxidos lipídicos, óxido nítrico e ácidos graxos essenciais em pacientes com malária por *Plasmodium falciparum*. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 61 , p. 255–258, 1999.

ATTOLINI RC; GALLON CW. Qualidade de Vida e Perfil Nutricional de Pacientes com Câncer Colorretal Colostomizados. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v.30, n.3, Caixias do Sul, 2010. p.289-298.

BACCARELLA, A. et al. Toll-like receptor 7 mediates early innate immune responses to malaria. *Infection and Immunity*, v. 81, n. 12, p. 4431–4442, 2013.

BAER K, KLOTZ C, KAPPE SHI, SCHNIEDER T, FREVERT U. Release of hepatic *Plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. **PloS Pathogens**, v.3, p.e171, 2007.

BAGGA, D., ANDERS, KH, WANG, HJ E GLASPY. Cadeia longa ω -3- a- ω-6 poliinsaturado administrado em mulheres com e sem câncer de mama. **Nutr.**, v. 42, p. 180-5, 2001.

BANG, H. O., J. DYERBERG, AND A. B. NIELSON. Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-Coast Eskimos. **Lancet** v.1, p. 1143, 1971.

BARATA, R.C.B. Malária no Brasil: Panorama Epidemiológico na Última Década. **Cad. Saúde Pública**, v.11, n.1, 1995.

BELNOUE, E. et al. Protective T Cell Immunity against Malaria Liver Stage after Vaccination with Live Sporozoites under Chloroquine Treatment. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 4, p. 2487–2495, 2004.

BERENDT, A. R.; TUMER, G. D. H.; NEWBOLD, C. I. Cerebral malaria: The sequestration hypothesis. **Parasitology Today**, v. 10, n. 10, p. 412–414, 1990.

BERENDT, A. R.; TUMER, G. D. H.; NEWBOLD, C. I. Cerebral malaria: The sequestration hypothesis. **Parasitology Today**, v. 10, n. 10, p. 412–414, 1994.

BERNHAGEN J, CALANDRA T, MITCHELL RA, MARTIN SB, TRACEY KJ, VOELTER W, MANOGUE KR, CERAMI A, BUCALA R. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. **Nature**, v. 365, p. 756-9, 1993.

BIENVENU AL, FERRANDIZ J, KAISER K, LATOUR C, PICOT S. Artesunate–erythropoietin combination for murine cerebral malaria treatment. **Acta Trop** v.106, p.104–08, 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS. **Guia de vigilância em saúde**. [s.l.: s.n.].

CALDER P.C., ADOLPH P.C., DEUTZ N.E., GRAU T., INNES J.K., KLEK, S., LEV S., MAYER K., MICHAEL-TITUS A.T. Lipids in the intensive care unit: recommendations from the ESPEN expert group, **Clin. Nutr.**, v. 37, p. 1-18, 2018

CALDER, P.C. Docosahexaenoic Acid. **Ann. Nutr. Metab.**, v. 69, p. 7–21, 2016.

CAMARGO, EP. MALÁRIA, MALEITA, PALUDISMO. **Ciencia e Cultura**, vol.55, no.1, 2003.

CAMPOS, M. A. S. et al. Activation of Toll-Like Receptor-2 by Glycosylphosphatidylinositol Anchors from a Protozoan Parasite. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 1, p. 416–423, 2001.

CASALS-PASCUAL C, IDRO R, PICOT S, ROBERTS DJ, NEWTON CRJC. Can erythropoietin be used to prevent brain damage in cerebral malaria? **Trends Parasitol**, v. 25, p.30-36, 2008

CLARK IA, BUDD AC, ALLEVA LM, AND COWDEN WB. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. **Malar J.**, v. 5, p. 85, 2006

CLARK, I. A.; ROCKETT, K. A. The cytokine theory of human cerebral malaria. **Parasitology Today**, v. 10, n. 10, p. 410–412, 1974.

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

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

COLLINS W.E.; JEFFERY G.M. A retrospective examination of sporozoite- and trophozoite-induced infections with *Plasmodium falciparum*: development of parasitologic and clinical immunity during primary infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, p. 4-19, 1999.

CONSTANZO, L. Fisiologia. 4^oed, 2014.

COPPI, A. et al. Heparan Sulfate Proteoglycans Provide a Signal to Plasmodium Sporozoites to Stop Migrating and Productively Invade Host Cells. **Cell Host and Microbe**, v. 2, n. 5, p. 316–327, 2007.

COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 755–766, 2006.

COWMAN, A. F.; JULIE, C.; MARAPANA, D. Malaria: Biology and Disease. **Cell**, v. 167, n. 3, p. 610–624, 2016.

COX, F. E. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 1, p. 5, 2010.

CUNNINGTON AJ, RILEY EM, WALTHER M. Stuck in a rut? Reconsidering the role of parasite sequestration in severe malaria syndromes. **Trends Parasitol**, v. 12, p. 585–92, 2013.

DAVID JR. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. **Proc Natl Acad Sci**, v.56, p.72-7, 1996.

DOBBS KR, CRABTREE JN, DENT AE. Innate immunity to malaria—The role of monocytes. **Immunol Rev**, v.1, p. 8–24, 2020.

DONNELLY SC, BUCALA R. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of glucocorticoid activity with a critical role in inflammatory disease. *Mol Med Today*, v.3, p. 502-7, 1997.

DOOLAN, D. L.; DOBAÑO, C.; BAIRD, J. K. Acquired immunity to Malaria. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 22, n. 1, p. 13–36, 2009.

DORMANS JAMA. Morphology, function and response of pulmonary type I cells: a review. *Inhal Toxicol.*, v. 8, p. 521–536, 1996.

DOSTERT, C. et al. Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. *PLoS ONE*, v. 4, n. 8, p. 1–10, 2009.

ECHEVERRÍA, F. et al. Docosahexaenoic acid (DHA), a fundamental fatty acid for the brain: New dietary sources. v. 124, p. 1 – 10, 9 2017.

EIAM-ONG S, SITPRIJA V. *Falciparum* malaria and the kidney: a model of inflammation. *Am J Kidney Dis*, v.32, p. 361–75, 1998.

EIAM-ONG S. Nefropatia da malária. *Semin Nefrol*, v. 23, p. 21–33, 2003

ELZEIN F, MOHAMMED N, ALI N, BAHLOUL A, ALBADANI A, ALSHERBEENI N. Pulmonary manifestation of *Plasmodium falciparum* malaria: Case reports and review of the literature. *Respir Med Case Reports.*, v. 22, p. 83–6, 2017.

ENGWERDA, C. R.; BEATTIE, L.; AMANTE, F. H. The importance of the spleen in 55 malarias. *Trends in Parasitology*, v. 21, n. 2, p. 75–80, 2005. EPSTEIN, J. E. et al. Protection against *Plasmodium falciparum* malaria by PfSPZ Vaccine. *JCI Insight*, v. 2, n. 1, p. 1–14, 2017.

ERUSLANOV EB, LYADOVA I V., KONDRATIEVA TK, MAJOROV KB, SCHEGLOV I V., ORLOVA MO, et al. Neutrophil Responses to *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Genetically Susceptible and Resistant Mice. *Infect Immun*, v. 3, p. 1744–53, 2005.

ESCALANTE, A. A. Et al. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome B from the linear mitochondrial genome. *PNAS*, v.95, p. 8124-8129, 1998.

FADOK VA, DE CATHELINEAU A, DALEKE DL, HENSON PM, BRATTON DL. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, v.276, p.1071-1077, 2001.

FRANÇA, T.C.C.; SANTOS, M.G. FIGUEIROA-VILAR, J.D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. *Quim. Nova*, v. 31, n. 5, 1271-1278, 2008.

FRANKE-FAYARD B, TRUEMAN H, RAMESAR J, MENDOZA J, VAN DER KEUR M, VAN DER LINDEN R, et al. A *Plasmodium berghei* reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle. *Mol Biochem Parasitol.*, v. 137, p. 23-33, 2004.

FREDDI NA et al. Terapia com surfactante pulmonar exógeno. *Jornal de Pediatria* , v..79, Supl.2, 2003

FREITAS, R. D.; CAMPOS, M. M. Protective Effects of Omega-3 Fatty Acids in Cancer-Related Complications. v. 11, n. 5, 5 2019.

FRIED, M.; DUFFY, P. E. Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. **Science.**, v. 272, n. 5267, p. 1502–4., 1996.

FUJIKAWA, M.; KAMITANI, T.; TUNRU, I.; YAMAZAKI, K.; HAMAZAKI, T. Efeitos antimaláricos de ácidos graxos poliinsaturados n-3 purificados e α -tocoferol. **J. Nutr. Bioquim.**, v. 4, 153–157, 1993.

GAZZINELLI RT, KALANTARI P, FITZGERALD KA, GOLENBOCK DT. Innate sensing of malaria parasites. **Nat Rev Immunol** v. 14, p.744–57, 2014.

GHASEMIFARD, S., K. HERMON, G. M. TURCHINI, AND A. J. SINCLAIR. Metabolic fate (absorption, b-oxidation and deposition) of long-chain n-3 fatty acids is affected by sex and by the oil source (krill oil or fish oil) in the rat. **British Journal of Nutrition** v. 114, p. 684–92, 2015.

GIACALONE VD, MARGAROLI C, MALL MA, TIROUVANZIAM R. Neutrophil Adaptations upon Recruitment to the Lung: New Concepts and Implications for Homeostasis and Disease. **Int J Mol Sci**, v. 28, p. 851, 2020.

GODFREY, DG Ação antiparasitária do óleo de fígado de bacalhau dietético sobre o *Plasmodium berghei* e sua reversão pela vitamina E. **Exp. Parasitol.**, v. 6, p. 555-565, 1957.

GONÇALVES RM, SCOPEL KKG, BASTOS MS, FERREIRA MU. Cytokine Balance in Human Malaria: Does *Plasmodium vivax* Elicit More Inflammatory Responses than *Plasmodium falciparum*? Snounou G, editor. **PLoS One**, v.9, p. 44394, 2012.

GOOD, M. F. A whole parasite vaccine to control the blood stages of *Plasmodium* - the case for lateral thinking. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 8, p. 335–340, 2011.

GOOD, M. F. et al. DEVELOPMENT AND REGULATION OF CELL -MEDIATED IMMUNE RESPONSES TO THE BLOOD STAGES OF MALARIA : Implications for. **Annual review of immunology**, v. 23, p. 69–99, 2005.

GORDEUK V, THUMA P, BRITTENHAM G, MCLAREN C, PARRY D, BACKENSTOSE A, BIEMBA G, MSISKA R, HOLMES L, MCKINLEY E, et al. Effect of iron chelation therapy on recovery from deep coma in children with cerebral malaria. **N Engl J Med** v. 327, p. 1473- 7, 1992.

GORDEUK VR, LOYEVSKY M. Antimalarial effect of iron chelators. **Adv Exp Med Biol** v.509, p.251-72, 2002.

GRAU GE, DE KOSSODO S,. Profiles of cytokine production in relation with susceptibility to cerebral malaria. **J Immunol.**, v. 151, p.4811-4820, 1994.

GREGERSEN PK, BUCALA R. Macrophage migration inhibitory factor, MIF alleles, and the genetics of inflammatory disorders: incorporating disease outcome into the definition of phenotype. **Arthritis Rheum**, v.48, p.1171-6, 2003.

HAINAULT, I.; CARLOTTI, M.; HAJDUCH, E.; GUICHARD, C.; LAVAU, M. Fish oil in a high lard diet prevents obesity, hyperlipidemia, and adipocyte insulin resistance in rats. **Ann. N. Y. Acad. Sci**, v. 683, n. 14, p. 98-101, jun. 1993

- HAMAZAKI, K.; SYAFRUDDIN, D.; TUNRU, IS; AZWIR, MF; ASIH, PB; SAWAZAKI, S.; HAMAZAKI, T. Os efeitos do óleo de peixe rico em ácido docosaheptaenóico no comportamento, taxa de frequência escolar e infecção por malária em crianças em idade escolar - um estudo duplo-cego, randomizado e controlado por placebo em Lampung, Indonésia. **Ásia Pac. J. Clin. nutr.**, v.17, p. 258-263, 2008.
- HAMILTON B., WARE L.B., MATTHAY M.A. Lipid mediators in the pathogenesis and resolution of sepsis and ARDS. **Annu. Updat. Intensive Care Emerg. Med.**, 2018,
- HASHIMOTO, M., S. HOSSAIN, H. YAMASAKI, K. YAZAWA, AND S. MASUMURA. Effects of eicosapentaenoic acid and docosaheptaenoic acid on plasma membrane fluidity of aortic endothelial cells. **Lipids** v. 34, p.1297– 304, 1999.
- HAWASS, Z. Ancestry and Pathology in King Tutankhamun's Family. **Journal of American Medical Association**, v. 303, n. 7, 2010.
- HERMSEN, C. et al. Depletion of CD4+ or CD8+ T-cells prevents *Plasmodium berghei* induced cerebral malaria in end-stage disease. **Parasitology**, v. 114 (Pt 1, n. March 1996, p. 7–12, 1997.
- HERRERA R.; ANDERSON C.; KUMAR K. Reversible conformational change in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein masks its adhesion domains. **Infect. Immun.**, v. 83, p. 3771-3780, 2015.
- HILL, D. L. et al. Opsonising Antibodies to *P. falciparum* Merozoites Associated with Immunity to Clinical Malaria. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, 2013. HIRUNPETCHARAT, C. et al. Malaria parasite-specific Th1-like T cells simultaneously reduce parasitemia and promote disease. **Parasite Immunology**, v. 21, n. 6, p. 319–329, 1999.
- HILL, D. L.; ERIKSSON, E. M.; SUEN, C. S. L. W.; CHIU C. Y.; RYGCORNEJO, V.; ROBINSON, L. J.; SIBA, P.M.; MUELLER, I.; HANSEN, D.S.; SCHOFIELD, L. 2013. Opsonising Antibodies to *P. falciparum* Merozoites Associated with Immunity to Clinical Malaria. **PloS one**, v.8, p. 74627, 2013.
- HINOJOSA C.A., GONZALEZ-JUARBE RAHMAN N., M.M., FERNANDES G., ORIHUELA C.J., RESTREPO M.I., Omega-3 fatty acids in contrast to omega-6 protect against pneumococcal pneumonia. **Microb. Pathog.** 141, 2020,
- HINOJOSA-MEDINA A, FUNES-RODRÍGUEZ R, SALDIERNA RJ, LLUCH-BELDA D, SMITH PE, WATSON W. Larvas de peixes do Golfo da Califórnia. **Cimar**, v. 67, p. 1-11, 2003.
- HUNT NH, GRAU GE. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. **Trends in Immunol.**, v. 24 p. 491-499, 2003.
- JENKINS NE, NEWTON CR. Patogênese, características clínicas e resultados neurológicos da malária cerebral . **Lancet Neurol** , v. 4 : p. 827-840, 2005.
- JOHN CC, KUTAMBA E, MUGARURA K, OPOKA RO. Adjunctive therapy for cerebral malaria and other severe forms of *Plasmodium falciparum* malaria. **Expert Rev Anti Infect Ther** v. 8, p. 997-1008, 2010.
- JONG YP DE, ABADIA-MOLINA A C, SATOSKAR A R, CLARKE K, RIETDIJK ST, FAUBION W A, et al. Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. **Nat Immunol**, v.2, p.1061-6, 2001.

KILLICK, K. R. Taxonomy, Zoogeography and Evolution. Department of Zoology and Applied Entomology, **London**. p. 1-52, dez. 1978.

KUMAR R, NG S, ENGWERDA C. The role of IL-10 in malaria: A double edged sword. **Front Immunol.**, v. 10, p.1–10.

KUMARATILAKE, LM; FERRANTE, A.; ROBINSON, BS; JAEGER, T.; POULOS, A. Aprimoramento da morte mediada por neutrófilos de formas sanguíneas assexuadas de *Plasmodium falciparum* por ácidos graxos: Importância da estrutura dos ácidos graxos. **Infectar. Imun.**, v. 65, p. 4152–4157, 1997.

LAGASSÉ HAD, ANIDI IU, CRAIG JM, LIMJUNYAWONG N, POUPORE AK, MITZNER W, et al. Recruited monocytes modulate malaria-induced lung injury through CD36-mediated clearance of sequestered infected erythrocytes. **J Leukoc Biol.**, v.5, p.659–71, 2016

LAM KD, GARCIA RT, NGUYEN LH, TRINH H, TRIADAFILOPOULOS G, PHAN JT, et al. Prevalence of colorectal neoplasms in Asian Americans. **Dig Dis Sci**, v. 54, p.160-7, 2009.

LANGLOIS J, HELIAS A, FRENN P. A pesca na avaliação do ciclo de vida: Fatores operacionais para o esgotamento dos recursos bióticos. **Peixes e Pescas**, v. 1, 2019.

LEORATTI FM, TREVELIN SC, CUNHA FQ, ROCHA BC, COSTA PA, GRAVINA HD, et al. Neutrophil paralysis in *Plasmodium vivax* malaria. **PLoS Negl Trop Dis** v. 6, p. 1710, 2012.

LEVANDER, OA; AGER, AL, JR.; MORRIS, VC; MAIO, RG *Plasmodium yoelii*: Atividades antimaláricas comparativas de óleos de peixe na dieta e concentrados de óleo de peixe em camundongos com deficiência de vitamina E. **Exp. Parasitol.**, v.70, p. 323-329, 1990

LEY K, HOFFMAN HM, KUBES P, CASSATELLA MA, ZYCHLINSKY A, HEDRICK CC, et al. Neutrophils: New insights and open questions. **Sci Immunol**, v. 3, 2018

LI MO, SARKISIAN MR, MEHAL WZ, RAKIC P, FLAVELL RA. Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells. **Science**, v.302, p.1560-1563, 2003.

LIPPERT E, GUNCKEL M, BRENMÖHL J, BATAILLE F, FALK W, SCHOLMERICH J et al. - Regulation of galectin-3 function in mucosal fibroblasts: potential role in mucosal inflammation. **Clin Exp Immunol**, 152: p. 285-297, 2008.

LOIOLA, C.C.P.; MANGABEIRA DA SILVA, C.J.; TAUIL P.L. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. **Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health**, v. 11 p. 4, 2002.

LOU J, LUCAS R, GRAU GE: Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. **Clin Microbiol Ver**, V. 14, P. 810-820, 2001.

MAKNITIKUL S, LUPLERTLOP N, GRAU GER, AMPAWONG S. Dysregulation of pulmonary endothelial protein C receptor and thrombomodulin in severe falciparum malaria-associated ARDS relevant to hemozoin. **Huy NT, editor. PLoS One.**, v.7, 2017.

MALIK, A et al. Human cytotoxic T lymphocytes against the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 8, p. 3300–3304, 1991.

MANTOVANI, A, SICA, A, LOCATI M. Macrophage Polarization Comes of Age. **Immunity**, v. 23, p.344–6, 2005.

MARQUES, A. C.; PINHEIRO, E. A. Fluxos de casos de malária no Brasil em 1980. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, n.34, p. 01-31, 1982.

MARSH K, FORSTER D, WARUIRU C. Indicadores de malária com risco de vida em crianças africanas. **Nova Engl J Med**, v. 332: p. 1399-1404, 1995

MARTINEZ FO, GORDON S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **Prime Rep**, v, 3, p. 1–13, 2014.

MARTÍNEZ-ESTRADA OM, RODRÍGUEZ-MILLÁN E, GONZÁLEZ-DE VICENTE E, REINA M, VILARÓ S, FABRE M. Erythropoietin protects the in vitro blood-brain barrier against VEGF-induced permeability. *Eur J Neurosci*, v. 18, p.2538-44, 2003.

MAYXAY, M.; PUKRITTAYAKAMEE. S.; NEWTON, P.N.; WHITE, N, J. Mixed-species malaria infections in humans. *Trends in parasitology*, v. 20, n. 5, p. 233-240, 2004.

MCCALL MB, NETEA MG, HERMSEN CC, JANSEN T, JACOBS L, GOLENBOCK D, et al. *Plasmodium falciparum* infection causes proinflammatory priming of human **TLR responses**. **J Immunol**, v. 179, p.162-71, 2007.

MCCARTNEY DM, BYRNE DG. Optimisation of Vitamin D Status for Enhanced Immuno-protection Against Covid-19. **Ir Med J.**, v.113 p.58-61, 2020.

MCDEVITT M A, XIE J, SHANMUGASUNDARAM G, GRIFFITH J, LIU A, MCDONALD C, et al. A critical role for the host mediator macrophage migration inhibitory factor in the pathogenesis of malarial anemia. **J Exp Med**, v. 203, p.1185-96, 2006.

MEDANA IM, HUNT NH, CHAUDHRI G. Tumor necrosis factor alpha expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and astrocytes. **Am J Pathol**. v. 150, p. 1473-1486, 1997.

MERENDINO, N. et al. Dietary ω -3 Polyunsaturated Fatty Acid DHA: A Potential Adjuvant in the Treatment of Cancer. v. 2013, 2013.

MILLER LH, BARUCH DI, MARSH K, DOUMBO OK. The Pathogenic basis of malaria. **Nature**. V. 415, P. 673-679, 2002.

MISHRA SK, NEWTON CRJC. Diagnosis and management of the neurological complications of falciparum malaria. **Nat Rev Neurol**, v.5, p.189-198, 2009.

MOHAN, K.; MOULIN, P.; STEVENSON, M. M. Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. **Journal of immunology** (Baltimore, Md.: 1950), v. 159, n. 10, p. 4990–4998, 1997.

MOHANTY D, GHOSH K, PATHARE AV, KARNAD D. Deferiprone (L1) as an adjuvant therapy for *Plasmodium falciparum* malaria. **Indian J Med Res** v. 115, p.17–21, 2002

MONTEIRO AP, SOLEDADE E, PINHEIRO CS, DELLATORRE-TEIXEIRA L, OLIVEIRA GP, OLIVEIRA MG, et al. Pivotal role of the 5-lipoxygenase pathway in lung injury after experimental sepsis. **Am J Respir Cell Mol Biol.**, v.50, p.87-95, 2014.

MONTES DE OCA, M. et al. The Impact of Established Immunoregulatory ,Networks on Vaccine Efficacy and the Development of Immunity to Malaria. *The Journal of Immunology*, v. 197, n. 12, p. 4518–4526, 2016.

MORALES-NEBREDA L, MISHARIN A V., PERLMAN H, SCOTT BUDINGER GR. The heterogeneity of lung macrophages in the susceptibility to disease. **Eur Respir Ver**, v. 24, p. 505–9, 2015.

MORENO-PÉREZ DA, RUÍZ JA, PATARROYO MA. Reticulocytes: *Plasmodium vivax* target cells. **Biology of the Cell.**, v. 105, p. 251–260, 2013.

MU, J. Et al. Host switch leads to emergence of *Plasmodium vivax* malaria humans. **Molecular Biology and Evolution**, v.22, n.8, p. 1686-1693, 2005.

NEILL AJ, HUNT NH. Pathology of fatal and resolving *Plasmodium berghei* cerebral malaria in mice. **Parasitology**, v. 105, p.165-175, 1992.

NÉMETH T, SPERANDIO M, MÓCSAI A. Neutrophils as emerging therapeutic targets. **Nat Rev Drug Discov**, v. 22, p.253–75, 2020.

OBERLI A, ZURBRÜGG L, RUSCH S, BRAND F, BUTLER ME, DAY JL, et al. *Plasmodium falciparum* Plasmodium helical interspersed subtelomeric proteins contribute to cytoadherence and anchor *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 to the host cell cytoskeleton. **Cell Microbiol**, v.10, p. 415–28, 2016.

PASCHOAL, V.A.; VINOLO, M.A.; CRISMA, A.R.; MAGDALON, J.; CURI, R. Eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acid differentially modulate rat neutrophil function in vitro. **Lipids**, v. 48, p. 93–103, 2013

PÉRIGNON, J. L. e DRUILHE, P.1994. Immune mechanisms underlying the premunition against *Plasmodium falciparum* malaria. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 51-53, 1994.

PIMENTEL, T. Probióticos e Benefícios à Saúde. **Saúde e Pesquisa**, 2011.

PINZON-CHARRY, A. et al. Low doses of killed parasite in CpG elicit vigorous CD4+ T cell responses against blood-stage malaria in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 8, p. 2967–2978, 2010.

PIRES A, BORGES A, ADRAGÃO T, SILVA M, BORGES F: Malária e Rim. **Medicina Interna**, v. 8, p. 2, 2001

PLEBANSKI, M. e HILL A. V. S. The immunology of malaria infection. **Current opinion in immunology**, v.12, p.437-441, 2000.

POLLARD JW. Trophic macrophages in development and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 9, p. 259–70, 2009.

PORCHERIE A, MATHIEU C, PERONET R, SCHNEIDER E, CLAVER J, COMMERE P-H, et al. Critical role of the neutrophil-associated high-affinity receptor for IgE in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. **J Exp Med**, 11, p. 2225–36, 2011.

PRUDÊNCIO, M.; RODRIGUEZ, A.; MOTA, M. M. The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage. v. 4, n. November, p. 849–856, 2006.

RAJA, A. I. et al. Chemically attenuated blood-stage *Plasmodium yoelii* parasites induce long-lived and strain-transcending protection. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 8, p. 2274–2288, 2016.

RILEY, E. M, ARTAVANIS-TSAKONAS, K. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 169, n. 6, p. 2956–2963, 2002

RILEY, E. M. et al. Do maternally acquired antibodies protect infants from malaria infection ?, p. 51–59, p. 2001, 2000.

RILEY, E. M.; WAHL S.; PERKINS, D. J.; SCHOFIELD, L. Regulating immunity to malaria. *Parasite immunology*, v. 28, p. 35-49.

ROBERTS, D. J. et al. Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. *Nature*, v. 357, n. 6380, p. 689–92, 1992.

ROCHA BC, MARQUES PE, LEORATTI FM DE S, JUNQUEIRA C, PEREIRA DB, ANTONELLI LR DO V, et al. Type I Interferon Transcriptional Signature in Neutrophils and Low-Density Granulocytes Are Associated with Tissue Damage in Malaria. *Cell Rep.*, 12, p.2829–41, 2015.

RODRIGUES, F.G.; CAMPOS, J.B.; SILVA, G.D.; WEXNER, S.D. Endoscopic ultrasound in the diagnosis of foreign bodies of the colon and rectum. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v. 62, p. 818–821, 2016.

RODRÍGUEZ-CRUZ, M.; SERNA, D. S. Nutrigenomics of ω -3 fatty acids: Regulators of the master transcription factors. v. 41, p. 90 – 96, 9 2017.

ROGERO, M.M. et al. Potential benefits and risks of omega-3 fatty acids supplementation to patients with COVID-19. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 156 p. 190–199, 2020.

RUDIN W, EUGSTER H PIETRO, BORDMANN G, BONATO J, MÜLLER M, YAMAGE M, et al. Resistance to cerebral malaria in tumor necrosis factor- α / β -deficient mice is associated with a reduction of intercellular adhesion molecule-1 up- regulation and T helper type 1 response. *Am J Pathol.*, v.1, p. 257–66, 1997.

RUZICKOVA, J.; ROSSMEISL, M.; PRAZAK, T.; FLACHS, P.; SPONAROVA, J.; VECK, M.; ET AL. Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. *Lipids*, v. 39, n. 12, p. 1177-1185, dez. 2004.

SABCHAREON, A.; BURNOUF, T.; OUATTARA, D. Pasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in *falciparum* malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 45, p.297-308, 1991.

SALLES, R.; BOUWMAN, A.; ANDERUNG, C. The spread of malaria to Southern Europe in antiquity: new approaches to old problems. *Medical History*, v. 48, p. 311-328, 2004.

SÁNCHEZ-LARA K, TURCOTT JG, JUÁREZ-HERNÁNDEZ E, NUÑEZ-VALENCIA C, VILLANUEVA G, GUEVARA P, et al. Effects of an oral nutritional supplement containing eicosapentaenoic acid on nutritional and clinical outcomes in patients with advanced non-small cell lung cancer: randomised trial. *Clin Nutr.*, v. 33, p. 1017-23, 2014.

SAPIENZA, M. T, et al. Tratamento do Carcinoma Diferenciado da Tireóide Com Iodo-131: Intervenções Para Aumentar a Dose Absorvida de Radiação. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v.49, n.3. São Paulo, Junho, 2005.

SCACCABAROZZI D, et al. Differential induction of malaria liver pathology in mice infected with *Plasmodium chabaudi* AS or *Plasmodium berghei* NK65. **Malar J** v.17, p.18, 2018.

SCHMIDT KE, KUEPPER JM, SCHUMAK B, ALFERINK J, HOFMANN A, HOWLAND SW, et al. Doxycycline inhibits experimental cerebral malaria by reducing inflammatory immune reactions and tissue-degrading mediators.. **PLoS One**, v. 2, p. 192717, 2018.

SEGUIN, B. M. C. et al. Induction of Nitric Oxide Synthase Protects against Malaria in Mice Exposed to Irradiated *Plasmodium berghei* Infected Mosquitoes: Involvement of Interferon gamma and CD8 + T Cells. v. 180, n. July, p. 4–6, 1994.

SENGUPTA A, SARKAR S, KESWANI T, MUKHERJEE S, GHOSH S, BHATTACHARYYA A. Impact of autophagic regulation on splenic red pulp macrophages during cerebral malarial infection. **Parasitol Int**, p. 18–26, 2019.

SERCUNDES MK, ORTOLAN LS, DEBONE D, SOEIRO-PEREIRA P V., GOMES E, AITKEN EH, et al. Targeting Neutrophils to Prevent Malaria-Associated Acute Lung Injury/Acute Respiratory Distress Syndrome in Mice. **PLoS Pathog.**, v.12, p. 1–24, 2016.

SERCUNDES, M K.; ORTOLAN, S.; JULIO, V S; BELLA, LM.; QUIRINO, T C; DEBONE, D; CARNEIRO-RAMOS, MARCELA S.; CHRISTOFFOLETE, M A.; MARTINS, J O.; D'IMPERIO LIMA,; et al. Lockade of caspase cascade overcomes malaria-associated acute respiratory distress syndrome in mic. **cell death & disease**, v. 13, n. 2, 2022.

SERHAN, C. N. Novel eicosanoid and docosanoid mediators: resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 8, p.115–21, 2005.

SHANLEY TP, VASI N, DENENBERG A. REGULATION OF CHEMOKINE EXPRESSION BY IL-10 IN LUNG INFLAMMATION. **Cytokine** v. 7, p. 1054–64, 2000.

SHARMA S., CHHIBBER S., MOHAN H., SHARMA S. Dietary supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids ameliorates acute pneumonia induced by *Klebsiella pneumoniae* in BALB/c mice, **Can. J. Microbiol.**, V.59, P.503-510, 2013

SILVA GBDJ, PINTO JR, BARROS EJG, FARIAS GMN, DAHER EF. Kidney involvement in malaria: an update. **Rev Inst Trop Sao Paulo**, v. 59, p. 53, 2017.

SILVA, D.A., et al. Atuação do nutricionista na melhora da qualidade de vida de idosos com câncer em cuidados paliativos. **O Mundo da Saúde**, v.33, n.3, p.358-364, 2009.

SILVERTHORN, D. Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada, 7ª Edição, Artmed, 2017.

SIMOPOULOS AP. A importância da proporção de ácidos graxos essenciais ômega-6/ômega-3. **Biomedicina e farmacoterapia**, v. 56, p 365-379, 2002.

SINDEN RE. Sexual development of malarial parasites. **Adv Parasitol**, v. 22, p. 153–216, 1983.

SLAGSVOLD, J. E. *et al.* DHA Alters Expression of Target Proteins of Cancer Therapy in Chemotherapy Resistant SW620 **Colon Cancer Cells**. v. 62, n. 5, p. 611 – 621, 2010.

SOKOL, C.L.; LUSTER, A.D. The chemokine system in innate immunity. **Cold Spring Harb. Perspect Biol**, v. 7, 2015.

SOLDATI, D.; FOTH, B. J.; COWMAN, A. F. Molecular and functional aspects of parasite invasion. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 12, p. 567–574, 2004.

STANISIC, D. I.; GOOD, M. F. Whole organism blood stage vaccines against malaria. **Vaccine**, v. 33, n. 52, p. 7469–7475, 2015.

STEVENSON, L. et al. α 2-Macroglobulin Can Crosslink Multiple *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 (PfEMP1) Molecules and May Facilitate Adhesion of Parasitized Erythrocytes. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 7, p. 1–19, 2015.

STEVENSON, M. M.; RILEY, E. M. Innate immunity to malaria. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 3, p. 169–180, 2004.

STURM A, AMINO R, VAN DE SAND C, REGEN T, RETZLAFF S, RENNENBERG A, KRUEGER A, POLLOK J, MENARD R, HEUSSLER VT. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, v.313, p.1287-1290, 2006.

STURM, A. et al. Manipulation of Host Hepatocytes into Liver Sinusoids. *Science*, v. 1287, n. 2006, 2006. SVS/MS. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiol**, v. 46, p. 43–2015, 2015.

SUKRITI S, TAUSEEF M, YAZBECK P, MEHTA D. Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. **Pulm Cir.**, v. 4, p. 535–51, 2014.

SUN, G. Y. et al. Docosahexaenoic acid (DHA): An essential nutrient and a nutraceutical for brain health and diseases. v. 136, p. 3 – 13, 9 2018.

SZEKANECZ Z, KOCH AE. Macrophages and their products in rheumatoid arthritis. **Curr Opin Rheumatol**, v. 19, p.289–95, 2007.

TACHADO, PETER GEROLD, MALCOLM J. MCCONVILLE, TRACEY BALDWIN, DENIS QUILICI, RALPH T. SCHWARZ, L. S., SOUVENIR D. Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase c-dependent signaling pathway. **The Journal of Immunology**, n. 156, p. 1897–1907, 1995.

TAVARES J.; FORMAGLIO P.; THIBERGE S. Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. **J. Exp. Med.**; v. 210, p. 905-915, 2013.

TAYLOR WRJ, HANSON J, TURNER GDH, WHITE NJ, DONDORP AM. Respiratory Manifestations of Malaria. **Chest**, v.142, p. 492–505, 2012.

TAYLOR, W. R.J., & WHITE, N. Malaria and the lung. **Clinics in Chest Medicine**, v. 2, p. 457–468, 2002

TAZI L, AYALA FJ. Unresolved direction of host transfer of *Plasmodium vivax* v. *P. simium* and *P. malariae* v. *P. brasilianum*. *Infection*, **Genetics and Evolution**,v. 11, p. 209–221, 2011.

TODORIC, J.; LÖFFLER, M.; HUBER, J.; BILBAN, M.; REIMERS, M.; KADL, A.; ET AL. Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids. **Diabetologia**, v. 49, n. 9, p. 2109-2119, set. 2006

TOEWS GB. Cytokines and the lung. **Eur Respir J**, v. 1, p. 3– 17, 2001.

TROTTEIN, F.; TRIGLIA, T.; COWMAN, A. F. Molecular cloning of a gene from *Plasmodium falciparum* that codes for a protein sharing motifs found in adhesive molecules from mammals and Plasmodia. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 74, n. 2, p. 129–141, 1995.

TURCHINI, G. M., B. E. TORSTENSEN, AND W. K. Ng. Fish oil replacement in finfish nutrition. **Reviews in Aquaculture**, v. 1, p.10–57, 2009.

URQUHART AD. Putative pathophysiological interactions of cytokines and phagocytic cells in severe human falciparum malaria. **Clin Infect Dis**, v. p. 19- 131, 1994.

VAN DEN STEEN PE, DEROST K, DECKERS J, VAN HERCK E, STRUYF S, OPDENAKKER G. Pathogenesis of malaria-associated acute respiratory distress syndrome. **Trends in parasitology**. v. 29, p. 346–58, 2003.

VANDERMOSTEN L, PHAM TT, POSSEMIERS H, KNOOPS S, VAN HERCK E, DECKERS J, et al. Experimental malaria-associated acute respiratory distress syndrome is dependent on the parasite-host combination and coincides with normocyte invasion. **Malar J**, v. 1, p. 1–17, 2018.

VAROL C, MILDNER A, JUNG S. Macrophages: Development and Tissue Specialization. **Annu Rev Immunol**, v.13, p.643–75, 2015.

WASSMER, S. C.; GRAU, G. E. R. Severe malaria: What's new on the pathogenesis front? **International Journal for Parasitology**, n. September, 2016.

WASSMER, S. C.; TAYLOR, T.; ALEXANDER, C. Europe PMC Funders Group Platelet-induced clumping of *Plasmodium falciparum* -infected erythrocytes from Malawian patients with cerebral malaria - possible modulation in vivo by thrombocytopenia. v. 197, n. 1, p. 72–78, 2008.

WEISS G.E.; GILSON P.R.; TAECHALERTPAISARN T.; et al. Revealing the sequence and resulting cellular morphology of receptor-ligand interactions during *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. **PLoS Pathog.**, v. 11, 2015.

WEISS, G. E; TRAORE, B.; KAYENTAO, K.; ONGOIBA ,A.; DOUMBO, S.; DOUMTABE, D.; KONE, Y.; DIA, S.; GUINDO, A.; TRAORE, A.; HUANG ,C.Y.; MIURA, K.; MIRCETIC, M.; LI, S.; BAUGHMAN, A.; NARUM, D.L.; MILLER, L.H.; DOUMBO, O.K.; PIERCE, S.K.; CROMPTON,P.D. 2010.The *Plasmodium falciparum*-specific human memory B cell compartment expands gradually with repeated malaria infections. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 5, p. 1000912 - 1000912, 2010.

WHITE NJ. Manson's Tropical Diseases. **Elsevier Science**, v.21, p.1205-1295, 2003.

WIKTOROWSKA-OWCZAREK, A.; BEREZINSKA, M.; NOWAK, J.Z. PUFAs: Structures, Metabolism and Functions. **Adv. Clin. Exp. Med.**, v. 24, p. 931–941, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Database on anemia 2006. **World Health**, p. 75-299, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria Report 2019. **World Health**, p. 75-299, 2021.

XIYUE HE; JUAN YAN; XIAOTONG ZHU; QINGHUI WANG; WEI PANG; ZANMEI QI; MEILIAN WANG; ENJIE LUO, DANIEL M. PARKER; MARGHERITA T. CANTORNA LIWANG CUI; YAMING CAO. Vitamin D Inhibits the Occurrence of Experimental Cerebral Malaria in Mice by Suppressing the Host Inflammatory Response. Research article|, 2014.

YASSINE, H. N. et al. Association of Docosahexaenoic Acid Supplementation With Alzheimer Disease Stage in Apolipoprotein E ϵ 4 Carriers: A Review. v. 74, n. 3, p. 339 – 347, 3 2017.

ZÁRATE, R. et al. Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. v. 6, n. 1, p. 1 – 19, 7 2017.

ANEXO 1: Aprovação pelo CEUA-UFJF



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada " **Malária grave experimental: investigando os mecanismos protetores associados ao uso profilático do ômega 3/DHA e de um novo sal aminoquinolínico**", registrada com o nº 006/2022, sob a responsabilidade de Kézia Katiani Gorza Scopel e Bárbara AlbuquerqueCarpinter, Jessica Corrêa Bezerra Bellei e Carolina David Vieira, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - Concea, e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UFJF) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA-MG, em reunião de 07/06/2022.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/08/2022 a 31/07/2025
Médico Veterinário responsável	Adolfo Firmino da Silva Neto CRM 5486
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57BL/6
Nº de animais	150
Peso/Idade	19g - 6 a 8 semanas
Sexo	Fêmea
Procedência dos animais	Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da UFJF
Local de manutenção dos animais	Sala de manutenção de animais de experimentação do Laboratório de Parasitologia, ICB-UFJF.

ANEXO 2: Tabela utilizada para realização das avaliações clínicas dos animais após infecção

DATA __/__/__ dpi: __	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
Coordenação										
Marcha										
Balança / Equilíbrio										
Comportamento exploratório										
Desempenho Motor										
Força no Tônus										
Posição do corpo										
Força nos membros										
Reflexo e autopreservação										
Fuga ao toque										
Reflexo do pavilhão auricular										
Reflexo plantar										
Agressão										
Higiene										
<u>Grooming</u>										
SOMATÓRIO										