

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Ana Carolina Fonseca da Silva

**O IMPACTO DE DISTINTAS CEPAS DE *Plasmodium berghei* NA RESPOSTA DE
MACRÓFAGOS PERITONEAIS PRÉ-TRATADOS COM ÔMEGA-3 RICO EM DHA**

Juiz de Fora
2026

Ana Carolina Fonseca da Silva

**O IMPACTO DE DISTINTAS CEPAS DE *Plasmodium berghei* NA RESPOSTA DE
MACRÓFAGOS PERITONEAIS PRÉ-TRATADOS COM ÔMEGA-3 RICO EM DHA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à
obtenção do grau de bacharel em Ciências
Biológicas.

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

Colaboração: Dr.^a Juciane Maria de Andrade e Castro

Juiz de Fora
2026

Ana Carolina Fonseca da Silva

**O IMPACTO DE DISTINTAS CEPAS DE *Plasmodium berghei* NA RESPOSTA DE
MACRÓFAGOS PERITONEAIS PRÉ-TRATADOS COM ÔMEGA-3 RICO EM DHA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em 17 de julho de 2026.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Kézia Katiani Gorza Scopel - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof.^a Dr.^a Patrícia Resende Alô Nagib
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr.^a Jéssica Corrêa Bezerra Bellei
Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

A Deus, que, mesmo nos momentos mais difíceis desta jornada, iluminou meu caminho e me conduziu até este momento.

Aos meus pais, Elaine e Alexsandro. Sem vocês, nada disso seria possível. Obrigada por todo o apoio que me deram ao longo dos meus 22 anos. À minha mãe, obrigada pelas ligações diárias, nem mesmo 500 km foram capazes de nos distanciar. Ouvir sua voz sempre me trouxe calma e resiliência. Ao meu pai, obrigada pelos conselhos e por sempre se preocupar com o meu bem-estar. “Você está gostando, filha? É isso que importa”. Estas palavras, que carreguei comigo, me deram forças para persistir.

Aos meus avós, Carlos e Tataia, Vera e José (*in memoriam*), que, com todo amor do mundo, me ajudaram a me tornar a pessoa que sou hoje. Sou muito grata pelo privilégio de conhecê-los e conviver com eles. Obrigada por todas as orações.

Às minhas irmãs, Yasmin e Laís, que me inspiram a ser exemplo. Tenho certeza de que podem e vão chegar aonde quiserem. Estarei sempre aqui, torcendo por vocês.

Aos demais familiares, que sempre me apoiaram e incentivaram, em especial Cristiane, Ronaldo, Rafael, Mônica e Karla.

Às minhas companheiras de vida, que me conhecem desde os três anos de idade e acompanharam meu crescimento: Ana Laura, Anne, Lícia, Lavínia e Maria Fernanda.

Aos meus amigos do curso de Ciências Biológicas. Sem vocês, não teria sido fácil enfrentar todos esses semestres. Em especial, Maria Clara, Gabriel, Letícia, Ana Alice, Giovana e Gabriela.

Aos moradores do 502 e do 202, que fizeram com que eu me sentisse em casa, mesmo estando longe dela nos últimos quatro anos: Júlia, Larissa, Sara, Anna Eloísa, Camila e Luís Eduardo.

À minha orientadora, Kézia, por ter me dado a oportunidade de estagiar e aprender ao seu lado, por confiar em mim e por me apoiar no desenvolvimento deste trabalho. Sua orientação foi essencial para a minha formação acadêmica e profissional.

À professora Dr.^a Juciane Maria de Andrade e Castro, por ter abraçado a proposta deste projeto juntamente com a Kézia e comigo, e por todo auxílio nas análises imunológicas.

À professora Dr.^a Elaine Soares Coimbra, pela colaboração e fornecimento de materiais necessários para a realização dos experimentos.

Ao Núcleo de Pesquisas em Parasitologia, em especial à Fernanda, à Ludmila e ao José, que me acolheram desde o meu primeiro dia na iniciação científica e me ensinaram tanto. Espero ter a oportunidade de dividir a bancada com vocês novamente.

Ao Laboratório Integrado de Pesquisa (LIP) e Laboratório Avançado de Zoologia (LAZ), por disponibilizarem os equipamentos necessários para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional por meio de projetos de extensão e iniciação científica. De certa forma, cada sorriso e cada lágrima tornaram essa trajetória ainda mais especial e moldaram a aluna que teve o campus como sua segunda casa por tantos anos.

E, por fim, agradeço às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo apoio que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.

RESUMO

A malária permanece como um importante problema de saúde pública mundial, sendo caracterizada por uma resposta inflamatória intensa que, embora essencial para o controle da infecção, também contribui para o desenvolvimento das formas graves da doença. Nesse contexto, compostos com propriedades imunomoduladoras, como o ácido docosahexaenoico (DHA), têm sido investigados como estratégias terapêuticas adjuvantes. Estudos prévios do nosso grupo demonstraram que a suplementação com ômega-3 rico em DHA atenua os danos cerebrais e pulmonares induzidos pela infecção por *Plasmodium berghei* ANKA (PbA), porém não exerce o mesmo efeito na infecção por *Plasmodium berghei* NK65 (PbN). Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o impacto das cepas PbA e PbN na modulação da resposta funcional de macrófagos peritoneais previamente tratados com ômega-3 rico em DHA. Macrófagos peritoneais, obtidos de camundongos BALB/c, foram pré-tratados com diferentes concentrações de DHA e posteriormente incubados com hemácias infectadas por PbA ou PbN durante 6 e 12 horas. Foram avaliadas a produção das citocinas IFN- γ , IL-6, TNF- α e IL-10, de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), a formação de corpúsculos lipídicos e a capacidade fagocítica dos macrófagos. Os resultados demonstraram que o pré-tratamento com ômega-3 rico em DHA não promoveu alterações significativas na produção de citocinas, espécies reativas de nitrogênio e oxigênio ou na formação de corpúsculos lipídicos após a incubação com hemácias infectadas por PbA e PbN. Entretanto, observou-se aumento da capacidade fagocítica dos macrófagos tratados, principalmente nas maiores concentrações de DHA. Além disso, foram identificadas diferenças na resposta funcional dos macrófagos frente às duas cepas de *P. berghei*, sugerindo que características inerentes ao parasito influenciam a resposta ao tratamento. Em conjunto, os resultados indicam que o principal efeito direto do ômega-3 rico em DHA sobre os macrófagos está relacionado ao aumento da capacidade fagocítica, enquanto seus efeitos anti-inflamatórios observados em modelos experimentais *in vivo* provavelmente dependem da interação entre diferentes populações celulares, mediadores inflamatórios e do microambiente tecidual.

Palavras-chave: malária; *Plasmodium berghei*; macrófagos; ácido docosahexaenoico; ômega-3; imunomodulação.

ABSTRACT

Malaria remains a major global public health concern and is characterized by an intense inflammatory response that, although essential for controlling infection, also contributes to the development of severe disease. In this context, compounds with immunomodulatory properties, such as docosahexaenoic acid (DHA), have been investigated as potential adjuvant therapeutic strategies. Previous studies conducted by our research group demonstrated that supplementation with DHA-rich omega-3 attenuates brain and lung damage induced by *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) infection but does not exert the same effect during *Plasmodium berghei* NK65 (PbN) infection. Therefore, the present study aimed to evaluate the impact of the PbA and PbN strains on the modulation of the functional response of peritoneal macrophages previously treated with DHA-rich omega-3. Peritoneal macrophages obtained from BALB/c mice were pretreated with different DHA concentrations and subsequently incubated with erythrocytes infected with PbA or PbN for 6 and 12 hours. The production of the cytokines IFN- γ , IL-6, TNF- α , and IL-10, nitric oxide (NO), hydrogen peroxide (H₂O₂), lipid body formation, and macrophage phagocytic capacity were evaluated. The results demonstrated that pretreatment with DHA-rich omega-3 did not significantly alter the production of cytokines, reactive nitrogen and oxygen species, or lipid body formation following incubation with PbA or PbN infected erythrocytes. However, an increase in the phagocytic capacity of treated macrophages was observed, particularly at the highest DHA concentrations. Furthermore, differences in the functional response of macrophages to the two *P. berghei* strains were identified, suggesting that parasite-specific characteristics influence the response to treatment. Overall, the results indicate that the main direct effect of DHA-rich omega-3 on macrophages is associated with enhanced phagocytic capacity, whereas its anti-inflammatory effects observed in experimental *in vivo* models are likely dependent on the interaction among different cell populations, inflammatory mediators, and the tissue microenvironment.

Keywords: malaria; *Plasmodium berghei*; macrophages; docosahexaenoic acid; omega-3; immunomodulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Proporção da população global infectada com malária por ano (2023)	11
Figura 2 - Mapa do risco por município de infecção de malária no Brasil	12
Figura 3 - Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i>	13
Figura 4 - Delineamento experimental	21
Figura 5 - Produção de IFN- γ por macrófagos peritoneais tratados com ômega-3 rico em DHA e incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN	28
Figura 6 - Produção de IL-6 por macrófagos peritoneais tratados com ômega-3 rico em DHA e incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN	29
Figura 7 - Produção de TNF- α por macrófagos peritoneais tratados com ômega-3 rico em DHA e incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN	30
Figura 8 - Produção de IL-10 por macrófagos peritoneais tratados com ômega-3 rico em DHA e incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN	31
Figura 9 - Produção de NO por macrófagos peritoneais tratados com ômega-3 rico em DHA e incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN	33
Figura 10 - Produção de H ₂ O ₂ por macrófagos peritoneais tratados com ômega-3 rico em DHA e incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN	34
Figura 11 - Formação de corpúsculos lipídicos por macrófagos peritoneais tratados com ômega-3 rico em DHA e incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN	35
Figura 12 - Capacidade fagocítica por macrófagos peritoneais tratados com ômega-3 rico em DHA e incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN	36
Figura 13 - Padrão de resposta observado para os macrófagos tratados com ômega-3 rico em DHA e incubado com hemácias infectadas de PbA e PbN	44

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ALA	Ácido α -linolênico
CpG	Citosina-fosfato-Guanina
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos
DHA	Ácido docosaheptaenoico
GPI	Glicofosfatidilinositol
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HRP	Peroxidase de raiz-forte
Hz	Hemozoína
IFN- γ	Interferon gama
IL-1 β	Interleucina - 1 beta
IL-6	Interleucina - 6
IL-10	Interleucina - 10
M1	Macrófagos de fenótipo M1
M2	Macrófagos de fenótipo M2
MIF	Média da intensidade de fluorescência
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NI	Não infectado
NLRP3	Receptor da família NLR contendo domínio pirina 3
NO	Óxido nítrico
NT	Sem tratamento
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PbA	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA
PbN	<i>Plasmodium berghei</i> NK65
PfEMP1	Proteína 1 da membrana eritrocitária de <i>Plasmodium falciparum</i>
PPAR- γ	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
TLRs	Receptores do tipo Toll
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	MALÁRIA	11
1.2	RESPOSTA IMUNE À INFECÇÃO POR <i>PLASMODIUM</i>	14
1.3	PAPEL DOS MACRÓFAGOS NA RESPOSTA IMUNE À MALÁRIA	15
1.4	ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO (DHA) E MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA	17
2	HIPÓTESE	19
3	OBJETIVOS	20
3.1	OBJETIVO GERAL	20
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4	METODOLOGIA	21
4.1	ANIMAIS	21
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	21
4.3	OBTENÇÃO DE HEMÁCIAS PARASITADAS (iRBCs)	22
4.4	OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS	23
4.5	PLAQUEAMENTO DOS MACRÓFAGOS E TRATAMENTO COM ÔMEGA-3 RICO EM DHA	23
4.6	INCUBAÇÃO DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS COM HEMÁCIAS INFECTADAS	24
4.7	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA FUNCIONAL DOS MACRÓFAGOS	24
4.7.1	Coleta do sobrenadante	24
4.7.2	Dosagem de citocinas (IFN- γ , IL-6, TNF- α e IL-10)	24
4.7.3	Determinação da produção de óxido nítrico (NO)	25
4.7.4	Determinação da produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	26
4.7.5	Quantificação de corpúsculos lipídicos	26
4.7.6	Quantificação da fagocitose	26
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
5	RESULTADOS	28
6	DISCUSSÃO	38
7	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS.....	46

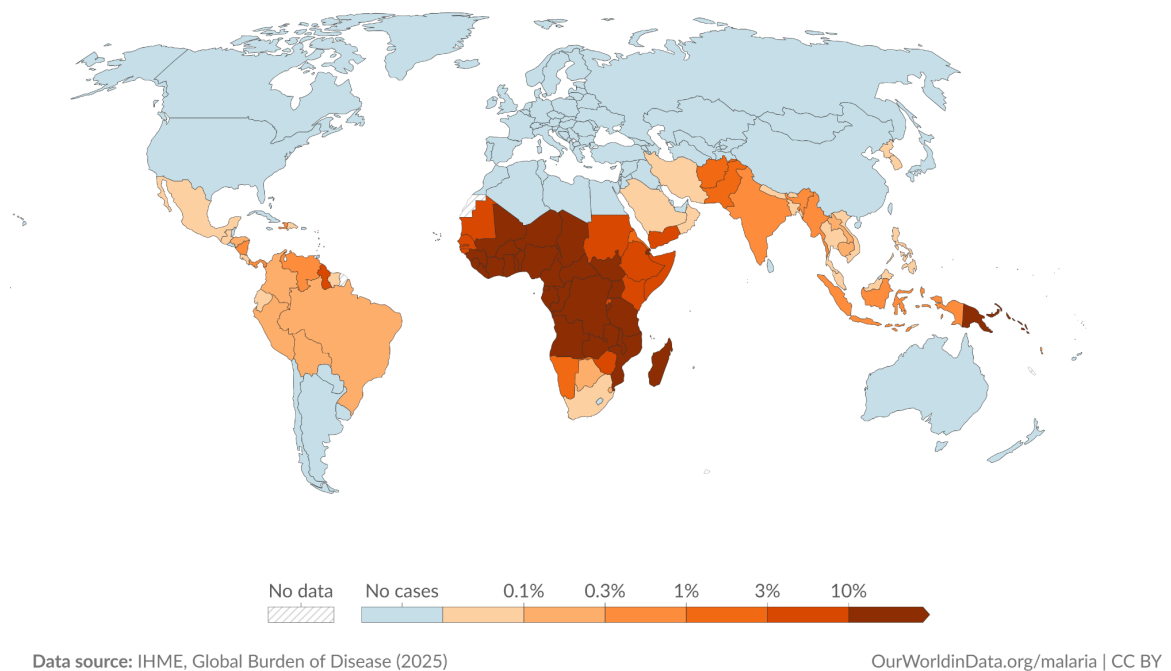
1 INTRODUÇÃO

1.1 MALÁRIA

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários parasitos do gênero *Plasmodium*, e ainda é considerada um grave problema de saúde pública. Sua principal forma de transmissão aos seres humanos, se dá através da picada de fêmeas infectadas dos mosquitos do gênero *Anopheles* (Mito; Galhardi; Amarante, 2012). Atualmente, sete espécies são reconhecidas por causar malária nos seres humanos, são elas, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium simium* e *Plasmodium cynomolgi*. (Pratt-Riccio *et al.*, 2021).

Do ponto de vista epidemiológico, a malária é uma doença de caráter endêmico em regiões tropicais e subtropicais do globo, onde as condições climáticas de calor e umidade favorecem a proliferação do vetor (Pinheiro *et al.*, 2024). No cenário mundial, o continente africano concentra a maior carga da doença, sendo *P. falciparum* a espécie mais prevalente e associada às maiores taxas de letalidade. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam que, no ano de 2024, aproximadamente 282 milhões de pessoas foram acometidas pela doença, resultando em cerca de 610 mil óbitos (WHO, 2025) (Figura 1).

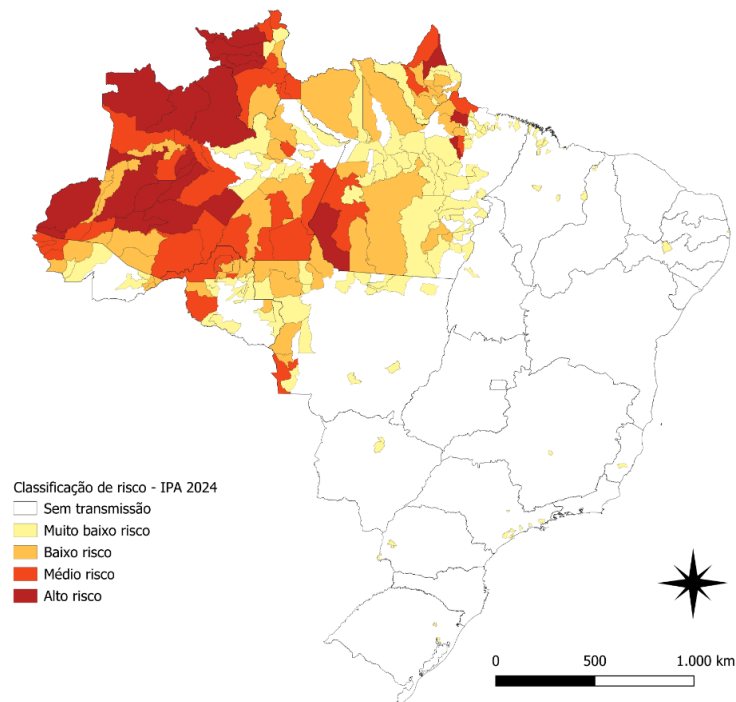
Figura 1 - Proporção da população global infectada com malária por ano (2023)



Fonte: *Our World in Data* (2025).

No Brasil, a região Amazônica concentra a maioria dos casos de malária. Porém, na região extra-amazônica, apesar das poucas notificações, a doença não pode ser negligenciada, pois a letalidade nesta região é maior que na região amazônica (Brasil, 2025b). Entre janeiro e março de 2025 foram registrados 25.473 casos da doença, dos quais resultaram 43 óbitos (Brasil, 2025a) (Figura 2).

Figura 2 - Mapa do risco por município de infecção de malária no Brasil



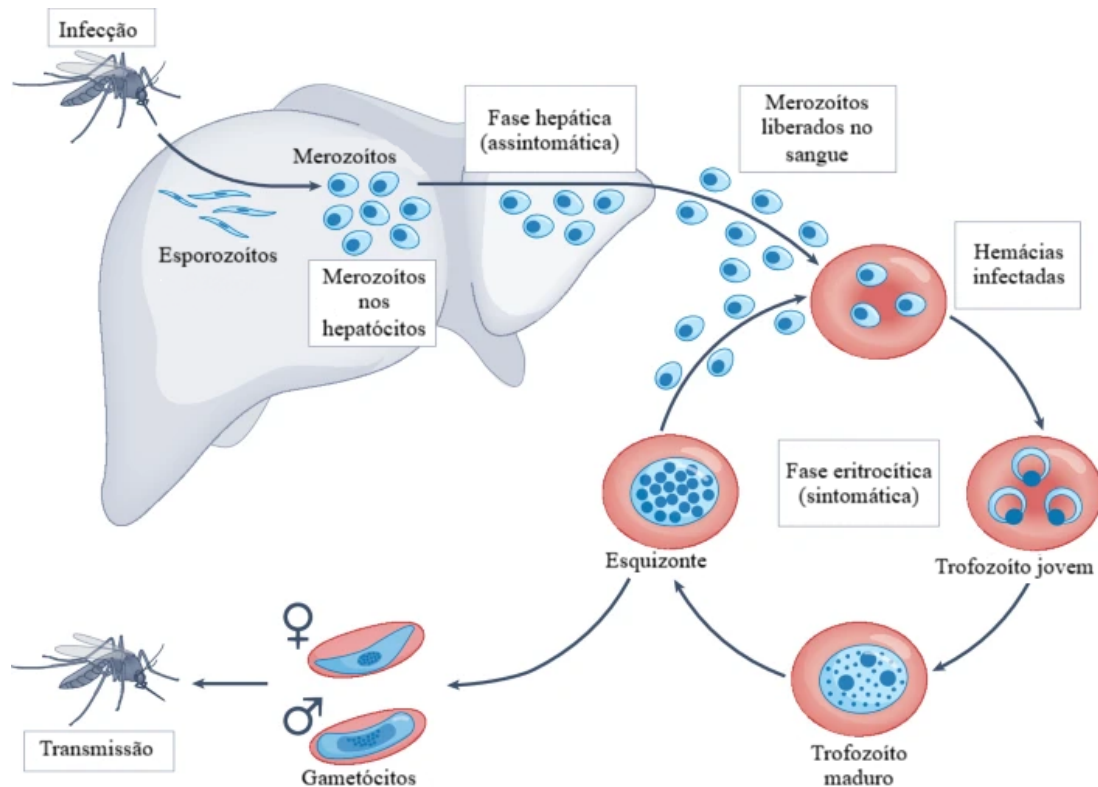
Classificação da Incidência Parasitária Anual (IPA): Sem transmissão - 0 casos autóctones; Muito baixo risco - IPA <1 caso/1.000 habitantes; Baixo risco - IPA <10 casos/1.000 habitantes; Médio risco - IPA <50 casos/1.000 habitantes; Alto risco - IPA ≥50 casos/1.000 habitantes.

Fonte: Sivep-Malária e Sinan/SVSA/MS e E-SUS-VS, atualizado em 02/09/2025.

O sucesso evolutivo do *Plasmodium* baseia-se em seu ciclo de vida heteroxeno, que exige dois hospedeiros para ser concluído: o mosquito *Anopheles* e o vertebrado (Fernández, 2004). O ciclo se inicia quando o vetor inocula esporozoítos na derme do hospedeiro durante o repasto sanguíneo. Após alcançar a circulação sistêmica, essas formas infectantes migram rapidamente para o fígado, onde invadem os hepatócitos, dando início a fase hepática (Amino, 2006). No interior destas células, os esporozoítos se multiplicam, transformando-se em esquizontes teciduais que, ao sofrerem lise, liberam milhares de merozoítos na corrente sanguínea (Bano *et al.*, 2007). Na fase eritrocítica, os merozoítos invadem os eritrócitos e dão início a novos ciclos de multiplicação assexuada, passando pelos estágios evolutivos de trofozoítos e esquizontes maduros. A ruptura síncrona das hemácias libera novos merozoítos e subprodutos metabólicos na circulação que causam os sintomas iniciais e característicos da

doença. Por fim, uma parcela dos parasitos diferencia-se em gametócitos (formas sexuais) que, ao serem ingeridos por um novo vetor, dão continuidade ao ciclo biológico após realizarem a esporogonia no intestino do inseto (Castro; Rodríguez, 2009) (Figura 3).

Figura 3 - Ciclo de vida do *Plasmodium*



Fonte: Adaptado de Boyle; Engwerda; Jagannathan, 2024. Traduzido pela autora.

As manifestações clínicas clássicas da malária surgem durante a fase eritrocítica do ciclo evolutivo, destacando-se a febre, os calafrios e a cefaleia. Caso não seja tratada a tempo, a infecção pode evoluir para as chamadas formas graves da doença, causadas principalmente por *P. falciparum*. Esse agravamento decorre de fenômenos como a citoaderência e o sequestro capilar em órgãos vitais. O processo de citoaderência é caracterizado pela expressão da proteína PfEMP-1 na superfície das hemácias infectadas, o que faz com que esses eritrócitos se liguem ao endotélio da microvasculatura (Milner, 2018). Como consequência, ocorre a formação de microtrombos que obstruem o *lúmen* vascular e impedem o livre fluxo sanguíneo, resultando em hipóxia e grave dano tecidual (Dumbo *et al.*, 2009). Dentre as principais complicações sistêmicas desse processo, estão incluídas a malária cerebral (Lacerda-Queiroz; Teixeira; Teixeira, 2008), a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) (Quirino, 2019) e a malária placentária, que compromete diretamente a saúde

materno-fetal (Rogerson *et al.*, 2007). Devido à maior vulnerabilidade imunológica, as mulheres primigestas e as crianças menores de cinco anos constituem os principais grupos de risco para o desenvolvimento dessas apresentações graves (WHO, 2025).

O controle e a erradicação da malária enfrentam obstáculos complexos. No âmbito biológico, o parasito apresenta mecanismos sofisticados de evasão imunológica, o que dificulta o desenvolvimento de vacinas com elevada eficácia. No campo farmacológico, o surgimento e a disseminação de cepas de *Plasmodium* resistentes aos antimaláricos convencionais comprometem a eficácia das terapias de primeira linha. Além disso, o controle do vetor é dificultado pela crescente resistência dos mosquitos aos inseticidas químicos empregados em intervenções vetoriais, como a borrifação residual intradomiciliar e o uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas (Charavanamuttu *et al.*, 2026).

Diante das limitações éticas e metodológicas de se investigar os mecanismos patogênicos diretamente em seres humanos, o uso de modelos experimentais torna-se indispensável. Abordagens *in vitro*, *in silico* e modelos *in vivo* fornecem ferramentas essenciais para mimetizar a complexidade sistêmica da infecção e testar novas intervenções (Ferreira; Hochman; Barbosa, 2005). Em suma, a compreensão detalhada da interação parasito-hospedeiro é fundamental para elucidar os processos de patogênese e promover o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e profiláticas eficazes (Neto *et al.*, 2025).

1.2 RESPOSTA IMUNE À INFECÇÃO POR *PLASMODIUM*

A resposta imune desempenha papel fundamental no controle da infecção por *Plasmodium*, atuando no controle da carga parasitária. Entretanto, embora seja essencial para a defesa do hospedeiro, a ativação exacerbada dos mecanismos imunológicos contribui para o desenvolvimento das manifestações clínicas e das formas graves da malária (Gazzinelli *et al.*, 2014; Schofield; Grau, 2005). Nesse contexto, o desfecho da infecção depende do equilíbrio entre a resposta imune inata, responsável pelo reconhecimento inicial do parasito e pela contenção da infecção, e a resposta imune adaptativa, que participa da eliminação do parasito e do desenvolvimento da imunidade adquirida (Schofield; Grau, 2005). Em áreas endêmicas, indivíduos repetidamente expostos ao parasito podem desenvolver imunidade clínica parcial, caracterizada pela redução, mas não completa eliminação, da parasitemia e pela diminuição da intensidade da resposta inflamatória, o que favorece a ocorrência de infecções assintomáticas (Gazzinelli *et al.*, 2014).

A ativação da resposta imune inata inicia-se com o reconhecimento de moléculas conservadas do parasito, denominadas Padrões Moleculares Associados a Patógenos

(PAMPs), por receptores de reconhecimento de padrões (Pattern Recognition Receptors – PRRs) expressos por células da imunidade inata, como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. Além dos PAMPs, a infecção promove lesão celular e tecidual, levando à liberação de Padrões Moleculares Associados ao Dano (Damage-Associated Molecular Patterns – DAMPs), que também são reconhecidos pelos PRRs e contribuem para a amplificação da resposta inflamatória (Medzhitov, 2008).

Entre os principais PAMPs envolvidos na infecção por *Plasmodium* destacam-se as âncoras de glicofosfatidilinositol (GPI), glicolípídios presentes na membrana do parasito e essenciais para sua viabilidade por promoverem a ancoragem de diversas proteínas à sua superfície; o DNA do parasito, rico em motivos CpG não metilados; e a hemozoína (Hz), pigmento cristalino formado durante a degradação da hemoglobina na fase eritrocítica (Abosalif *et al.*, 2025; Gazzinelli *et al.*, 2014). O reconhecimento desses componentes por diferentes PRRs, principalmente pelos receptores do tipo Toll (TLRs), desencadeia vias de sinalização intracelular que culminam na ativação de fatores de transcrição, na produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-1 β e óxido nítrico, promovendo o recrutamento e a ativação de células efetoras da imunidade inata (Abosalif *et al.*, 2025).

Entre essas células, os macrófagos desempenham papel central na resposta contra a infecção por *Plasmodium*, atuando tanto na eliminação direta do parasito quanto na coordenação da resposta inflamatória por meio da fagocitose, da apresentação de antígenos e da produção de mediadores imunológicos (Chua *et al.*, 2013).

1.3 PAPEL DOS MACRÓFAGOS NA RESPOSTA IMUNE À MALÁRIA

Os macrófagos exercem suas funções por meio de diferentes mecanismos efetores que atuam de forma integrada durante a resposta imune ao *Plasmodium*. Além da fagocitose de hemácias parasitadas e merozoítos livres, essas células atuam na apresentação de antígenos aos linfócitos T e na produção de mediadores inflamatórios, desempenhando papel fundamental tanto no controle da parasitemia quanto na coordenação da resposta imune (Chua *et al.*, 2013).

De acordo com os estímulos presentes no microambiente inflamatório, os macrófagos apresentam elevada plasticidade funcional, podendo adquirir diferentes perfis de ativação. Após o reconhecimento de PAMPs e sob a ação de citocinas inflamatórias, esses fagócitos são ativados e passam a produzir citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, mediadores responsáveis por sua elevada capacidade microbicida (Mantovani; Sica; Locati, 2005). Em contrapartida, os macrófagos alternativamente ativados (M2) estão

associados à resolução da inflamação, ao reparo tecidual e à restauração da homeostase (Martinez; Gordon, 2014).

Durante a infecção, a ativação dos macrófagos promove a produção de diversas citocinas que coordenam a resposta inflamatória. Entre as principais destacam-se o TNF- α e a IL-6, essenciais para o recrutamento e a ativação de células efetoras, bem como para o controle da replicação parasitária (Stevenson; Riley, 2004). Entretanto, a produção exacerbada dessas citocinas está associada ao agravamento da resposta inflamatória e ao desenvolvimento de lesões teciduais (Schofield; Grau, 2005). Em contrapartida, citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, exercem papel regulador ao limitar a resposta inflamatória e preservar a integridade dos tecidos, evidenciando que o equilíbrio entre mediadores pró- e anti-inflamatórios é determinante para a evolução da doença (Gazzinelli *et al.*, 2014).

Os macrófagos exercem sua atividade microbicida por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS). Essas moléculas são geradas após a ativação celular e contribuem para a eliminação do parasito por meio da oxidação de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, limitando sua replicação (Percário *et al.*, 2012). Dentre as ROS produzidas, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) destaca-se como um importante mediador da atividade microbicida dos macrófagos, sendo amplamente utilizado como marcador da ativação oxidativa dessas células durante processos infecciosos (Nathan; Cunningham-Bussel, 2013).

A ativação dos macrófagos também está associada a alterações no metabolismo lipídico, destacando-se a formação de corpúsculos lipídicos. Tradicionalmente considerados estruturas de armazenamento de lipídios, essas organelas são atualmente reconhecidas como importantes plataformas metabólicas e inflamatórias, atuando como sítios para a síntese de mediadores lipídicos bioativos, incluindo mediadores pró-inflamatórios, como prostaglandinas e leucotrienos (Bozza; Viola, 2010), bem como mediadores especializados pró-resolutivos, envolvidos na resolução da inflamação (Serhan, 2014). Durante a infecção por *Plasmodium*, a fagocitose de hemácias parasitadas e da hemozoína estimula a biogênese dessas organelas, cujo aumento está relacionado ao estado de ativação dos macrófagos e à intensidade da resposta inflamatória (Melo *et al.*, 2011).

Entretanto, embora esses mecanismos sejam essenciais para o controle da parasitemia, sua ativação exacerbada pode contribuir para o desenvolvimento de estresse oxidativo, alterações metabólicas e intensificação da resposta inflamatória, favorecendo lesões celulares e teciduais (Gazzinelli *et al.*, 2014). Assim, a eficácia da resposta dos macrófagos depende de um equilíbrio entre a eliminação do parasito e a limitação dos danos ao hospedeiro (Schofield;

Grau, 2005). Nesse contexto, estratégias capazes de modular a ativação dos macrófagos e, consequentemente, a produção de citocinas, espécies reativas e mediadores lipídicos, têm despertado interesse como abordagens terapêuticas complementares no controle da malária.

Entre as estratégias investigadas para modular a resposta inflamatória sem comprometer a capacidade microbicida dos macrófagos, destacam-se os ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-3, especialmente o ácido docosahexaenoico (DHA) (Calder, 2015).

1.4 ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO (DHA) E MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

O ácido docosahexaenoico (DHA) é um ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa pertencente à família dos ácidos graxos ômega-3, encontrado principalmente em peixes de águas frias, algas marinhas e seus derivados. Embora possa ser sintetizado a partir do ácido α -linolênico (ALA), essa conversão ocorre de forma limitada no organismo, tornando a alimentação sua principal fonte (Calder, 2016). Além de desempenhar importante papel estrutural na composição das membranas celulares, o DHA participa da regulação de diversos processos fisiológicos, especialmente daqueles relacionados à resposta inflamatória e à homeostase do sistema imunológico (Martin *et al.*, 2006).

Os efeitos imunomoduladores do DHA estão relacionados à sua incorporação aos fosfolipídios das membranas celulares, promovendo alterações na composição lipídica e na organização de microdomínios de membrana, como as balsas lipídicas (*lipid rafts*), fundamentais para a ativação de receptores envolvidos na resposta inflamatória (Calder, 2015). Além disso, o DHA compete com o ácido araquidônico pelos sistemas enzimáticos responsáveis pela síntese de eicosanoides, favorecendo a produção de mediadores lipídicos menos inflamatórios e de mediadores especializados da resolução da inflamação, como resolvinas, protectinas e maresinas (Calder, 2017). Adicionalmente, o DHA pode modular vias de sinalização intracelular, reduzindo a ativação do fator de transcrição nuclear B (NF- κ B) e favorecendo a ativação do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPAR- γ), mecanismos associados à diminuição da expressão de genes pró-inflamatórios (Kong *et al.*, 2010).

Em células da imunidade inata, especialmente nos macrófagos, essas alterações repercutem diretamente sobre diferentes funções efetoras. Estudos demonstram que o DHA é capaz de modular a polarização macrofágica (Calder, 2017), reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, atenuar a geração de espécies reativas de oxigênio, interferir na

ativação do inflamassoma NLRP3 e no o metabolismo lipídico celular (Braz-de-Melo *et al.*, 2019). Em conjunto, esses efeitos contribuem para um perfil funcional menos inflamatório e mais favorável à resolução da resposta imune, preservando mecanismos essenciais de defesa do hospedeiro enquanto limita os danos decorrentes da inflamação exacerbada.

No contexto da malária experimental, estudos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que a suplementação com ômega-3 rico em DHA pode exercer efeitos distintos de acordo com a cepa de *Plasmodium berghei* e com o contexto experimental. Em camundongos infectados com *P. berghei* ANKA, a suplementação foi capaz de reduzir a gravidade da doença, protegendo contra o desenvolvimento da malária cerebral experimental (Carpinter *et al.*, 2024) e atenuando as lesões pulmonares associadas à infecção (David-Vieira *et al.*, 2024). Entretanto, em infecções causadas por *P. berghei* NK65, o ômega-3 rico em DHA não mitigou os danos pulmonares associados à infecção (Pereira *et al.*, 2026). Esses resultados sugerem que os efeitos do DHA não dependem apenas de suas propriedades anti-inflamatórias, mas também da interação desse ácido graxo com mecanismos celulares específicos ativados durante a infecção. Como os estudos realizados até o momento foram conduzidos em modelos *in vivo*, permanece pouco esclarecida a contribuição direta dos macrófagos para os efeitos observados.

Considerando que os macrófagos desempenham papel central no combate a infecção, participando da eliminação de hemácias parasitadas e na regulação da resposta inflamatória, a investigação dos efeitos diretos do DHA sobre essas células pode contribuir para elucidar os mecanismos celulares responsáveis pelas diferenças observadas entre os modelos experimentais. Assim, a utilização de um modelo *in vitro* permite avaliar diretamente como o DHA modula funções efectoras dos macrófagos, eliminando a influência de fatores sistêmicos inerentes aos modelos *in vivo*.

2 HIPÓTESE

As cepas de *Plasmodium berghei* ANKA e NK65 são capazes de modular de forma distinta a resposta funcional de macrófagos peritoneais previamente tratados com ômega-3 rico em DHA.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto das cepas de *Plasmodium berghei* ANKA e NK65 sobre a resposta funcional de macrófagos peritoneais previamente tratados com ômega-3 rico em DHA.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a produção de citocinas (IFN- γ , IL-6, TNF- α e IL-10) por macrófagos peritoneais previamente tratados com ômega-3 rico em DHA e incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN.
- Avaliar a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais previamente tratados com ômega-3 rico em DHA e incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN.
- Avaliar a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por macrófagos peritoneais previamente tratados com ômega-3 rico em DHA e incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN.
- Avaliar a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais previamente tratados com ômega-3 rico em DHA e incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN, por meio da média da intensidade de fluorescência (MIF).
- Avaliar a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais previamente tratados com ômega-3 rico em DHA e incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN.

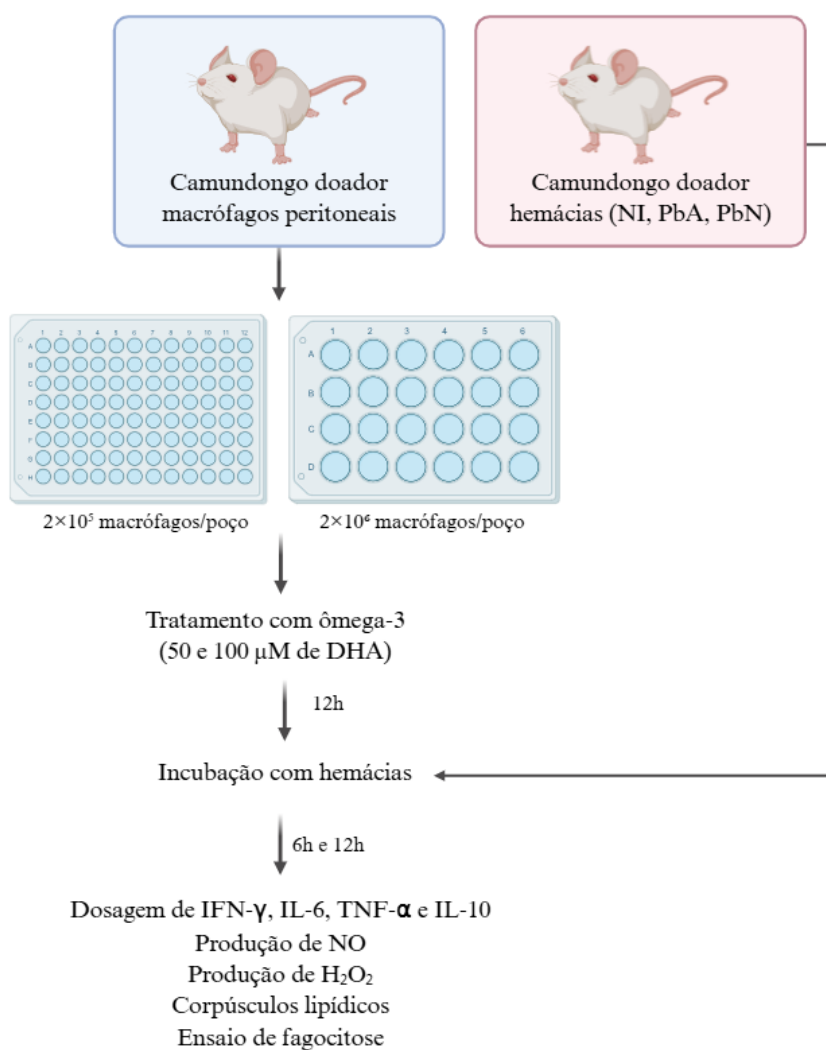
4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

Para este estudo, foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas, com idade entre 6 e 8 semanas, provenientes do Centro de Bioterismo Regional (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Os animais foram mantidos no biotério do Núcleo de Pesquisas em Parasitologia (NUPEP), acondicionados em gaiolas de polipropileno alocadas em estantes ventiladas, sob temperatura controlada e ciclo de 12h claro/12h escuro, com água filtrada e ração (Nuvital®) *ad libitum*, além de monitoramento veterinário diário para verificação das condições de bem-estar. A utilização dos animais foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da instituição (019/2023).

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Figura 4 - Delineamento experimental



Camundongos doadores foram infectados com PbA ou PbN para obtenção de hemácias parasitadas (iRBCs), enquanto outro grupo de camundongos recebeu tioglicolato por via intraperitoneal (i.p.) para recrutamento de macrófagos peritoneais, posteriormente coletados por lavado. Os macrófagos foram plaqueados, e após adesão celular, foram tratados com ômega-3 rico em DHA (50 ou 100 μ M) por 12 horas. Em seguida, as células foram incubadas com hemácias não infectadas (NI) ou hemácias parasitadas por PbA ou PbN. Após 6 e 12 horas de incubação, foram avaliadas a produção de citocinas, NO, H₂O₂, formação de corpúsculos lipídicos e a capacidade fagocítica dos macrófagos.

4.3 OBTENÇÃO DE HEMÁCIAS PARASITADAS (iRBCs)

Para obtenção das iRBCs, dois camundongos foram infectados por via i.p., sendo um com 200 μ L de uma suspensão contendo 5×10^7 iRBCs criopreservadas de PbA e o outro com 200 μ L de uma suspensão contendo 5×10^7 iRBCs criopreservadas de PbN. Além disso, foi utilizado um animal NI para a retirada de hemácias sadias.

Durante o período de infecção, foi realizado o monitoramento da parasitemia sanguínea. Para isso, foi realizada uma incisão, com tesoura cirúrgica, na ponta da cauda dos animais para a obtenção de uma gota de sangue, que foi depositada sobre uma lâmina de vidro e espalhada com o auxílio de uma lâmina extensora para a confecção do esfregaço sanguíneo. Após secagem à temperatura ambiente, os esfregaços foram fixados em metanol e corados com solução de Giemsa (Sigma-Aldrich®) por 20 minutos. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Olympus BX41), utilizando objetiva de imersão (100x). Foram contadas 1.000 hemácias em diferentes campos microscópicos. A porcentagem de parasitemia foi determinada pela razão entre o número de iRBCs e o número total de hemácias. Quando os animais apresentaram parasitemia aproximada de 50%, foram eutanasiados para obtenção das iRBCs.

Para a eutanásia, os animais foram anestesiados via i.p. com 200 μ L de solução anestésica contendo NaCl 0,9%, xilazina (Syntec®) a 2% e quetamina (Syntec®) a 10%. Após a confirmação da anestesia, por meio da ausência de reflexo ao estímulo plantar, foi realizada a exsanguinação com seringa contendo heparina (Cristália®), por punção cardíaca. O sangue coletado foi diluído em 10 mL de meio RPMI completo (meio contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Nova Biotecnologia®) e 1% de solução de antibiótico/antimicótico (Gibco®)) e centrifugado a 1.500 rpm por 10 minutos para obtenção do sedimento de hemácias, que foram posteriormente incubadas com os macrófagos nos ensaios *in vitro*.

4.4 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Para obtenção dos macrófagos peritoneais, três camundongos receberam 2 mL de solução estéril de tioglicolato (Merck®) a 3% via i.p., 72 horas antes da coleta. Após este período, os animais foram submetidos ao mesmo protocolo anestésico descrito no item 4.3. Após a confirmação da anestesia, foi realizada a abertura da cavidade abdominal, seguida de duas lavagens peritoneais consecutivas, cada uma utilizando 5 mL de solução de Hank's (Sigma-Aldrich®) estéril. A suspensão celular obtida foi transferida para tubos cônicos estéreis e centrifugada a 1.500 rpm por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e o sedimento celular ressuspensionado em 10 mL de meio RPMI completo para determinação da concentração celular por meio de contagem em câmara de Neubauer (New Optics®).

4.5 PLAQUEAMENTO DOS MACRÓFAGOS E TRATAMENTO COM ÔMEGA-3 RICO EM DHA

Após a contagem celular em câmara de Neubauer, a suspensão celular foi ajustada para a concentração de 2×10^6 células/mL. Para os ensaios de produção de óxido nítrico, dosagem de citocinas e capacidade fagocítica, os macrófagos foram plaqueados sobre lamínulas de vidro de 13 mm (Olen®), previamente posicionadas no fundo de placas de 24 poços (KASVI®), utilizando 300 μ L de suspensão celular por poço, correspondendo a 6×10^5 células/poço. Para os ensaios de produção de H_2O_2 e quantificação de corpúsculos lipídicos, as células foram distribuídas em placas de 96 poços (Costar®), utilizando 100 μ L de suspensão celular/poço, correspondendo a 2×10^5 células. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C, sob atmosfera contendo 5% de CO_2 , por um período de 2 a 4 horas, para adesão dos macrófagos.

Como tratamento, foi utilizado um suplemento comercial de ômega-3, rico em DHA (Essential Nutrition®), contendo 500 mg de DHA por cápsula. O conteúdo da cápsula foi diluído em etanol absoluto para obtenção de uma solução estoque de 100 mM. A partir dessa solução, foram realizadas diluições em meio RPMI completo para obtenção das concentrações finais de 50 e 100 μ M, mantendo a concentração final de 0,05%, considerada segura para as células (Fletcher *et al.*, 2021).

Os tratamentos foram preparados imediatamente antes do uso e mantidos sob refrigeração e protegidos da luz durante todo o procedimento, a fim de preservar a estabilidade do DHA.

Os macrófagos foram tratados pela adição direta dos tratamentos aos poços, que permaneceram incubados por 12 horas a 37 °C, sob atmosfera contendo 5% de CO₂, antes da incubação com hemácias infectadas.

4.6 INCUBAÇÃO DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS COM HEMÁCIAS INFECTADAS

Após 12 horas de tratamento com ômega-3 rico em DHA, os macrófagos foram incubados com as hemácias parasitadas. Para isso, foram utilizadas iRBCs de PbA e PbN, obtidas a partir do sangue de camundongos previamente infectados, conforme descrito no item 4.3. Como controle, foram utilizadas hemácias provenientes de camundongos não infectados.

Após a centrifugação do sangue, o sobrenadante foi descartado, e o sedimento de hemácias foi ressuspensionado em meio RPMI completo. Em seguida, as hemácias foram quantificadas em câmara de Neubauer e, com base na parasitemia previamente determinada, a suspensão foi ajustada para obtenção da proporção de 30:1 (iRBCs:macrófagos), sendo adicionada aos poços de acordo com o número de macrófagos plaqueados em cada ensaio, correspondendo a $1,8 \times 10^7$ iRBCs/poço nas placas de 24 poços e 6×10^6 iRBCs/poço nas placas de 96 poços.

Após a incubação com as hemácias, as culturas foram mantidas em estufa a 37 °C, sob atmosfera contendo 5% de CO₂, por 6 e 12 horas. Ao final de cada período experimental, foram realizados os ensaios destinados à avaliação da resposta funcional dos macrófagos, conforme descrito nos itens subsequentes.

4.7 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA FUNCIONAL DOS MACRÓFAGOS

4.7.1 Coleta do sobrenadante

Após 6 e 12 horas pós-infecção, foram coletados 200 µL de sobrenadante de cada poço. As amostras foram transferidas para microtubos devidamente identificados e armazenadas a -80°C até a realização das análises de citocinas (IFN-γ, IL-6, TNF-α e IL-10) e de óxido nítrico (NO).

4.7.2 Dosagem de citocinas (IFN-γ, IL-6, TNF-α e IL-10)

A concentração das citocinas pró-inflamatórias IFN-γ, IL-6 e TNF-α, bem como da citocina anti-inflamatória IL-10, foi avaliada nos sobrenadantes das culturas celulares pelo

método de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), utilizando kits OptEIA (BD Biosciences®), conforme as recomendações do fabricante.

Inicialmente, placas de ELISA de meia área (Costar®) foram sensibilizadas com 25 µL por poço de tampão contendo os respectivos anticorpos de captura e incubadas durante a noite a 4 °C. Em seguida, as placas foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem (solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1X contendo 0,05% de Tween 20) e bloqueadas com 50 µL por poço de PBS 1X suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), durante 1 hora, à temperatura ambiente.

Após nova etapa de lavagem, foi preparada a curva padrão de cada citocina por diluição seriada, iniciando na concentração de 2.000 pg/mL. Em seguida, foram adicionados 25 µL dos padrões aos respectivos poços e 25 µL das amostras aos demais poços, seguido de incubação por 2 horas à temperatura ambiente.

Posteriormente, as placas foram novamente lavadas cinco vezes e incubadas com 25 µL por poço da solução de detecção, contendo anticorpo de detecção conjugado à enzima, durante 1 hora à temperatura ambiente. Após nova lavagem, foram adicionados 25 µL da solução substrato tetrametilbenzidina (TMB) (BD Biosciences®), mantendo-se as placas incubadas ao abrigo da luz por 30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 12,5 µL de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1 M por poço. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Agilent BioTek Epoch) a 450 nm. As concentrações das citocinas foram determinadas por meio da curva padrão correspondente a cada citocina e expressas em pg/mL.

4.7.3 Determinação da produção de óxido nítrico (NO)

A produção de óxido nítrico (NO) foi determinada indiretamente pela quantificação de nitrito (NO₂⁻) presente nos sobrenadantes das culturas celulares, utilizando a reação de Griess. Para a análise, foram adicionados 50 µL do sobrenadante e 50 µL do reagente de Griess em placas de 96 poços, na proporção de 1:1. As amostras foram incubadas por 15 minutos, à temperatura ambiente e protegidas da luz. Em seguida, a absorbância foi determinada em espectrofotômetro (Agilent BioTek Epoch) a 540 nm. A concentração de nitrito foi determinada por meio de uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂), preparada por diluições seriadas a partir de uma solução de 200 µM, sendo os resultados expressos em µM.

4.7.4 Determinação da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

A produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelos macrófagos foi determinada pelo método do vermelho de fenol. Após o período experimental de 6 horas de infecção, o sobrenadante foi removido, e as células foram lavadas três vezes com solução estéril de PBS 1X, a fim de remover resíduos de hemácias provenientes da incubação. Em seguida, foram adicionados 100 μ L da solução de vermelho de fenol (Sigma-Aldrich®), preparada a partir de soluções estoque de PBS 10X, Cloreto de cálcio ($CaCl_2$), Cloreto de magnésio ($MgCl_2$), glicose a 1% e vermelho de fenol, acrescida de peroxidase de raiz-forte tipo II (Sigma-Aldrich®) adicionada imediatamente antes do uso. As placas foram incubadas por 1 hora a 37 °C.

Ao término da incubação, a reação foi interrompida pela adição de 10 μ L de hidróxido de sódio (NaOH), e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro (Agilent BioTek Epoch) a 620 nm. A concentração de H_2O_2 foi calculada a partir de um curva padrão preparada com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio (5-40 μ M), sendo os resultados expressos em μ M.

4.7.5 Quantificação de corpúsculos lipídicos

A formação de corpúsculos lipídicos foi avaliada por meio da coloração com Nile Red (Sigma-Aldrich®). Após os períodos de 6 e 12 horas, o sobrenadante foi removido, e as células foram lavadas duas vezes com solução estéril de PBS 1X para remoção de resíduos de hemácias provenientes da incubação. Em seguida, foram adicionados 200 μ L de solução de Nile Red (10 μ g/mL), preparada em PBS 1X, e as placas foram incubadas por 20 minutos a 37 °C, protegidas da luz. Após a incubação, a fluorescência foi determinada em espectrofluorímetro (BioTek Agilent FLx800), utilizando filtros de excitação de 540/35 nm e de emissão de 600/40 nm. Os resultados foram expressos como média da intensidade de fluorescência (MFI).

4.7.6 Quantificação da fagocitose

A capacidade fagocítica dos macrófagos foi avaliada por meio da quantificação da porcentagem de células que fagocitaram iRBCs de PbA e PbN. Após os períodos de 6 e 12 horas, o sobrenadante foi removido, e as células foram lavadas com solução estéril de PBS 1X, fixadas em etanol absoluto e coradas com Giemsa (Sigma-Aldrich®). Em seguida, as

lamínulas foram cuidadosamente removidas dos poços, montadas sobre lâminas de microscopia com a face celular voltada para baixo e fixadas com verniz.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico equipado com câmera digital (Olympus BX51), utilizando objetiva de 40x. Para cada lamínula, foram obtidas imagens de campos aleatórios até a contagem de um total de 100 macrófagos.

A quantificação foi realizada manualmente no software QuPath (versão 0.7.0), determinando-se a porcentagem de macrófagos contendo pelo menos uma iRBC fagocitada. A taxa de fagocitose foi calculada de acordo com a seguinte equação:

Taxa de fagocitose (%) = (número de macrófagos que fagocitaram iRBCs / número total de macrófagos) $\times$ 100.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (versão 8.4.3). Inicialmente, a normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para comparações entre dois grupos, foi utilizado o teste *t* de Student. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Em todos os testes, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

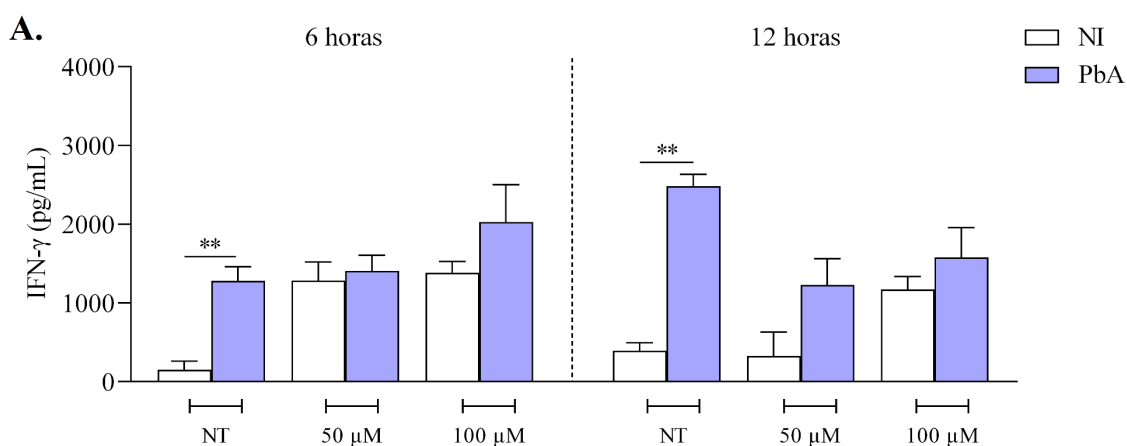
5 RESULTADOS

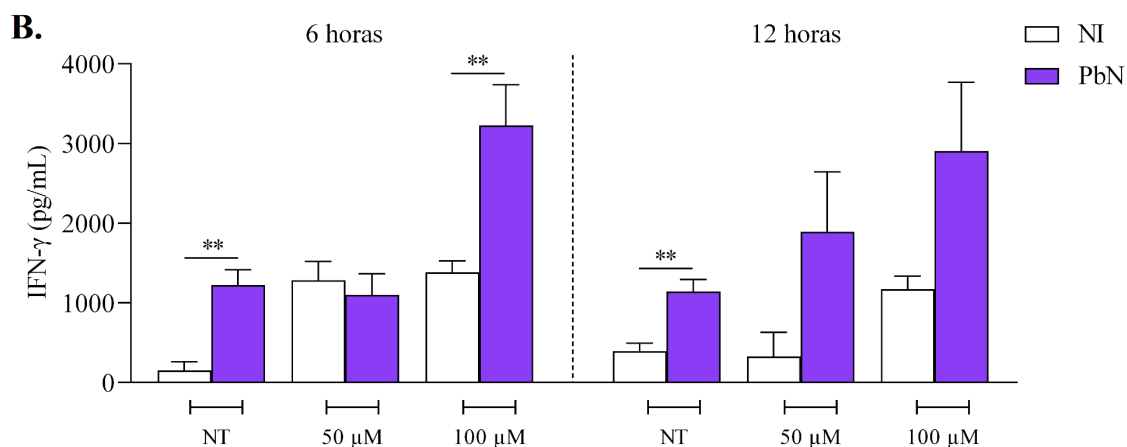
5.1 MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM ÔMEGA-3 RICO EM DHA TÊM A PRODUÇÃO DE IFN- γ , IL-6, TNF- α E IL-10 MODULADA PELA INCUBAÇÃO COM HEMÁCIAS INFECTADAS POR PbA e PbN

A produção de IFN- γ , IL-6, TNF- α e IL-10 por macrófagos peritoneais tratados com ômega-3 rico em DHA e incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN foi avaliada após 6 e 12 horas de incubação. A concentração de cada citocina foi determinada no sobrenadante das culturas celulares por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) (Figuras 5, 6, 7 e 8).

Nos poços incubados com hemácias infectadas por PbA (Figura 5A), observou-se aumento significativo da produção de IFN- γ em relação aos poços NI na condição NT, tanto em 6 quanto em 12 horas. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas nos poços tratados, verificou-se tendência de aumento da produção de IFN- γ na concentração de 100 μ M de DHA após 6h, e tendência de redução dessa citocina nos poços tratados após 12 horas, em comparação ao poços incubados com hemácias infectadas por PbA, na condição NT. Nos poços incubados com hemácias infectadas por PbN (Figura 5B), observou-se aumento significativo da produção de IFN- γ em relação aos poços NI na condição NT, tanto em 6 quanto em 12 horas. Após 6 horas, também foi observado aumento significativo da produção de IFN- γ nos poços tratados com 100 μ M de DHA em comparação ao poços NI. Além disso, observou-se tendência de aumento da produção de IFN- γ nos poços tratados, após 12 horas de incubação.

Figura 5. Produção de IFN- γ por macrófagos peritoneais tratados com ômega-3 rico em DHA e incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN

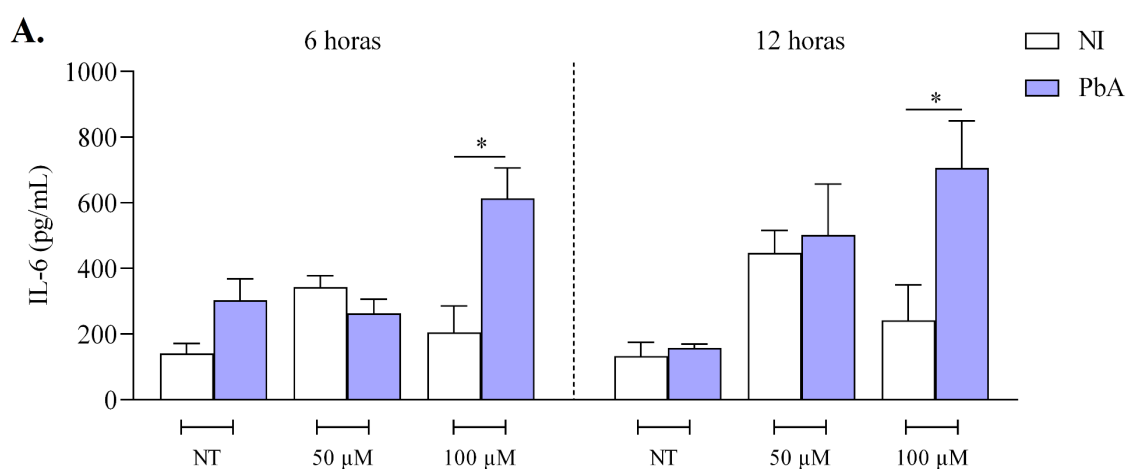


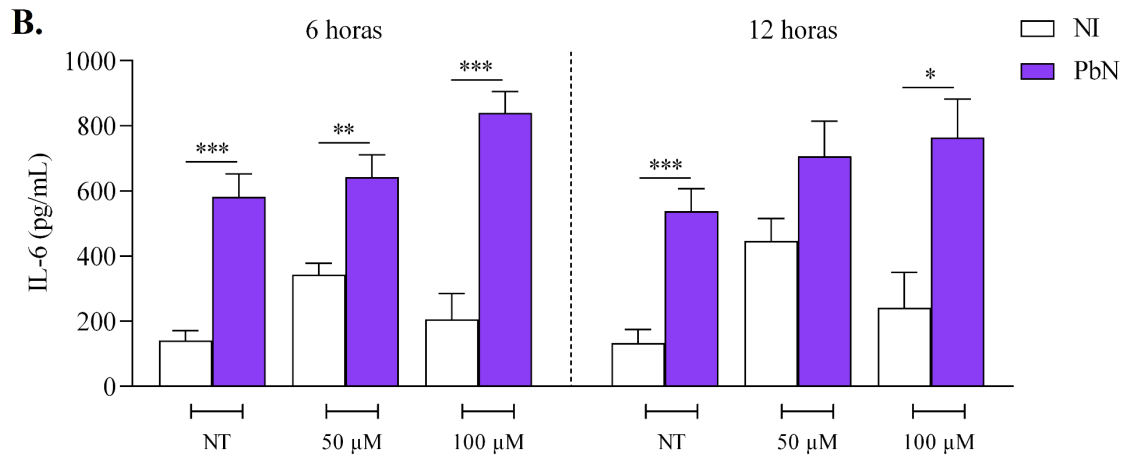


(A) PbA; (B) PbN. Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM. (*) Indica diferença estatística em relação aos poços NI: PbA - NT, 6 h ($p = 0,0016$); NT, 12 h ($p = 0,0079$). PbN - NT, 6 h ($p = 0,0029$); 100 μ M, 6 h ($p = 0,0080$) NT, 12 h ($p = 0,0025$).

Nos poços incubados com hemácias infectadas por PbA (Figura 6A), observou-se aumento significativo da produção de IL-6 em relação aos poços NI tratados com 100 μ M, tanto após 6 quanto após 12 horas. Nos poços incubados com hemácias infectadas por PbN (Figura 6B), observou-se aumento significativo da produção de IL-6 em relação aos poços NI na condição NT, 50 μ M e 100 μ M após 6 horas, e nas condições NT e 100 μ M após 12 horas. Além disso, verificou-se tendência de aumento da produção de IL-6 com o aumento da concentração de DHA, principalmente após 6 horas.

Figura 6. Produção de IL-6 por macrófagos peritoneais tratados com ômega-3 rico em DHA e incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN

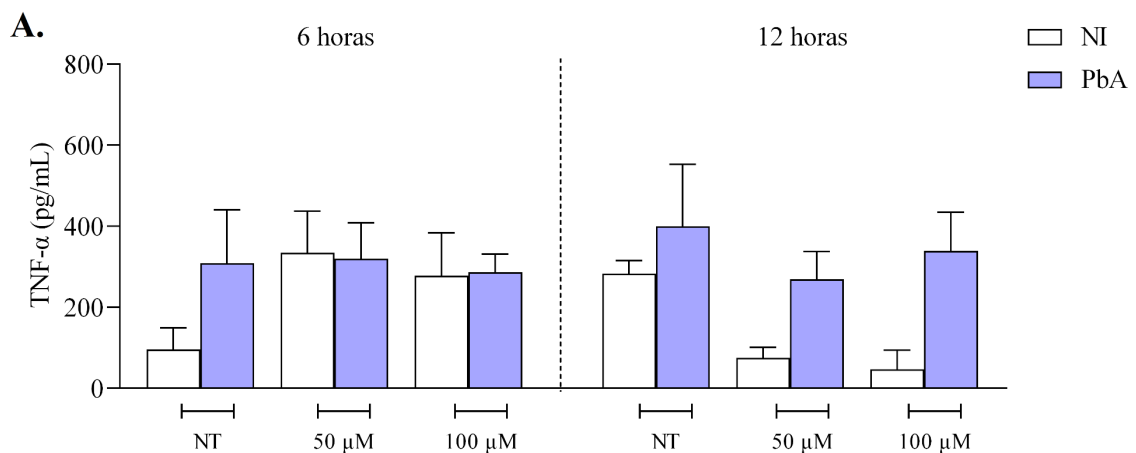


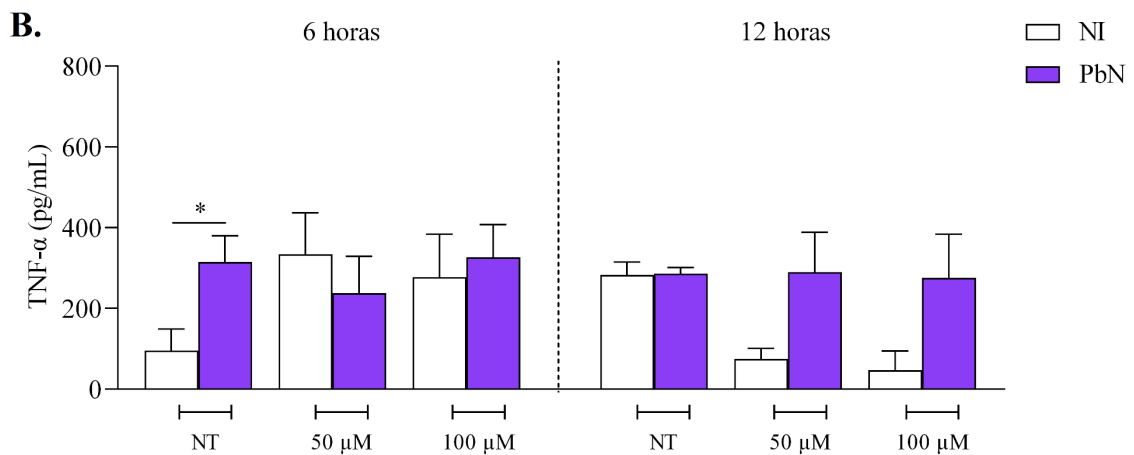


(A) PbA; (B) PbN. Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM. (*) Indica diferença estatística em relação aos poços NI: PbA - 100 μ M, 6 h ($p = 0,0104$); 100 μ M, 12 h ($p = 0,0260$). PbN - NT, 6 h ($p = 0,0005$); 50 μ M, 6 h ($p = 0,0032$); 100 μ M, 6 h ($p = 0,0001$); NT, 12 h ($p = 0,0005$); 100 μ M, 12 h ($p = 0,0105$).

Nos poços incubados com hemácias infectadas por PbA (Figura 7A), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na produção de TNF- α nas condições avaliadas. Em relação aos poços incubados com hemácias infectadas por PbN (Figura 7B), observou-se aumento significativo da produção de TNF- α em relação aos poços NI na condição NT, após 6 horas. Entretanto, após 12 horas, observou-se tendência de aumento da produção de TNF- α nos macrófagos tratados em ambas as concentrações e incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN (Figura 7A e 7B).

Figura 7. Produção de TNF- α por macrófagos peritoneais tratados com ômega-3 rico em DHA e incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN

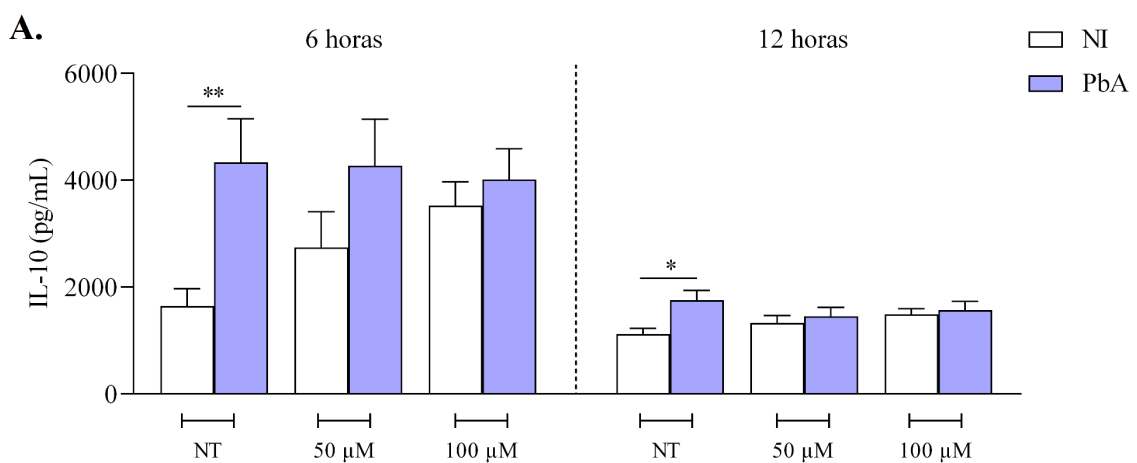


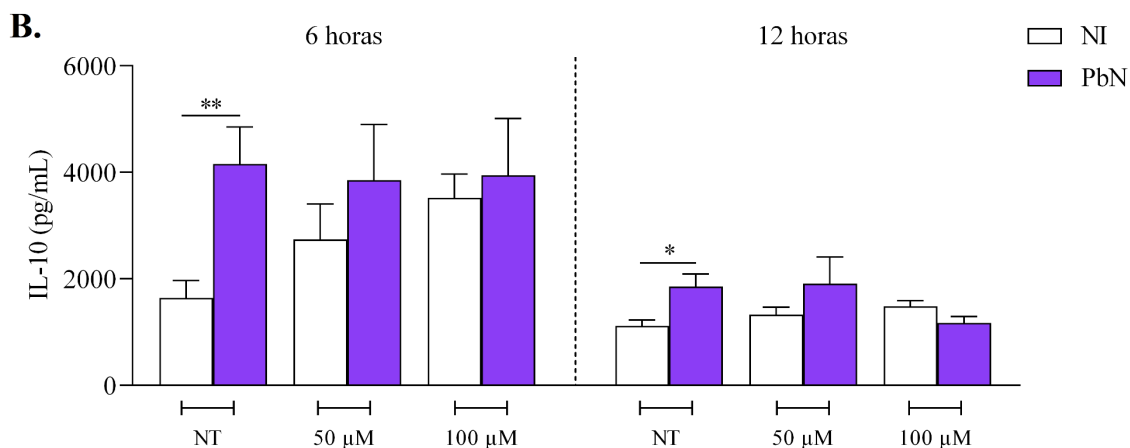


(A) PbA; (B) PbN. Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM. (*) Indica diferença estatística em relação aos poços NI: NT, 6 h ($p = 0,0386$).

Nos macrófagos incubados com hemácias infectadas por PbA (Figura 8A), observou-se aumento significativo da produção de IL-10 em relação aos poços NI na condição NT, tanto após 6 horas quanto após 12 horas. Em relação aos macrófagos incubados com hemácias infectadas por PbN (Figura 8B), observou-se aumento significativo da produção de IL-10 em relação aos poços NI na condição NT, tanto após 6 horas quanto após 12 horas. Além disso, observou-se que, independentemente do grupo avaliado, os níveis de IL-10 após 12 horas de incubação foram inferiores aos observados após 6 horas, evidenciando uma tendência de redução da produção dessa citocina ao longo do tempo (Figura 8A e 8B).

Figura 8. Produção de IL-10 por macrófagos peritoneais tratados com ômega-3 rico em DHA e incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN





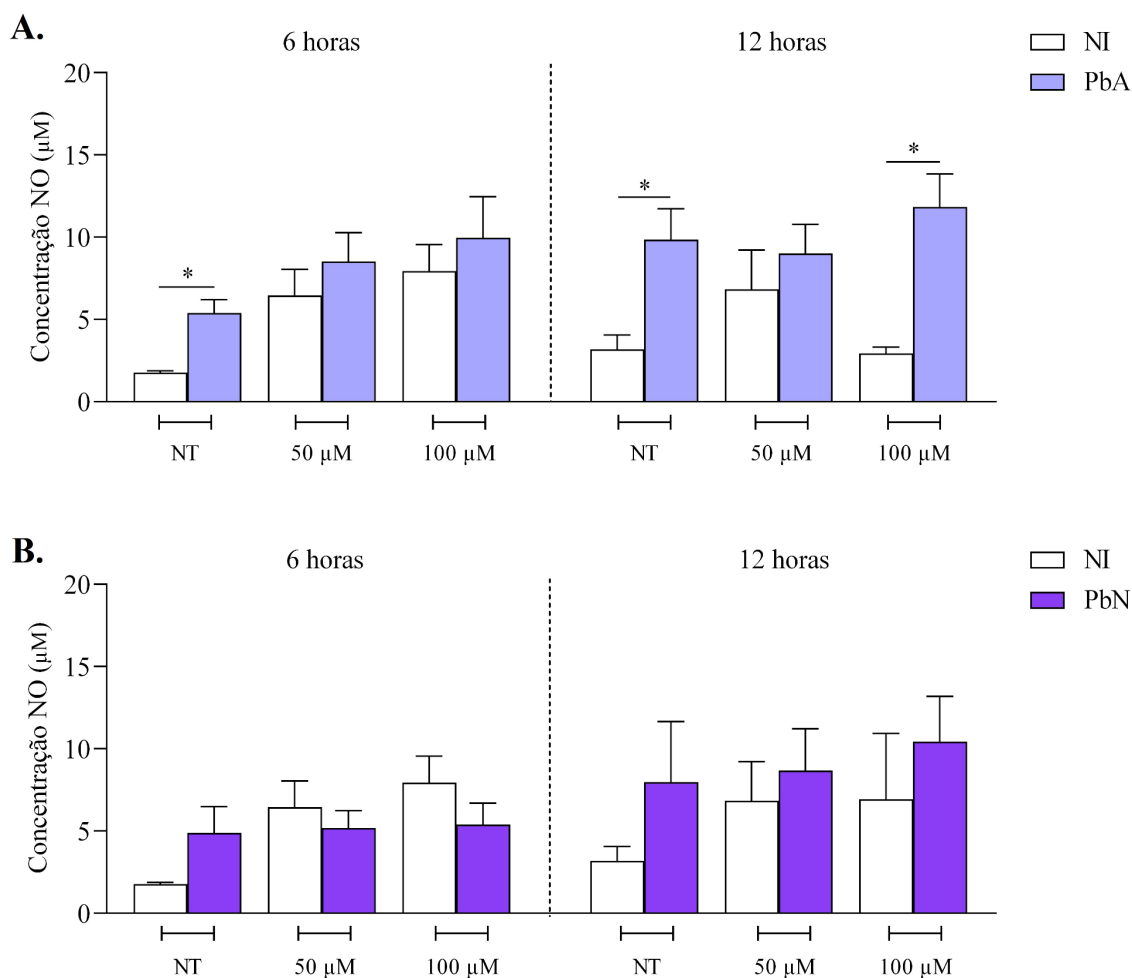
(A) PbA; (B) PbN. Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM. (*) Indica diferença estatística em relação aos poços NI: PbA - NT, 6 h ($p = 0,0099$); NT, 12 h ($p = 0,0120$). PbN - NT, 6 h ($p = 0,0065$); NT, 12 h ($p = 0,0147$).

5.2 MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM ÔMEGA-3 RICO EM DHA TÊM A PRODUÇÃO DE NO MODULADA PELA INCUBAÇÃO COM HEMÁCIAS INFECTADAS POR PbA e PbN

A produção de NO por macrófagos peritoneais tratados com ômega-3 rico em DHA e incubados com hemácias infectadas por PbA ou PbN foi avaliada após 6 e 12 horas de incubação. A concentração de nitrito, como indicador indireto da produção de NO, foi determinada no sobrenadante das culturas celulares por meio da reação de Griess (Figura 9). Nos macrófagos incubados com hemácias infectadas por PbA (Figura 9A), observou-se aumento significativo da produção de NO em relação aos poços NI na condição NT, tanto após 6 quanto após 12 horas. Após 12 horas, também foi observado aumento significativo da produção de NO nos poços tratados com 100 μ M de DHA em comparação aos poços NI.

Em relação aos macrófagos incubados com hemácias infectadas por PbN (Figura 9B), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na produção de NO nas condições avaliadas. Entretanto, observou-se tendência de aumento da produção de NO nos grupos incubados com hemácias infectadas em relação aos poços NI, no tempo de 12 horas (Figura 9B).

Figura 9. Produção de NO por macrófagos peritoneais tratados com ômega-3 rico em DHA e incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN



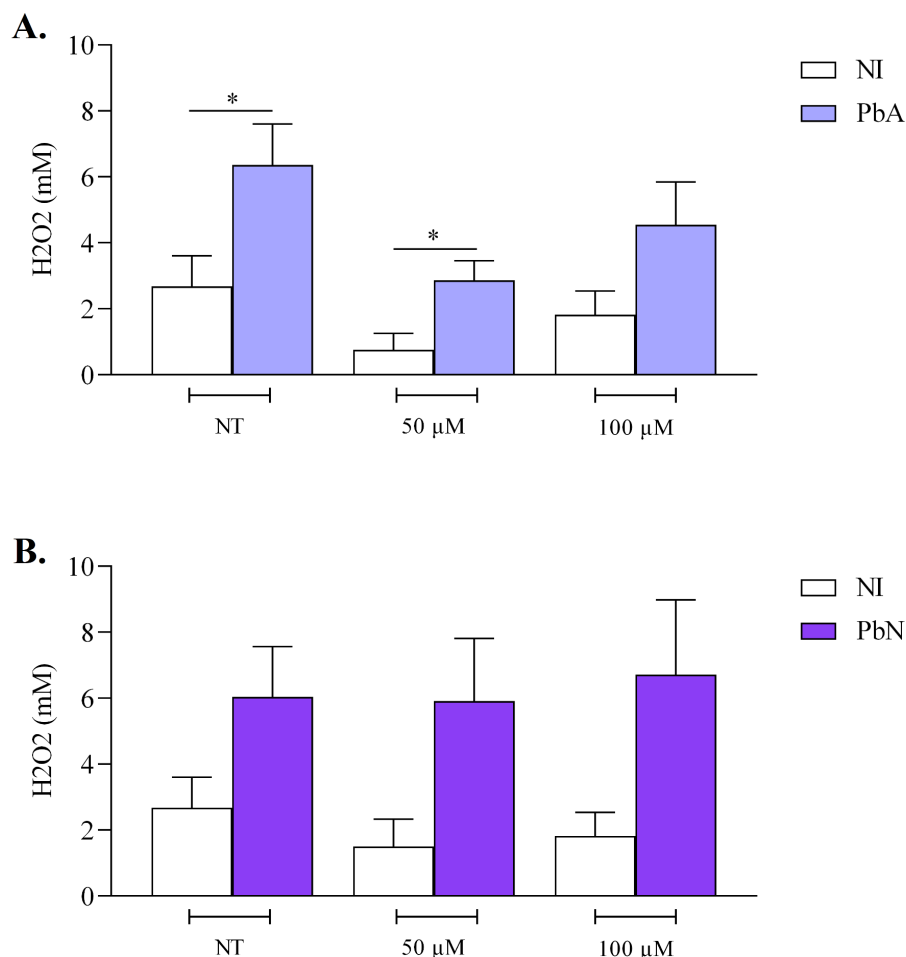
(A) PbA; (B) PbN. Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM. (*) Indica diferença estatística em relação aos poços NI: NT, 6 h ($p = 0,0199$); NT, 12 h ($p = 0,0347$); 100 μ M, 12 h ($p = 0,0225$).

5.3 MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM ÔMEGA-3 RICO EM DHA TÊM A PRODUÇÃO DE H_2O_2 MODULADA PELA INCUBAÇÃO COM HEMÁCIAS INFECTADAS POR PbA e PbN

A produção de H_2O_2 , utilizada como marcador de estresse oxidativo, foi avaliada em macrófagos peritoneais tratados com ômega-3 rico em DHA e incubados com hemácias infectadas por PbA ou PbN após 6 horas (Figura 10). Nos macrófagos incubados com hemácias infectadas por PbA (Figura 10A), observou-se aumento significativo da produção de H_2O_2 em relação aos poços NI na condição NT e tratado com 50 μ M. Em relação aos macrófagos incubados com hemácias infectadas por PbN (Figura 10B), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas condições avaliadas. Entretanto, observou-se

tendência de aumento da produção de H_2O_2 nos macrófagos incubados com hemácias infectadas em relação aos poços NI.

Figura 10. Produção de H_2O_2 por macrófagos peritoneais tratados com ômega-3 rico em DHA e incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN



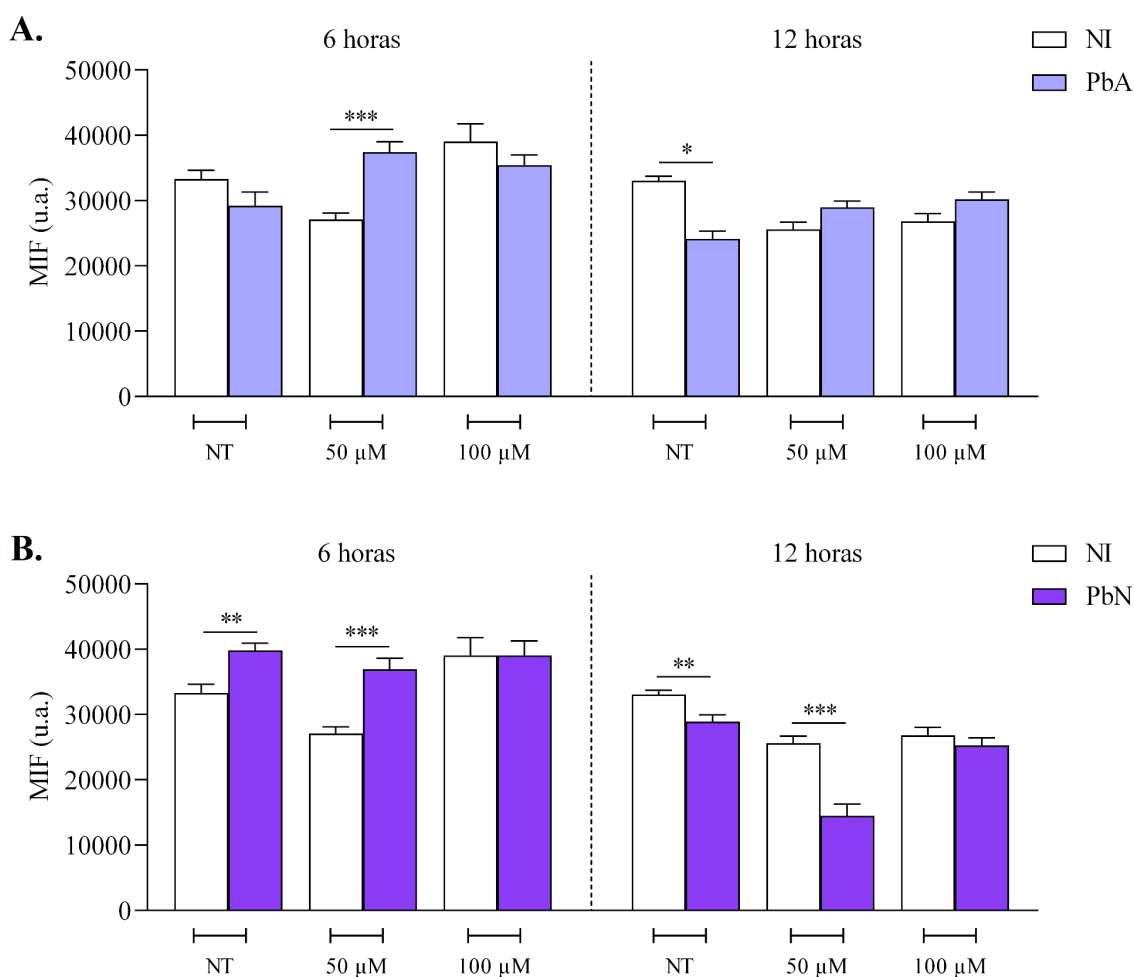
(A) PbA; (B) PbN. Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM. (*) Indica diferença estatística em relação aos respectivos poços NI: NT, 6 h ($p = 0,0199$); 50 μ M, 6 h ($p = 0,0216$).

5.4 MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM ÔMEGA-3 RICO EM DHA TÊM A FORMAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS MODULADA PELA INCUBAÇÃO COM HEMÁCIAS INFECTADAS POR PbA e PbN

A formação de corpúsculos lipídicos por macrófagos peritoneais tratados com ômega-3 rico em DHA e incubados com hemácias infectadas por PbA ou PbN foi avaliada após 6 e 12 horas de incubação. A quantificação dos corpúsculos lipídicos foi realizada por leitura em fluorímetro utilizando células coradas com Nile Red (Figura 11). Nos macrófagos incubados com hemácias infectadas por PbA (Figura 11A), observou-se aumento

significativo da formação de corpúsculos lipídicos em relação aos poços NI na condição tratado com 50 μ M, após 6 horas. Após 12 horas, observou-se aumento significativo da formação de corpúsculos lipídicos em relação aos poços NI na condição NT. Em relação aos macrófagos incubados com hemácias infectadas por PbN (Figura 11B), observou-se aumento significativo da formação de corpúsculos lipídicos em relação aos poços NI na condição NT e tratado com 50 μ M, após 6 e 12 horas.

Figura 11. Formação de corpúsculos lipídicos por macrófagos peritoneais tratados com ômega-3 rico em DHA e incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN

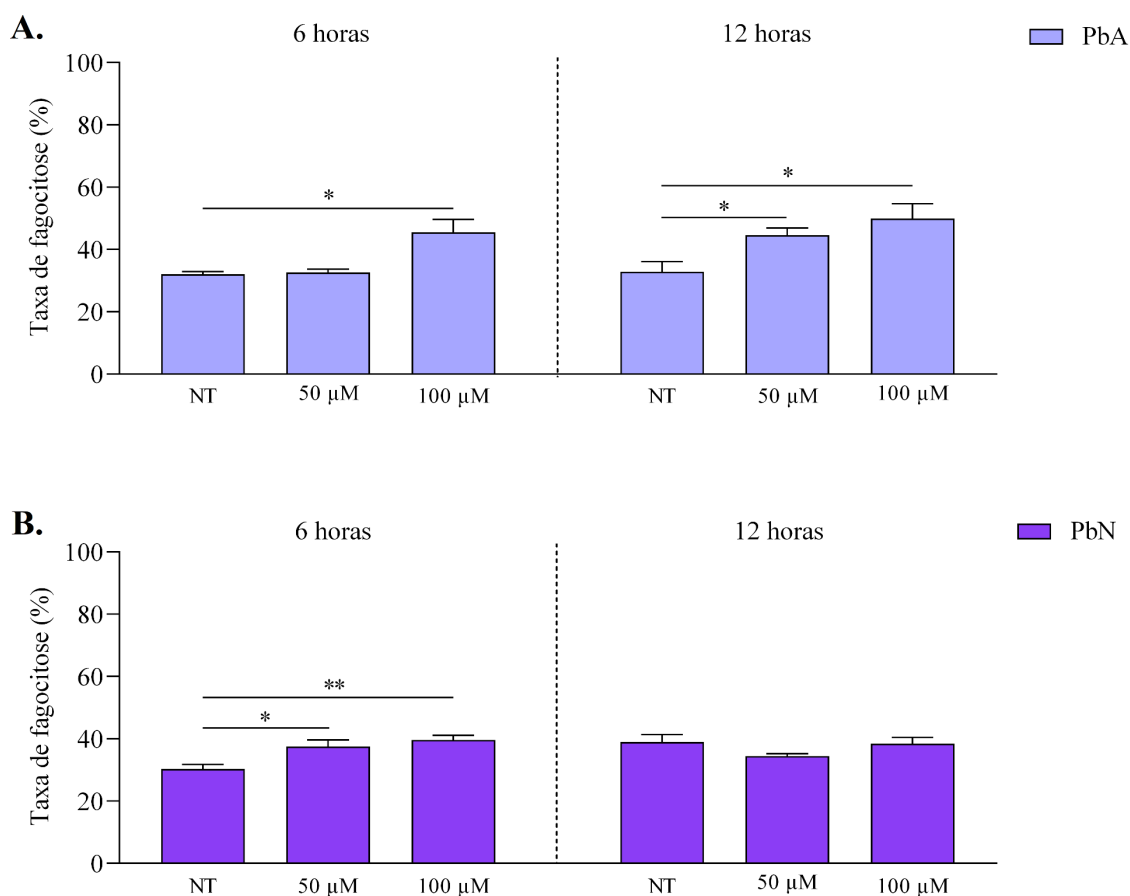


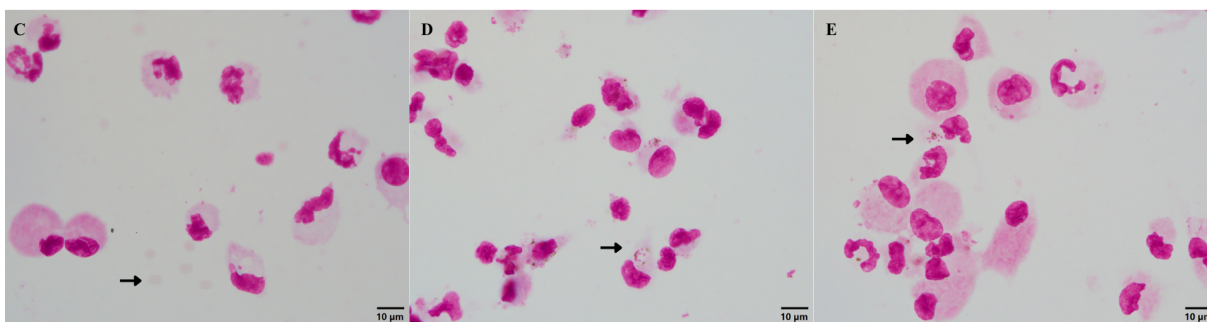
(A) PbA; (B) PbN. Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM. (*) Indica diferença estatística em relação aos poços NI: PbA - 50 μ M, 6 h ($p = 0,0005$); NT, 12 h ($p = 0,0159$). PbN - NT, 6 h ($p = 0,0087$); 50 μ M, 6 h ($p = 0,0009$); NT, 12 h ($p = 0,0094$); 50 μ M, 12 h ($p = 0,0008$).

5.5 MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM ÔMEGA-3 RICO EM DHA TÊM A CAPACIDADE FAGOCÍTICA MODULADA PELA INCUBAÇÃO COM HEMÁCIAS INFECTADAS POR PbA e PbN

A capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais tratados com ômega-3 rico em DHA e incubados com hemácias infectadas por PbA ou PbN foi avaliada após 6 e 12 horas de incubação. A taxa de fagocitose foi determinada por análise microscópica, com base na porcentagem de macrófagos que fagocitaram hemácias infectadas (Figura 12). Nos macrófagos incubados com hemácias infectadas por PbA (Figura 12A), observou-se aumento significativo da capacidade fagocítica em relação aos poços NT na condição tratado com 100 μ M, após 6 horas. Além disso, observou-se aumento significativo da capacidade fagocítica em relação aos poços NT nas condições tratado com 50 e 100 μ M, após 12 horas. Em relação aos macrófagos incubados com hemácias infectadas por PbN (Figura 12B), observou-se aumento significativo da capacidade fagocítica em relação aos poços NT nas condições tratado com 50 e 100 μ M, após 6 horas.

Figura 12. Capacidade fagocítica por macrófagos peritoneais tratados com ômega-3 rico em DHA e incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN





(A) PbA; (B) PbN. Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM. (*) Indica diferença estatística em relação aos poços NT: PbA – 100 μ M, 6 h ($p = 0,0500$); 50 μ M, 12 h ($p = 0,0232$); 100 μ M, 12 h ($p = 0,0435$); PbN – 50 μ M, 6 h ($p = 0,0326$); 100 μ M, 6 h ($p = 0,0038$). (C) Macrófagos incubados com hemácias NI, sendo a seta indicativa de uma hemácia NI. (D) Macrófagos incubados com hemácias infectadas por PbA. (E) Macrófagos incubados com hemácias infectadas por PbN. Nas imagens D e E, as setas indicam parasitos e cristais de hemozoína fagocitados pelos macrófagos. Barra de escala = 10 μ m. Aumento 100x.

6 DISCUSSÃO

A resposta inflamatória desencadeada durante a infecção malárica é um dos principais fatores responsáveis pelo desenvolvimento das lesões teciduais associadas à doença. Dessa forma, a modulação da resposta imune ao *Plasmodium* representa uma importante estratégia para minimizar os danos decorrentes da infecção. Entre as células envolvidas nesse processo, destacam-se os macrófagos que, por meio da fagocitose, de apresentação de antígenos e de produção de mediadores inflamatórios, desempenham papel fundamental na resposta imune inata do hospedeiro (Chua *et al.*, 2013). Entretanto, a ativação exacerbada dessas células pode intensificar a resposta inflamatória, contribuindo para a patogênese da doença (Gazzinelli *et al.*, 2014). Assim, estratégias terapêuticas capazes de modular sua atividade podem ser promissoras para a redução dos danos induzidos pela infecção.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou, em estudos *in vivo*, que a suplementação nutricional de camundongos com ômega-3 rico em DHA conferiu proteção contra danos cerebrais e pulmonares induzidos pela infecção experimental com PbA (Carpinter *et al.*, 2024; David-Vieira *et al.*, 2024). No entanto, utilizando o mesmo protocolo de suplementação na infecção experimental por PbN, o DHA não foi capaz de atenuar os danos pulmonares associados à infecção (Pereira *et al.*, 2026). Devido às diferenças observadas entre as cepas e com o objetivo de avaliar o efeito direto do ômega-3 rico em DHA sobre a ativação de macrófagos, minimizando a influência de fatores inerentes aos modelos *in vivo*, o presente estudo avaliou, *in vitro*, o efeito do pré-tratamento com ômega 3 rico em DHA em macrófagos peritoneais incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN.

É estabelecido que o equilíbrio entre citocinas pró- e anti-inflamatórias é essencial para o controle da infecção e para o restabelecimento da homeostase (Anstey *et al.*, 2009; Schofield; Grau, 2005). Nesse contexto, avaliou-se o efeito do pré-tratamento com ômega-3 rico em DHA sobre a produção dessas citocinas por macrófagos peritoneais incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN.

Em nosso estudo, observou-se aumento significativo da produção de IFN- γ pelos macrófagos incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN em relação aos poços NI, independentemente do pré-tratamento com ômega-3 rico em DHA. Na infecção por PbA, entretanto, verificou-se tendência de redução dessa citocina após 12 horas de incubação nos poços tratados. O IFN- γ desempenha papel central na resposta imune contra o *Plasmodium*, promovendo a ativação de macrófagos e potencializando mecanismos efetores importantes para o controle da replicação do parasito (Stevenson & Riley, 2004; Schofield & Grau, 2005).

Além disso, níveis elevados dessa citocina estão associados ao desenvolvimento de intensa resposta inflamatória e à patogênese das formas graves da doença (Stevenson & Riley, 2004). A tendência de redução observada na infecção por PbA corrobora os achados de David-Vieira e colaboradores (2024), que demonstraram diminuição da produção de IFN- γ no homogenato de pulmonar de camundongos previamente suplementados com DHA durante a infecção por PbA. Em contrapartida, os resultados obtidos na incubação com hemácias infectadas por PbN, diferem dos observados por Pereira e colaboradores (2026), que não observaram aumento nos níveis de IFN- γ durante a infecção por PbN, independentemente da suplementação com DHA. Essas diferenças podem estar relacionadas às particularidades dos modelos experimentais empregados, onde a produção dessa citocina resulta da interação entre diferentes populações celulares. Em conjunto, esses resultados sugerem que, embora o DHA possa exercer efeito modulador em determinadas condições, ele não compromete a produção de IFN- γ pelos macrófagos durante a resposta inicial à infecção.

Em relação à IL-6, verificou-se aumento significativo da sua produção pelos macrófagos incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN, independentemente da concentração de DHA utilizada. A IL-6 participa tanto da ativação da resposta inflamatória quanto da regulação da imunidade durante a malária, estando envolvida na ativação de células do sistema imune e na gravidade da infecção (Anstey et al., 2009). Os resultados diferem dos encontrados por Carpinter e colaboradores (2024), que observaram redução dos níveis de IL-6 no homogenato cerebral de camundongos suplementados profilaticamente com DHA e infectados por PbA. Essa divergência provavelmente está relacionada às diferenças entre os modelos experimentais. Dessa forma, os resultados sugerem que o pré-tratamento com ômega-3 rico em DHA não foi capaz de modular a produção de IL-6 pelos macrófagos, preservando a ativação dessas células frente ao estímulo promovido pelas hemácias infectadas.

Quanto ao TNF- α , observou-se aumento significativo da produção dessa citocina apenas nos macrófagos incubados com hemácias infectadas por PbN após 6 horas, na condição sem tratamento. Após 12 horas, embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas, verificou-se tendência de aumento da produção de TNF- α nos macrófagos incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN, principalmente nos grupos previamente tratados com ômega-3 rico em DHA. O TNF- α constitui uma das principais citocinas envolvidas na resposta inflamatória contra o *Plasmodium*, contribuindo para a ativação de células efectoras e para o controle inicial da parasitemia. Entretanto, sua produção exacerbada está diretamente relacionada ao desenvolvimento de lesões teciduais e às

manifestações graves da malária (Schofield & Grau, 2005). Os resultados obtidos na incubação com hemácias infectadas por PbA diferem dos achados obtidos por David-Vieira e colaboradores (2024), que demonstraram diminuição dos níveis dessa citocina no homogenato pulmonar em animais infectados por PbA previamente suplementados com DHA. Por outro lado, corroboram aqueles descritos por Pereira e colaboradores (2026), que também não observaram redução da produção de TNF- α no homogenato pulmonar em animais infectados por PbN previamente suplementados com DHA. Em conjunto, esses achados sugerem que, nas condições avaliadas, o pré-tratamento com ômega-3 rico em DHA não foi capaz de reduzir a produção de TNF- α pelos macrófagos, mantendo um perfil inflamatório semelhante ao observado na ausência do tratamento.

Em relação à IL-10, observou-se aumento da produção dessa citocina pelos macrófagos incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN, principalmente na condição sem tratamento. Entretanto, independentemente da cepa e da concentração de DHA, verificou-se redução dos níveis de IL-10 após 12 horas de incubação. A IL-10, citocina reconhecida por sua ação anti-inflamatória e pela capacidade de limitar a resposta imune exacerbada, contribui para o controle da inflamação e para a prevenção de danos teciduais durante a infecção (Couper; Blount; Riley, 2008). Em nosso estudo, o pré-tratamento com ômega-3 rico em DHA não promoveu aumento adicional da produção de IL-10, indicando que, nas condições experimentais avaliadas, não foi capaz de induzir um perfil regulador nos macrófagos peritoneais. Esses resultados corroboram parcialmente os descritos por David-Vieira e colaboradores (2024), que observaram aumento dos níveis de IL-10 no homogenato pulmonar em animais infectados por PbA suplementados com DHA, mas diferem daqueles obtidos por Pereira e colaboradores (2026), que não verificaram alterações significativas na produção dessa citocina durante a infecção por PbN, independentemente da suplementação com DHA. Em conjunto, esses achados sugerem que os efeitos imunomoduladores do DHA sobre a produção de IL-10 podem depender tanto da cepa de *Plasmodium* quanto do modelo experimental empregado.

Sabe-se que os macrófagos ativados apresentam como um de seus principais mecanismos microbicida a produção de espécies reativas de nitrogênio (ERN) e de oxigênio (ERO), como óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), respectivamente. Esses mediadores desempenham papel fundamental na eliminação do *Plasmodium* por meio de mecanismos oxidativos capazes de limitar a replicação parasitária. Entretanto, sua produção exacerbada também está associada ao desenvolvimento de estresse oxidativo e dano tecidual durante a infecção (Percário *et al.*, 2012)

Em relação ao NO, observou-se aumento significativo da sua produção pelos macrófagos incubados com hemácias infectadas por PbA, em comparação aos poços NI, na condição sem tratamento, após 6 e 12 horas. Além disso, após 12 horas, também foi observado aumento significativo da produção de NO nos poços tratados com 100 μ M de DHA em relação aos poços NI. O NO é considerado um importante mecanismo efetor dos macrófagos ativados, contribuindo para o controle da infecção por exercer atividade citotóxica sobre o parasito (Stevenson & Riley, 2004). Os resultados obtidos corroboram aqueles descritos por Carpinter e colaboradores (2024), que observaram aumento significativo da produção de NO no homogenato cerebral de camundongos infectados por PbA e suplementados profilaticamente com a maior dose de DHA (6,0 g/kg). Em conjunto, esses achados sugerem que o pré-tratamento com ômega-3 rico em DHA não compromete a capacidade dos macrófagos de produzir NO frente ao estímulo promovido pela infecção por PbA, preservando um importante mecanismo efetor da resposta imune inata.

Quanto ao H₂O₂, verificou-se aumento significativo da sua produção pelos macrófagos incubados com hemácias infectadas por PbA, em comparação aos poços NI, nas condições sem tratamento e tratada com 50 μ M de DHA. O H₂O₂ é uma importante ERO produzida durante a explosão respiratória dos fagócitos e participa da eliminação intracelular de patógenos. Entretanto, sua produção exacerbada pode contribuir para o estresse oxidativo, amplificando o dano tecidual observado durante a malária (Gazzinelli *et al.*, 2014). Os resultados obtidos diferem dos encontrados por David-Vieira *et al.* (2024), que observaram redução significativa da produção de H₂O₂ no lavado broncoalveolar de camundongos suplementados com ômega-3 rico em DHA e infectados por PbA. Essa divergência pode estar relacionada às diferenças entre os modelos experimentais utilizados. Assim como observado para o NO, os resultados indicam que o pré-tratamento com DHA não reduziu a capacidade dos macrófagos de produzir espécies reativas importantes para o controle inicial da infecção.

Em contrapartida, na infecção por PbN, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na produção de NO ou H₂O₂, independentemente do tratamento e do tempo de incubação. Esses achados contrastam com o perfil observado para PbA e sugerem que a ativação dos mecanismos oxidativos pelos macrófagos ocorre de maneira distinta entre as duas cepas de *P. berghei*. Dessa forma, embora o DHA não tenha promovido modulação significativa da produção de espécies reativas, os resultados reforçam que a resposta funcional dos macrófagos depende das características da cepa utilizada.

Os corpúsculos lipídicos são organelas citoplasmáticas cuja formação é induzida durante processos inflamatórios e infecciosos, atuando como importantes sítios para a síntese

de mediadores lipídicos bioativos, incluindo mediadores pró-inflamatórios, como prostaglandinas e leucotrienos (Bozza; Viola, 2010), bem como mediadores especializados pró-resolutivos, envolvidos na resolução da inflamação (Serhan, 2014). Durante a infecção por *Plasmodium*, a fagocitose de hemácias parasitadas e de seus componentes estimula a biogênese dessas organelas, cujo aumento está associado à ativação dos macrófagos e à amplificação da resposta inflamatória (Melo et al., 2011).

Em nosso estudo, observou-se aumento estatisticamente significativo da formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN, indicando que ambas as cepas foram capazes de induzir alterações no metabolismo lipídico e na ativação funcional dessas células. Entretanto, o pré-tratamento com ômega-3 rico em DHA não foi capaz de reduzir essa resposta, uma vez que a formação dessas organelas permaneceu elevada mesmo na presença do tratamento. Esses resultados diferem dos observados por Pereira e colaboradores (2026), que demonstraram redução da formação de corpúsculos lipídicos em células do lavado broncoalveolar de camundongos infectados por PbN suplementados com DHA. Essa divergência pode ser explicada pelas diferenças entre os modelos experimentais. Em conjunto, esses achados sugerem que, embora o DHA seja reconhecido por modular a biossíntese de mediadores lipídicos, seu efeito direto sobre a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais foi limitado nas condições avaliadas, reforçando que sua ação imunomoduladora provavelmente depende da interação entre diferentes componentes da resposta imune.

A fagocitose de hemácias infectadas constitui um dos principais mecanismos efetores da imunidade inata contra a malária, contribuindo para a redução da carga parasitária e para a apresentação de antígenos às células da resposta imune adaptativa (Stevenson; Riley, 2004; Chua *et al.*, 2013). Nesse contexto, os macrófagos desempenham papel central no reconhecimento e na remoção de hemácias parasitadas, bem como de pigmentos derivados do parasito, como a hemozoína (Gazzinelli *et al.*, 2024). No presente estudo, o pré-tratamento com ômega-3 rico em DHA promoveu aumento estatisticamente significativo da capacidade fagocítica dos macrófagos incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN, efeito observado principalmente nas maiores concentrações de DHA, e nos tempos de 6 e 12 horas. Esses resultados indicam que, embora o DHA não tenha modulado diretamente a produção de citocinas, espécies reativas ou corpúsculos lipídicos, foi capaz de potencializar uma importante função efetora dos macrófagos.

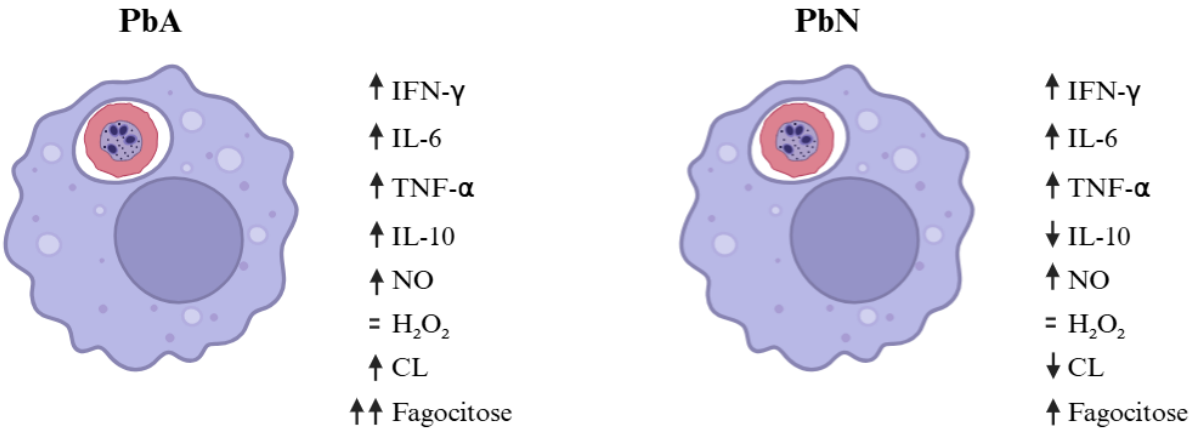
Estudos têm demonstrado que os ácidos graxos poli-insaturados da série ômega-3 podem influenciar a organização da membrana plasmática, aumentando sua fluidez e

modulando receptores envolvidos no reconhecimento e internalização de partículas, o que favorece a atividade fagocítica (Calder, 2017). Além disso, mediadores especializados derivados do DHA, como resolvinas, maresinas e protectinas, participam da resolução da inflamação e estimulam funções dos fagócitos, incluindo a fagocitose e a remoção de células apoptóticas e patógenos (Serhan & Levy, 2018). Assim, os resultados obtidos sugerem que, nas condições avaliadas, o principal efeito direto do ômega-3 rico em DHA sobre os macrófagos foi o fortalecimento da capacidade fagocítica, preservando um mecanismo essencial para o controle inicial da infecção, sem alterar significativamente o perfil inflamatório dessas células.

Em conjunto, os resultados deste estudo demonstram que nas concentrações testadas o pré-tratamento com ômega-3 rico em DHA não foi capaz de modular diretamente a produção de citocinas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio ou a formação de corpúsculos lipídicos por macrófagos peritoneais incubados com hemácias infectadas por PbA e PbN. Em contrapartida, foi capaz de induzir o aumento da capacidade fagocítica dessas células, sugerindo que seu principal efeito direto sobre os macrófagos está relacionado ao fortalecimento de mecanismos efetores envolvidos na eliminação do parasito, e não à supressão da resposta inflamatória. Quando esses resultados são analisados em conjunto com os estudos previamente desenvolvidos pelo nosso grupo, observa-se um comportamento distinto entre as cepas de *P. berghei*. Enquanto a suplementação com ômega-3 rico em DHA foi capaz de atenuar a resposta inflamatória e reduzir os danos cerebrais e pulmonares induzidos pela infecção por PbA, efeitos semelhantes não foram observados na infecção por PbN. Dessa forma, os presentes achados levantam a hipótese de que a resposta desencadeada por PbN possa envolver mecanismos capazes de reduzir ou neutralizar os efeitos imunomoduladores do DHA sobre vias reguladoras da inflamação, impedindo que o perfil anti-inflamatório observado na infecção por PbA seja reproduzido. Essa hipótese deverá ser investigada em estudos futuros, mas reforça que a resposta ao tratamento com ômega-3 rico em DHA depende não apenas do hospedeiro, mas também das características biológicas da cepa de *Plasmodium* envolvida na infecção. Além disso, cabe destacar que este estudo foi conduzido utilizando macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, enquanto os estudos *in vivo* previamente realizados pelo grupo empregaram animais C57BL/6. Considerando que essas linhagens apresentam diferenças intrínsecas na resposta imune, com os BALB/c exibindo maior predisposição a respostas do tipo Th2 e os C57BL/6 a respostas do tipo Th1, é possível que o background genético do hospedeiro tenha influenciado a ativação funcional dos macrófagos e, conseqüentemente, os efeitos observados do tratamento com DHA. Assim,

essa diferença metodológica deve ser considerada na interpretação dos resultados e na comparação entre os modelos experimentais.

Figura 13 - Padrão de resposta observado para os macrófagos tratados com ômega-3 rico em DHA e incubado com hemácias infectadas de PbA e PbN



7 CONCLUSÃO

Em conjunto, os achados sugerem que os efeitos anti-inflamatórios previamente observados pelo nosso grupo em modelos experimentais *in vivo* podem não resultar exclusivamente da ação direta do DHA sobre os macrófagos, mas provavelmente dependem da interação entre diferentes populações celulares, mediadores inflamatórios e do microambiente tecidual. Dessa forma, este estudo contribui para a compreensão dos mecanismos imunomoduladores do ômega-3 rico em DHA durante a malária experimental e fornece subsídios para futuras investigações sobre as diferenças biológicas entre as cepas de *P. berghei* e sua influência na resposta do hospedeiro.

REFERÊNCIAS

- ABOSALIF, Khalid *et al.* Toll-Like Receptors in Malaria: Gatekeepers of Innate Immunity and Pathogenesis. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 19, n. 2, p. 766–779, 1 jun. 2025.
- AMINO, Rogerio *et al.* Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. **Nature medicine**, v. 12, n. 2, p. 220–224, 14 mar. 2006.
- ANSTEY, Nicholas M. *et al.* The pathophysiology of vivax malaria. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 5, p. 220–227, maio 2009.
- BANO, Nazneen *et al.* Cellular interactions of Plasmodium liver stage with its host mammalian cell. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 12, p. 1329–1341, out. 2007.
- BOYLE, Michelle J.; ENGWERDA, Christian R.; JAGANNATHAN, Prasanna. The impact of Plasmodium-driven immunoregulatory networks on immunity to malaria. **Nature reviews. Immunology**, v. 24, n. 9, p. 637–653, 1 set. 2024.
- BOZZA, Patricia T.; VIOLA, João P. B. Lipid droplets in inflammation and cancer. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 82, n. 4–6, p. 243–250, abr. 2010.
- BRAZ-DE-MELO, Heloísa Antoniella *et al.* Potential neuroprotective and anti-inflammatory effects provided by omega-3 (DHA) against Zika virus infection in human SH-SY5Y cells. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.
- CALDER, Philip C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 4, p. 469–484, 2015.
- CALDER, Philip C. Docosahexaenoic Acid. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 69, n. Suppl. 1, p. 8–21, 15 nov. 2016.
- CALDER, Philip C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. **Biochemical Society transactions**, v. 45, n. 5, p. 1105–1115, 15 out. 2017.
- CARPINTER, Bárbara Albuquerque *et al.* DHA-rich fish oil plays a protective role against experimental cerebral malaria by controlling inflammatory and mechanical events from infection. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 123, p. 109492, 1 jan. 2024.
- CHARAVANAMUTTU, Yathavi *et al.* The Evolving Landscape of Malaria Prevention Strategies: A Review of Recent Developments. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, v. 15, n. 2, 1 fev. 2026.
- CHUA, Caroline Lin Lin *et al.* Monocytes and macrophages in malaria: Protection or pathology? **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 26–34, jan. 2013.
- COUPER, Kevin N.; BLOUNT, Daniel G.; RILEY, Eleanor M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 180, n. 9, p. 5771–5777, 1 maio 2008.

DAVID-VIEIRA, Carolina *et al.* Lung Damage Induced by *Plasmodium berghei* ANKA in Murine Model of Malarial Infection is Mitigated by Dietary Supplementation with DHA-Rich Omega-3. **ACS infectious diseases**, v. 10, n. 10, p. 3607–3617, 11 out. 2024.

DOUMBO, Ogobara K. *et al.* High levels of *Plasmodium falciparum* rosetting in all clinical forms of severe malaria in African children. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 81, n. 6, p. 987–993, dez. 2009.

FERNÁNDEZ, Elena Sánchez. Una nueva era contra la malaria. **Encuentros en la Biología**, n. 94, p. 6–8, 20 mar. 2004.

FERREIRA, Lydia Masako; HOCHMAN, Bernardo; BARBOSA, Marcus Vinícius Jardini. Modelos experimentais em pesquisa. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. SUPPL. 2, p. 28–34, 2005.

FLETCHER, Paige *et al.* Docosahexaenoic acid impacts macrophage phenotype subsets and phagolysosomal membrane permeability with particle exposure. **Journal of toxicology and environmental health. Part A**, v. 84, n. 4, p. 152, 2020.

GAZZINELLI, Ricardo T. *et al.* Innate sensing of malaria parasites. **Nature reviews. Immunology**, v. 14, n. 11, p. 744–757, 1 jan. 2014.

KONG, Weimin *et al.* Docosahexaenoic acid prevents dendritic cell maturation and in vitro and in vivo expression of the IL-12 cytokine family. **Lipids in Health and Disease**, v. 9, p. 12, 2010.

LACERDA-QUEIROZ, Norinne; TEIXEIRA, Mauro Martins; TEIXEIRA, Antônio Lúcio. Imunopatogênese da malária cerebral. **Rev. bras. neurol**, p. 13–19, 2008.

Malária | Nosso Mundo em Dados. Disponível em: <<https://ourworldindata.org/malaria>>. Acesso em: 9 jul. 2026.

Malária — Ministério da Saúde. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/malaria>>. Acesso em: 9 jul. 2026.

MANTOVANI, Alberto; SICA, Antonio; LOCATI, Massimo. Macrophage polarization comes of age. **Immunity**, v. 23, n. 4, p. 344–346, out. 2005.

Mapa de risco por município de infecção, Brasil, 2025 — Ministério da Saúde.

Disponível em:

<<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/malaria/situacao-epidemiologica-da-malaria/mapa-de-risco/mapa-de-risco-por-municipio-de-infeccao-brasil-2025/view>>.

Acesso em: 9 jul. 2026.

MARTIN, Clayton Antunes *et al.* Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 6, p. 761–770, nov. 2006.

MARTINEZ, Fernando O.; GORDON, Siamon. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000prime reports**, v. 6, 3 mar. 2014.

MEDZHITOV, Ruslan. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 24 jul. 2008.

MELO, Rossana C. N. *et al.* Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, v. 59, n. 5, p. 540–556, 2011.

MILNER, Danny A. Malaria Pathogenesis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 8, n. 1, 1 jan. 2018.

Ministério da Saúde. Disponível em:

<<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2025/abril/brasil-reduz-26-dos-casos-de-malaria-no-primeiro-trimestre-de-2025>>. Acesso em: 9 jul. 2026.

MIOTO, Leide Daiana; GALHARDI, Ligia Carla Faccin; AMARANTE, Marla Karine. Aspectos parasitológicos e imunológicos da malária. **Biosaúde**, v. 14, n. 1, p. 42–55, 2012.

NATHAN, Carl; CUNNINGHAM-BUSSEL, Amy. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 5, p. 349–361, maio 2013.

NETO, MATIAS PINHEIRO DE MACÊDO *et al.* MALÁRIA: IMUNOPATOLOGIA E CONTROLE IMUNOLÓGICO. **Imunologia e Doenças Infecciosas e Parasitárias - Edição IV**, p. 29–36, 28 mar. 2025.

PERCÁRIO, Sandro *et al.* Oxidative stress in malaria. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 12, p. 16346–16372, dez. 2012.

PEREIRA, Ludmila Ponce Monken Custódio *et al.* Differential Effects of DHA-Rich Fish Oil Supplementation on Intestinal and Pulmonary Alterations in Experimental Malaria Caused by Plasmodium berghei NK65. **ACS Omega**, v. 11, n. 12, p. 19534–19546, 31 mar. 2026.

PINHEIRO, Pedro Clemente Pereira *et al.* PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA MALÁRIA NO BRASIL DE 2007 A 2022. 2024.

PRATT-RICCIO, Lilian Rose *et al.* Uso de modelos de primatas neotropicais para pesquisa em malária: um histórico dos 25 anos de colaboração entre o Laboratório de Pesquisa em Malária (IOC, Fiocruz) e o Centro Nacional de Primatas (IEC, SVS). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 12, n. ESP, jul. 2021.

QUIRINO, Thatyane de Castro. **Estudo da permeabilidade vascular pulmonar e das junções interendoteliais na malária experimental**. 2019. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9142/tde-08032019-173655/publico/Thatyane_de_Castro_Quirino_ME_Original.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2026.

R, Ivone Castro; RODRÍGUEZ, María del Carmen. Análisis proteómico de Plasmodium, el agente causal de la malaria. **Salud Pública de México**, v. 51, 4 maio 2009.

Relatório mundial sobre a malária 2025. Disponível em:

<<https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2025>>. Acesso em: 9 jul. 2026.

ROGERSON, Stephen J. *et al.* Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 105–117, fev. 2007.

SCHOFIELD, Louis; GRAU, Georges E. Immunological processes in malaria pathogenesis. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, n. 9, p. 722–735, set. 2005.

SERHAN, Charles N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. **Nature**, v. 510, n. 7503, p. 92–101, 2014.

SERHAN, Charles N.; LEVY, Bruce D. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. **The Journal of clinical investigation**, v. 128, n. 7, p. 2657–2669, 2 jul. 2018.

STEVENSON, Mary M.; RILEY, Eleanor M. Innate immunity to malaria. **Nature Reviews Immunology** 2004 4:3, v. 4, n. 3, p. 169–180, 2004.