

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

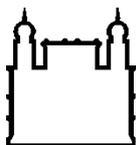
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

HELENA D'ANUNCIAÇÃO DE OLIVEIRA

**Ácido acetilsalicílico e terapia combinada com dihidroartemisinina
na síndrome do desconforto respiratório agudo associado à
malária: análise da função pulmonar e do processo inflamatório**

Orientador: Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto

RIO DE JANEIRO
2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

HELENA D'ANUNCIÇÃO DE OLIVEIRA

Ácido acetilsalicílico e terapia combinada com dihidroartemisinina na síndrome do desconforto respiratório agudo associado à malária: análise da função pulmonar e do processo inflamatório

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto

RIO DE JANEIRO

2019

ii

De Oliveira, Helena D'Anunciação.

Ácido acetilsalicílico e terapia combinada com dihidroartemisinina na síndrome do desconforto respiratório agudo associado à malária: análise da função pulmonar e do processo inflamatório / Helena D'Anunciação De Oliveira. - Rio de Janeiro, 2019.

xviii, 141 f.; il.

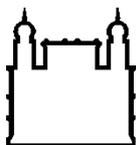
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2019.

Orientador: Hugo Caire de Castro Faria-Neto.

Bibliografia: f. 130-141

1. Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo. 2. Aspirina . 3. Malária . 4. Antimaláricos . I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTORA: HELENA D'ANUNCIÇÃO DE OLIVEIRA

**ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E TERAPIA COMBINADA COM
DIHIDROARTEMISININA NA SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO
AGUDO ASSOCIADO À MALÁRIA: ANÁLISE DA FUNÇÃO PULMONAR E DO
PROCESSO INFLAMATÓRIO**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto

Aprovada em: 19 / 08 / 2019.

EXAMINADORES:

- Profa. Dra.** Daniella Arêas Mendes-da-Cruz (IOC-FIOCRUZ) - **Presidenta**
Profa. Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito (Instituto René Rachou- FIOCRUZ)
Profa. Dra. Fernanda Ferreira Cruz (IBCCF-UFRJ)
Profa. Dra. Juliana de Meis (IOC-FIOCRUZ) - Revisora
Profa. Dra. Ana Acácia Pinheiro Caruso Neves (IBCCF-UFRJ)

Rio de Janeiro, 19 de agosto de 2019

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Dra. Tatiana Maron Gutierrez e Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto pela orientação e ensinamentos ao longo dessa jornada científica. Obrigada pela confiança e dedicação.

À Dra. Patrícia Rocco, pela atenção e importante colaboração ao longo desse trabalho.

Às professoras Dra. Patrícia Torres Bozza e Dra. Adriana Silva pela acolhida no Laboratório de Imunofarmacologia e pelos ensinamentos ao longo da minha jornada acadêmica na Fiocruz.

Ao Dr. Marcelo Pelajo Machado, pela atenção e importante colaboração nas análises de histologia desenvolvidos nesse estudo.

Às professoras Dra. Daniella Arêas, Dra. Fernanda Cruz, Dra. Cristiana de Brito e Dra. Ana Acacia Neves por aceitarem fazer parte da banca examinadora. E à Dra. Juliana de Meis por aceitar ser minha revisora e participar como suplente da banca examinadora.

À Dra. Camila Batista, pela colaboração no projeto.

Aos queridos Dr. Johnatas Dutra e Dra. Débora Xisto pela ajuda nos experimentos realizados no Laboratório de Investigação Pulmonar. Obrigada pelo suporte e ensinamentos.

Aos amigos Adriano Yagho, Rodrigo Rocha, Maria Carolina Barbosa e Ana Carolina Lima por toda a ajuda, dedicação e apoio nos experimentos, em nosso grupo de pesquisa e pelo carinho de sempre. E em especial, a Maiara Lima e Érica Amorim, que sempre me aconselharam e disseram palavras de apoio e amizade nos momentos mais difíceis pelos quais passei durante o doutorado. Sem vocês esse trabalho não seria possível.

Aos colegas do Laboratório de Imunofarmacologia. Obrigada pelos ensinamentos, atenção e por tornar as horas de trabalho mais prazerosas e descontraídas. Em especial, à Rose Branco, pela ótima companhia, boas risadas, excelente humor, e pelo empenho e dedicação a todos do laboratório.

À toda equipe de apoio, serviços gerais, manutenção do biotério, em especial aos veterinários e bioteristas, que fazem do trabalho em experimentação animal possível na Fiocruz. Sou grata à cada um dos animais usados nesse projeto, cuja vida foi destinada à ciência e saúde pública.

Aos amigos que fiz na Fiocruz nos espaços que fazem da vida acadêmica algo maior do que gráficos e resultados. Aprendi muito com os companheiros da Associação dos Pós-Graduandos da Fiocruz Rio e de outros estados e durante minha passagem pelo Curso de Saúde Comunitária da Fiocruz. Vocês são prova de que a ciência deve servir à população e de que a luta estudantil é fundamental para a garantia dos nossos direitos como cidadãos. E à Márcia, coordenadora do Centro de Apoio ao Discente, que me acolheu, escutou, e ajudou nos momentos em que mais precisei de suporte na Fiocruz.

Aos meus pais, Alessandra e Joel, que sempre me apoiaram em cada escolha e pelo incentivo nos momentos mais difíceis. Obrigada pelo amor, dedicação e compreensão. À minha irmã Luísa, por sempre me ajudar, ouvir e incentivar. Obrigada por todo carinho, amor e atenção. À Patricia Duarte pelo carinho, amor e compreensão na fase mais turbulenta dessa jornada. À minha família, por estar sempre ao meu lado e pelas palavras de carinho e encorajamento.

E em memória à minha avó Raulina, a quem a vida não deu oportunidade de conhecer as letras, mas que me mostrou o mundo através de seu amor.

A todos os amigos que de alguma forma contribuíram para esta conquista.

“E não há melhor resposta
que o espetáculo da vida:
vê-la desfiar seu fio,
que também se chama vida,
ver a fábrica que ela mesma,
teimosamente, se fabrica,
vê-la brotar como há pouco
em nova vida explodida;
mesmo quando é assim pequena
a explosão, como a ocorrida;
como a de há pouco, franzina;
mesmo quando é a explosão
de uma vida Severina.”

João Cabral de Melo Neto

RESUMO

De Oliveira, Helena D'Anuniação. Ácido acetilsalicílico e terapia combinada com dihidroartemisinina na síndrome do desconforto respiratório agudo associado à malária: análise da função pulmonar e do processo inflamatório. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular – Imunologia e Farmacologia). Instituto Oswaldo Cruz. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

A malária é uma doença parasitária predominante em países de clima tropical e subtropical, que pode levar a complicações como malária cerebral, anemia grave e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). A SDRA é resultante da exacerbação do processo inflamatório e do sequestro de eritrócitos infectados nos capilares alveolares e pode ocorrer após o tratamento com antimalárico. Considerando que pacientes com malária também apresentam plaquetopenia, o ácido acetilsalicílico (AAS), um anti-inflamatório não-esteroidal de uso comum, que possui efeitos imunomodulatórios e antiplaquetários, poderia representar um fator de risco à população de áreas endêmicas. Desta forma, o presente estudo analisou os efeitos sistêmicos do uso da dihidroartemisinina (DHA) e do AAS na SDRA induzida por *Plasmodium berghei* NK65 (*Pb*NK65). Para tal, camundongos C57BL/6 foram divididos nos grupos controle (C), inoculados com hemácias não-infectadas, e infectado (*Pb*), inoculados com 10^4 hemácias infectadas. A infecção por *P. berghei* NK65 levou a alterações morfo-funcionais e edema pulmonar a partir do 8º dia pós-infecção (dpi). Dentre as diferentes formas de solubilização da DHA, apenas o grupo tratado com DHA solubilizada em DMSO apresentou 100% de sobrevivência. A fim de avaliar os efeitos sistêmicos da DHA e do AAS no quadro estabelecido de SDRA, o tratamento com DHA (3 mg/kg, em D8 ou por 7 dias), veículo (DMSO), AAS (100 mg/kg, dose única) ou DHA+AAS foi realizado no 8º dpi, e as análises no 9º ou 15º dpi. A infecção por *P. berghei* NK65 levou ao aumento de proteínas e dos níveis de MCP-1 no fluido do lavado broncoalveolar (BALF), da elastância estática pulmonar (Est,L), das pressões resistiva ($\Delta P1,L$) e viscoelástica ($\Delta P2,L$), do infiltrado inflamatório, focos de hemorragia, edema e espessamento de septo alveolar no 9º dpi. Ademais, todos os grupos infectados apresentaram anemia, trombocitopenia, hipoalbuminemia e aumento de aspartato-aminotransferase, sem haver aumento da permeabilidade da barreira hemato-encefálica ou piora da função renal. A análise qualitativa da medula óssea indicou acúmulo de pigmento malárico e presença aumentada de megacariócitos. No fígado, notou-se aumento do número de megacariócitos, hiperplasia kupfferiana com pigmento malárico fagocitado e formação de agregados entre leucócitos e hemácias infectadas em veias centrais. O tratamento com DHA, AAS ou DHA+AAS manteve anemia e plaquetopenia observadas no grupo *Pb*+DMSO. A DHA reduziu Est,L, $\Delta P2,L$ e a porcentagem de células mononucleares no pulmão em comparação ao grupo *Pb*+DMSO, no 9ºdpi. O AAS reduziu de forma mais discreta a celularidade total e número de células mononucleares no pulmão e reduziu os níveis de MCP-1 no BALF. Entretanto, houve aumento da Est,L e redução da sobrevivência em comparação ao grupo *Pb*+DHA, indicando seu efeito deletério. No 15º dpi, o tratamento com DHA e DHA+AAS reduziu a leucocitose e a anemia, mas manteve plaquetopenia e alterações histológicas no pulmão, fígado e medula óssea. Conclui-se que o AAS leva à modulação do recrutamento de células mononucleares ao tecido pulmonar, mas mantém a disfunção pulmonar e a alta mortalidade na SDRA associada à malária. Assim, o uso do AAS é contra-indicado em casos suspeitos de malária.

Palavras-chave: Malária, Síndrome do desconforto respiratório agudo, Ácido acetilsalicílico, Dihidroartemisinina.

ABSTRACT

De Oliveira, Helena D'Anuniação. Acetylsalicylic acid and combined therapy with dihydroartemisinin on malaria-associated acute respiratory distress syndrome: analysis of lung function and inflammatory process. Thesis (Doutorado em Biologia Celular e Molecular – Imunologia e Farmacologia). Instituto Oswaldo Cruz. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

Malaria is a vector-borne disease predominant in tropical and sub-tropical countries, and can lead to complications including cerebral malaria, severe anemia and acute respiratory distress syndrome (ARDS). ARDS is triggered by exacerbated inflammatory process and adhesion of infected erythrocyte in the alveolar capillaries. Since patients also present thrombocytopenia, using acetylsalicylic acid (ASA), a non-steroidal anti-inflammatory widely used, with immunomodulatory and antiplatelet effects may represent a risk in endemic regions. Thus, the present study analyzed the systemic effects of dihydroartemisinin (DHA) and ASA on ARDS induced by *Plasmodium berghei* NK65. C57BL/6 mice were divided into control (C) and infected (*Pb*) groups, inoculated with uninfected erythrocytes or 10^4 *P. berghei* NK65 infected erythrocytes, respectively. *P. berghei* NK65 infection led to morpho-functional impairment and pulmonary edema on the 8th day post-infection (dpi). DHA effectiveness varied according to its solubilization, and only DMSO-solubilized DHA group presented 100% of survival. Then, in order to evaluate the systemic effects of DHA and ASA after the onset of ARDS, animals were treated with DHA (3 mg / kg, in D8 or for 7 days), vehicle (DMSO), AAS (100 mg / kg, single dose) or DHA + AAS at the 8th dpi and analysis were performed at the 9th or 15th dpi. *P. berghei* NK65 infection led to increased MCP-1 levels and protein content in bronchoalveolar fluid (BALF), as well as increased lung static elastance (Est, L), resistive ($\Delta P1$, L) and viscoelastic ($\Delta P2$, L) pressures, inflammatory infiltrate, hemorrhage, alveolar edema and alveolar thickening septae at the 9th dpi. In addition, all infected groups presented anemia, thrombocytopenia, hypoalbuminemia and increased aspartate aminotransferase, without increasing blood-brain barrier permeability or renal function impairment. Bone-marrow qualitative analysis indicated large amount of hemozoin and increased number of megakaryocytes. Liver tissue also presented large number of megakaryocytes, Kupffer cell hyperplasia with hemozoin phagocytosis, and formation of leukocyte and infected erythrocyte aggregates in the central veins. DHA, ASA or DHA+ASA treatment maintained anemia and thrombocytopenia observed in *Pb* + DMSO group. DHA reduced Est, L, $\Delta P2$, L and lung mononuclear cell count compared to *Pb* + DMSO, at the 9th dpi. ASA reduced total lung cellularity, mononuclear cell count and MCP-1 levels in BALF. However, *Pb*+ASA group presented higher Est,L and reduced survival rate compared to *Pb*+DHA group, suggesting its deleterious effect. At 15th dpi, DHA and DHA+ASA reduced leukocytosis and anemia, but maintained thrombocytopenia as well as histopathological changes in the lung, liver and bone marrow. In conclusion, ASA modulated the recruitment of mononuclear cells to lung tissue but maintained morpho-functional impairment and high mortality rate in experimental malaria-associated ARDS. Thus, ASA must be contraindicated in suspected cases of malaria. Key words: Malaria, Acute Respiratory Distress Syndrome, Acetylsalicylic Acid, Dihydroartemisinin.

SUMÁRIO

Agradecimentos	v
Resumo	viii
Abstract	ix
Lista de figuras	xiii
Lista de abreviaturas	xvi
1. Introdução	19
1.1 Malária: epidemiologia e aspectos socioeconômicos	19
1.2 Agentes etiológicos e transmissão	24
1.3 Ciclo da doença	26
1.4 Fisiopatologia da malária	29
1.5. Manifestações clínicas	35
1.6. Síndrome do desconforto respiratório agudo associada à malária pulmonar	37
1.7. Tratamento e medidas de controle da malária	40
1.7.1. Dihidroartemisinina	42
1.8. Ácido Acetilsalicílico	43
1.9. Modelos experimentais	45
2. Justificativa	48
3. Objetivos	51
3.1. Objetivo geral	51
3.2. Objetivos específicos	51
4. Metodologia	52
4.1. Infecção com <i>Plasmodium berghei</i> NK65	52
4.2. Desenho Experimental	53
4.3. Mecânica Respiratória	55
4.4. Remoção dos pulmões	60
4.5. Análise histológica	61
4.6. Análise morfométrica	62
4.7. Análises do fluido do lavado broncoalveolar e sangue	62
4.7.1. Coleta das amostras	62
4.7.2. Contagem da celularidade diferencial	63
4.7.3. Análise de mediadores inflamatórios no BALF	63

4.7.4. Quantificação de proteínas no BALF	64
4.7.5. Hemograma e análise bioquímica	64
4.8. Análise da formação de edema pulmonar	65
4.9. Análise da permeabilidade da barreira hemato-encefálica por Azul de Evans	65
4.10. Análise estatística	66
5. Resultados	67
5.1. Infecção por <i>P. berghei</i> NK65 leva alterações na função pulmonar e formação de edema pulmonar	67
5.2. Tratamento com DHA não melhora as alterações morfo-funcionais induzidas por <i>P. berghei</i> NK65	69
5.3. DHA prolongou a sobrevida e modulou a celularidade total e diferencial do BALF na infecção por <i>P. berghei</i> NK65	74
5.4. Efeitos da DHA na permeabilidade da barreira alvéolo-capilar e níveis de MCP-1 no BALF na SDRA associada à malária	79
5.5. DHA e AAS não interferem em 24h na anemia e plaquetopenia causadas pela infecção por <i>P. berghei</i> NK65	81
5.6. AAS modula a migração de células mononucleares ao tecido pulmonar na SDRA associada à malária	84
5.7. AAS não mitiga disfunção pulmonar na SDRA associada à malária	89
5.8. Infecção por <i>P. berghei</i> NK65 leva ao acúmulo de pigmento malárico na medula óssea	92
5.9. Investigação das alterações hepáticas após tratamento com DHA e AAS	95
5.10. Infecção por <i>P. berghei</i> NK65 não interfere na função renal no 9º dpi	100
5.11. Análise da permeabilidade da barreira hematoencefálica na infecção por <i>P. berghei</i> NK65	101
5.12. Efeitos da DHA e AAS na sobrevida, parasitemia e parâmetros hematológicos no dia 15 pós-infecção	102
5.13. Efeitos da DHA e AAS na celularidade total e diferencial e das alterações do tecido pulmonar no 15º dia pós-infecção	106
5.14. AAS mantém alterações hepáticas no 15º dia pós-infecção, que são minimizadas após tratamento DHA	109
6. Discussão	114

7.	Conclusões	128
8.	Referências	130

LISTA DE FIGURAS

1.1.1 Países endêmicos para malária: diferenças entre os anos 2000 e 2016.	21
1.1.2 Número de casos confirmados de malária por 1000 habitantes em 2017	22
1.1.3 Distribuição de casos autóctones de malária no Brasil, entre 2004 e 2017	23
1.2.1 Mapa dos principais vetores da malária no Brasil, por região.	25
1.3.1 Ciclo do <i>Plasmodium</i> spp.	28
1.4.1 Mecanismos de interação das hemácias infectadas com os macrófagos e monócitos	33
1.6.1 Fisiopatologia da SDRA associada à malária.	37
1.8.1 Mecanismos de ação do ácido acetilsalicílico independentes da ciclooxigenase	44
4.2.1 Desenho experimental: Análise do início das alterações em mecânica respiratória	53
4.2.2 Desenho experimental: Solubilização da DHA	53
4.2.3 Desenho experimental: tratamento com AAS e DHA	55
4.3.1 Montagem experimental para a medida da mecânica pulmonar.	58
4.3.2. Representação esquemática do método de oclusão ao final da inspiração	59
4.6.1 Representação esquemática do retículo utilizado para a técnica de contagem de pontos	59
5.1.1 Infecção por <i>P. berghei</i> NK65 leva a disfunção pulmonar associada à edema	69
5.2.1 DHA não reverte disfunção pulmonar e edema causados pela infecção por <i>P. berghei</i> NK65.	70
5.2.2 Infecção por <i>P. berghei</i> NK65 leva a alterações morfo-funcionais no tecido pulmonar	72
5.2.3 Análise do dano difuso alveolar após infecção por <i>P. berghei</i> NK65 e tratamento com DHA	73
5.3.1 Sobrevida e parasitemia varia de acordo com a forma de solubilização da DHA	76
5.3.2 Celularidade total e diferencial no BALF varia de acordo com a	78

solubilização da DHA.

5.4.1 Permeabilidade da barreira alvéolo-capilar e níveis de MCP-1 e IL-1 β na SDRa associada à malária	80
5.5.1 Infecção por <i>P.berghei</i> NK65 leva à anemia e plaquetopenia	82
5.5.2 Celularidade diferencial no sangue após infecção por <i>P. berghei</i> NK65 e tratamento com DHA e AAS	83
5.6.1 Efeitos do tratamento com DHA e AAS sobre o infiltrado inflamatório no tecido pulmonar	85
5.6.2 Efeitos da DHA e AAS na celularidade total e diferencial no tecido pulmonar na SDRa associada à malária	86
5.6.3 Efeitos da DHA e AAS na celularidade total e diferencial no BALF na SDRa associada à malária	87
5.6.4 Permeabilidade da barreira alvéolo-capilar e níveis de MCP-1 e KC após tratamento com DHA e AAS	88
5.7.1 AAS não mitiga disfunção pulmonar na SDRa associada à malária	90
5.7.2 Alterações histológicas no tecido pulmonar após tratamento com DHA e AAS	91
5.8.1 Alterações histológicas na medula óssea após infecção por <i>P. berghei</i> NK65	93
5.8.2 Infecção por <i>P. berghei</i> NK65 leva ao acúmulo de pigmento malárico na medula	94
5.9.1 Alterações hepáticas após tratamento com DHA e AAS em modelo de SDRa associada à malária	96
5.9.2 Interação de leucócitos com o endotélio de veia central hepática após infecção por <i>P. berghei</i> NK65 e tratamento com DHA e AAS	98
5.9.3 Análise da função hepática após infecção por <i>P. berghei</i> NK65 e tratamento com DHA e AAS	99
5.10.1 Análise da função renal após infecção por <i>P. berghei</i> NK65 e tratamento com DHA e AAS	100
5.11.1 Integridade da barreira hematoencefálica após infecção por <i>PbNK65</i> e tratamento com DHA e AAS	101
5.12.1 Sobrevida após o tratamento com DHA e AAS	103
5.12.2 Tratamento com DHA sozinha ou associada ao AAS reduz anemia e leucocitose, mas não a plaquetopenia	105

5.13.1 Celularidade total e diferencial no tecido pulmonar após tratamento com DHA e AAS no 15º dia de infecção	107
5.13.2. Interação de leucócitos com o endotélio do tecido pulmonar após indução da MA-SDRA e tratamento com DHA e AAS	108
5.14.1 AAS mantém alterações hepáticas no 15º dia pós-infecção, que são minimizadas após tratamento DHA	110
5.14.2 Presença de células progenitoras eritroides varia de acordo com tratamento 15 dias após infecção por <i>P. berghei</i> NK65	111
5.14.3 Presença de megacariócitos 15 dias após inoculação com <i>P. berghei</i> NK65	112
5.14.4 Aumento da interação de leucócitos com o endotélio de veia central 15 dias após infecção por <i>P. berghei</i> NK65	113

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAS - Ácido acetilsalicílico
- ACT - do inglês, “Artemisinin-based combination therapy”, terapia combinada à base de artemisinina
- AINES - Anti-inflamatórios não esteroidais
- BALF- do inglês, “Bronchoalveolar fluid”, fluido do lavado broncoalveolar
- BCA - Ácido bicinconínico
- BSA - do inglês, “Bovine serum albumin”, albumina de soro bovino
- CD - do inglês, “Cluster of differentiation”, grupamento de diferenciação
- CM - do inglês, “Cerebral malária”, malária cerebral
- COX - Ciclooxigenase
- CQ - Cloroquina
- CR1 - do inglês, “Complement receptor type1”, receptor do complemento 1
- CSA - do inglês, “Chondroitin sulphateA”, sulfato de condroitina A
- DAD - Dano alveolar difuso
- DAMP – do inglês, “Damage-associated molecular patterns”, padrões moleculares associados ao dano
- DARC - do inglês, “Duffy Antigen/Receptor for Chemokines”, receptor de antígeno para quimiocinas Duffy
- DBP - do inglês, “Duffy binding protein”, proteína de ligação em Duffy
- DC - do inglês, “Dendritic cells”, Células dendríticas
- DHA - Dihidroartemisinina
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DNA - do inglês, “Deoxyribonucleic acid”, ácido desoxirribonucleico
- $\Delta P_{1,L}$ - do inglês, “Lung resistive pressure”, pressão resistiva pulmonar
- $\Delta P_{2,L}$ - do inglês, “Lung viscoelastic pressure”, Pressão viscoelástica pulmonar
- dpi – Dias pós-infecção
- EDTA - do inglês, “Ethylenediaminetetraacetic acid”, ácido etilenodiamino tetraacético
- ERK- do inglês, “Extracellular signal–regulated kinases”, quinase regulada pela sinalização extracelular
- Est, L - do inglês, “Lung static elastance”, elastância estática do pulmão
- FIO₂ - Fração inspirada de oxigênio
- GP- do inglês, “Glycophorin”, glicoforina

GPI- do inglês, “Glycosylphosphatidylinositol”, glicosilfosfatidilinositol

HcT – Hematócrito

HE - Hematoxilina eosina

HEPES- do inglês, “N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid”

HGB - Hemoglobina

HIV- Vírus da imunodeficiência humana

HO- Heme oxigenase

HUVEC – do inglês, “Human umbilical vein endothelial cells”, células endoteliais de veia umbilical humana

ICAM - do inglês, “Intercellular adhesion molecule”, molécula de adesão intercelular

IFN γ - Interferon gama

Ig- Imunoglobulina

IL- Interleucina

IFN- γ – interferon gama

ip- intraperitoneal

irpm - incursões respiratórias por minuto

KC- do inglês, “Keratinocyte chemoattractant”, quimiocina derivada de queratinócito

MAPKs - do inglês, “Mitogen-activated protein kinases”, Proteínas quinases ativadas por mitógenos

MCP-1- do inglês, “Monocyte chemoattractant protein-1”, proteína quimiotática de monócitos

MIP-1 α - do inglês, “Macrophage inflammatory protein 1 α ”, proteína inflamatória de monócitos 1 alfa

mRNA - RNA mensageiro

MSP-1 - do inglês, “Merozoite surface protein 1”, proteína de superfície merozoíta-1

NF-kB - do inglês, “Nuclear factor kappa B”, fator nuclear kappa-B

NK- do inglês, “Natural killer cells”, células assassinas naturais

OMS - Organização Mundial de Saúde

OPAS - Organização Pan Americana da Saúde

PAMP - do inglês, “Pathogen-associated molecular patterns”, padrões moleculares associados a patógenos

PaO₂ - pressão arterial parcial de O₂

PBS - do inglês, “Phosphate-buffered saline”, tampão fosfato salino

PEEP - do inglês, “Positive end-expiratory pressure”, pressão positiva ao final da expiração

PfEMP-1- do inglês, "*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1",
proteína de membrana do eritrócito 1 de *P. falciparum*

PRR – do inglês, "Pattern recognition receptors", receptores de reconhecimento
padrão

PvRBSA - do inglês, "*Plasmodium vivax* reticulocyte binding surface antigen",
antígeno de superfície de ligação a reticulócitos por *P. vivax*

PGE₁- Prostaglandina E₁

PS - Polissorbato

RON5 - do inglês, "rhoptry neck protein-5"

RBP- do inglês, "Reticulocyte binding proteins", proteínas ligantes de reticulócitos

RNA- do inglês, "Ribonucleic acid", Ácido ribonucleico

ROS - do inglês, "Reactive oxygen species", espécies reativas de oxigênio

SDRA- Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

SDS- Dodecil sulfato de sódio

SIH – Sistema de Informações Hospitalares

SIM – Sistema de Informações sobre Mortalidade

SUS - Sistema Único de Saúde

SVS- Secretaria de vigilância em saúde

TGF- β - do inglês, "transforming growth factor β ", fator de transformação do
crescimento beta

TLP - do inglês, "Trap-like protein"

TLR – do inglês, "Toll like receptors", receptores semelhantes a toll

TMB - 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

TNF – do inglês, "Tumor growth factor", fator de necrose tumoral

TXA₂- Tromboxano A₂

V' – Fluxo aéreo

VCAM- do inglês, "vascular cell adhesion molecule 1"

VCG-I - "Vivax Colombia Guaviare-I"

VT - Volume corrente

vWf- Fator de von Willebrand

1. Introdução

1.1. Malária: epidemiologia e aspectos socioeconômicos

A malária é uma doença parasitária de alta prevalência e distribuição global, que acomete principalmente a população da África subsaariana e regiões de clima tropical e subtropical, e representa um grande desafio ao nível de saúde pública. Sua atividade sazonal e distribuição geográfica estão relacionadas a fatores climáticos e a capacidade da região afetada para controlar a doença [1].

Durante a implementação do Programa de Erradicação da Malária, lançado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) na década de 1950, cerca de 79 países conseguiram eliminar a doença. Tais resultados foram obtidos em regiões extratropicais, em especial na Europa, Ásia, e América do Norte, o que demonstra a dificuldade de eliminação da doença em locais com condições climáticas favoráveis ao vetor da malária [2]. Mudanças drásticas no ecossistema e no clima decorrentes das atividades humanas intensificaram o aquecimento global nas últimas décadas e favorecem o aumento da incidência de doenças transmitidas por vetores, como a malária [3]. De fato, o aumento da temperatura pode influenciar o período de incubação do parasita e, por sua vez, aumentar a transmissão da malária. Altas temperaturas afetam o tempo de vida e favorecem o crescimento e atividade dos mosquitos, o que pode justificar a relação entre o aumento da temperatura com o aumento da transmissão da doença em algumas regiões [4].

Outros fatores podem influenciar a distribuição epidemiológica da malária, apesar dos programas e metas estipulados pelos países endêmicos e ao nível global. Dentre esses fatores, os fluxos migratórios populacionais relacionados a oportunidades de trabalho, mudanças no ecossistema e nas práticas agrícolas, incluindo a construção de represas e esquemas de irrigação, o desmatamento, bem como a instabilidade política e o enfraquecimento dos sistemas de saúde pública, em especial nos países com piores indicadores socioeconômicos [5].

As iniciativas lançadas após a descontinuação do Programa de Erradicação da Malária, que ocorreu entre 1955 e 1969, tiveram ênfase em questões relacionadas ao desenvolvimento de tecnologias voltadas ao tratamento da doença e controle do vetor. As pesquisas realizadas visavam especialmente a compreensão dos mecanismos biológicos do vetor e de transmissão da doença, desenvolvimento de estratégias de controle, como o uso de redes tratadas com inseticidas, e o estudo de novas drogas antimaláricas [6]. No entanto, esse período foi marcado pela

redução de investimentos e apoio para o controle da malária especialmente nos estados recém-independentes da África, nos quais não havia sistemas de saúde e atenção primária consolidados [5]. Conseqüentemente, houve um aumento do número de casos de malária na década de 1990, levando à criação de novos programas como o “Roll Back Malaria”, em 1998 e o Plano Global de Ação contra a Malária, em 2008 [5-7].

O controle e eliminação da malária são marcados por disparidades socioeconômicas entre países e por desigualdades ao nível regional. Nesse contexto, é notória a relação entre o desenvolvimento socioeconômico e a capacidade de controle e eliminação da doença. Isso se deve a fatores como acessibilidade aos serviços de saúde, em especial por grupos vulneráveis, que continuam a ser marginalizados [7]. Não obstante, a África subsaariana possui os indicadores mais críticos em relação ao número de casos: em 2016, 53% da população estava em risco de contrair malária, representando um aumento de 30% em relação a 2010 [8]. Apenas nessa região, dois países - Nigéria e a República Democrática do Congo - concentram mais de 35% das mortes associadas à malária no mundo. Nesses países, os programas de malária têm como objetivo a redução da incidência e da mortalidade da doença [7].

Segundo o “World Malaria Report”, divulgado pela OMS em 2018, estima-se que 219 milhões de casos da doença ocorreram em 2017, levando a óbito aproximadamente 435.000 pessoas [9]. Desse total, 70% dos casos fatais atingem crianças com menos de 5 anos. Além disso, dados publicados pela OMS em 2016 revelam que a malária ainda é endêmica em 91 países e 17 países eliminaram a doença entre os anos de 2000 e 2016 [8] (Figura 1.1.1).

Distribuição global da malária

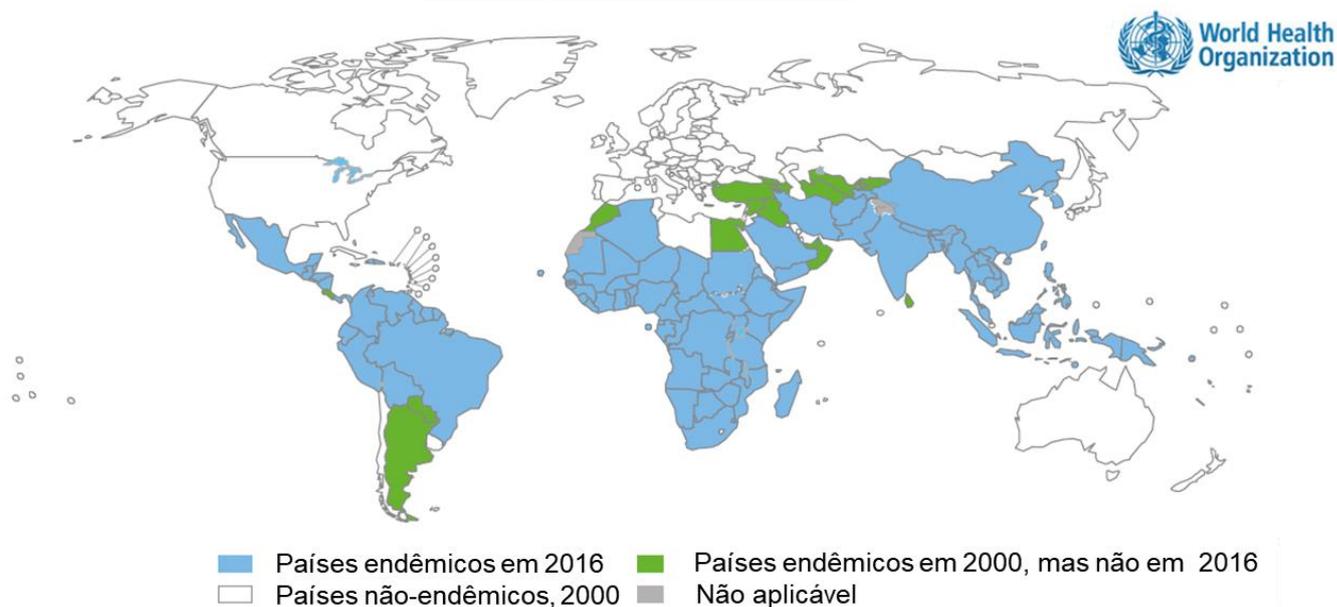


Figura 1.1.1 Países endêmicos para malária: diferenças entre os anos 2000 e 2016.

Considera-se que os países sem casos autóctones durante 3 anos consecutivos eliminaram a malária. (Adaptado de: “World Malaria Report”, OMS, 2016).

Em relação à natureza da infecção, o *Plasmodium falciparum* é responsável pela maioria dos casos ao nível global, abrangendo aproximadamente 99,7% dos indivíduos diagnosticados na África, 69% no leste Mediterrâneo e 62,8% no sudeste Asiático. Em contrapartida, os casos notificados de infecção por *P. falciparum* na América Latina correspondem a 25,9% do total, enquanto a infecção pelo *Plasmodium vivax* apresenta uma incidência de 74,1% [9]. Por ser epidemiologicamente heterogênea, a América Latina é caracterizada pela menor transmissão da malária e focos altamente endêmicos em algumas áreas [10]. A caracterização do perfil epidemiológico é importante para a determinação de estratégias de controle e eliminação da doença, de acordo com as especificidades da região endêmica.

Em 2017, cinco países registraram aumento nos casos: Brasil, Equador, México, Nicarágua e Venezuela. Cuba e Costa Rica relataram casos autóctones e Honduras registrou casos de malária em uma área onde os casos não haviam sido detectados recentemente [11]. Em contrapartida, alguns países na América Latina têm obtido progresso no controle e eliminação da doença, como a Argentina, Belize, Costa Rica, Equador, El Salvador, México e Suriname [9]. A distribuição

epidemiológica de casos confirmados de malária na América Latina é detalhada na figura 1.1.2.

Casos confirmados de malária por 1000 habitantes, 2017

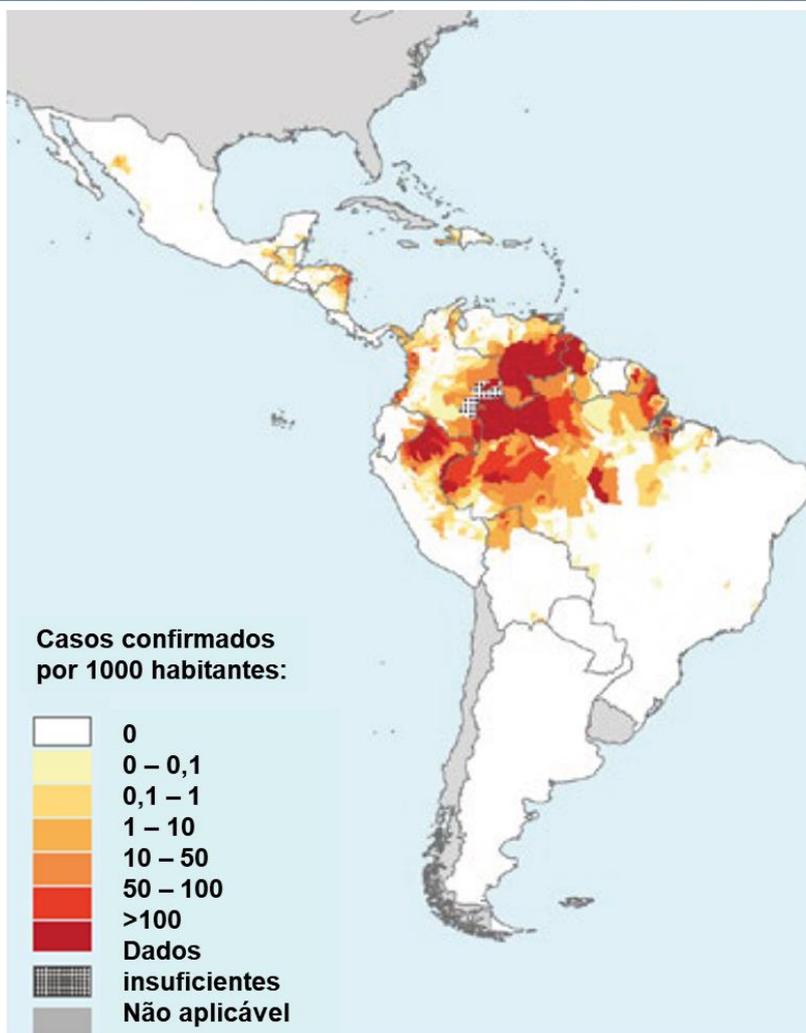


Figura 1.1.2 Número de casos confirmados de malária por 1000 habitantes em 2017.

Perfil epidemiológico das Américas mostrando a distribuição regional de casos confirmados, por intensidade da cor no mapa. (Adaptado de: “World Malaria Report”, OMS, 2018).

No Brasil, o número de casos de malária aumentou drasticamente nos últimos anos. Em janeiro de 2018, a Organização Pan Americana da Saúde (OPAS) publicou um boletim de atualização epidemiológica nas Américas, no qual o número de casos registrados de malária subiu de 117.832 em 2016 para 174.552 em 2017, representando um aumento de 48%. Já segundo o Ministério da Saúde, este aumento chegou a 59% em relação a meta estipulada para 2017 (Figura 1.1.3). Além disso, o Ministério da Saúde divulgou indicadores de casos autóctones de malária no Brasil, no qual foi constatado um aumento de 70.018 casos registrados

de janeiro a junho de 2017 para 88.565 no mesmo período de 2018, correspondendo a 26% a mais de indivíduos infectados [12]. A maior incidência de casos nos últimos anos incidiu em um aumento de 32% do número estimado de óbitos na América Latina entre 2010 e 2017, de 475 para 625 mortes. Nesse mesmo período, os recursos destinados para controle e tratamento da malária foram reduzidos de 218 milhões de dólares em 2010 para 168,1 milhões de dólares em 2017, um corte de 23% [9].

Distribuição dos casos autóctones de malária no Brasil, 2004 a 2017

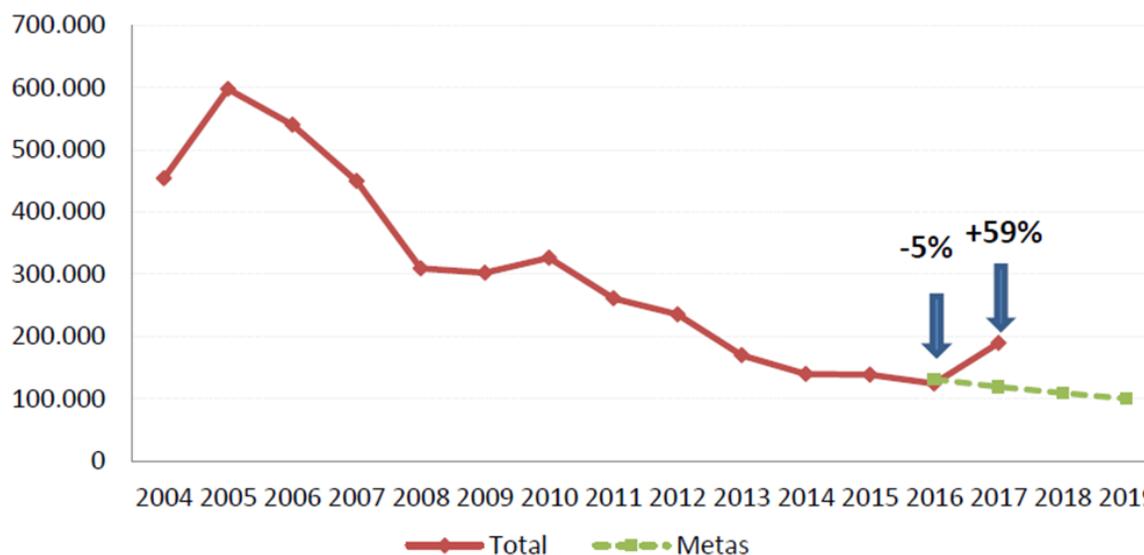


Figura 1.1.3 Distribuição de casos autóctones de malária no Brasil, entre 2004 e 2017.

Valores absolutos de casos registrados de malária no país, de acordo com o Ministério da Saúde. Foi registrado uma redução percentual de 5% de casos em 2016 em relação à meta e um aumento de 59% em relação ao estipulado para 2017. Fonte: Situação epidemiológica da malária, Ministério da Saúde, 2018.

De acordo com o Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SIH/SUS) e com o Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM), em 2017 foram registradas 2064 internações hospitalares e 34 óbitos por malária no país [13, 14]. A fim de reduzir a mortalidade em áreas endêmicas, a OMS recomenda a implementação de estratégias de controle e eliminação da malária. Dentre elas, recomendam-se o controle de vetores, utilização de tratamento profilático em gestantes e crianças em idade de risco e diagnóstico precoce da doença. Apesar disso, estima-se que 3,2 milhões de pessoas em 91 países correm risco de ser infectadas pelo parasita e desenvolver a doença [15].

1.2. Agentes etiológicos e transmissão

A transmissão da malária em humanos ocorre por meio da picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*, pertencente à ordem Diptera e família Culicidae, infectadas pelo protozoário do gênero *Plasmodium*. Considerando que o anofelino é o vetor exclusivo do *Plasmodium* em mamíferos, o estudo de medidas de controle do vetor se torna fundamental para reduzir a prevalência da malária. Além disso, a identificação da espécie predominante da região é importante para o planejamento de estratégias de controle da transmissão da doença, tendo em vista que dentre as 460 espécies descritas no gênero *Anopheles*, apenas cerca de 60 são hospedeiros durante o ciclo sexuado do parasita [16]. Estas compreendem os subgêneros *Anopheles*, *Cellia*, *Kerteszia* e *Nyssorhynchus*, dos quais o subgênero *Cellia*, apesar de ser o mais popular, é encontrado apenas no Velho Mundo, e os outros três subgêneros são encontrados na América do Sul [17].

Na África, os principais vetores são o *Anopheles gambiae*, *An. coluzzii*, *An. arabiensis* e o *An. funestus*. Os três primeiros são membros do complexo *An. gambiae*, que também inclui outras espécies como *An. bwambae*, *An. melas*, *An. merus*, *An. quadriannulatus* e o *An. amárico*, que apresentam diferenças comportamentais, ecológicas e genéticas que podem influenciar sua capacidade vetorial. Já o *Anopheles funestus* pertence ao grupo *Funestus*, que inclui outras 13 espécies africanas [18].

A transmissão da malária ocorre através de vetores com diferentes características eco-epidemiológicas e variam em cada região. A maior diversidade de vetores no Brasil é documentada na Amazônia, onde há predominância do subgênero *Nyssorhynchus*. Apesar dessa diversidade, recentemente foram descritos três sistemas de transmissão no território nacional, nos quais predominam diferentes espécies do mosquito anofelino. O *An. darlingi* é principal vetor encontrado na Floresta Amazônica, onde também é relatada a presença do *An. albitarsis*, *An. braziliensis*, *An. argiritraxis*, *An. nunesztovari*, *An. oswaldoi* e do *An. triannulatus*. O segundo sistema de transmissão compreende a região litorânea, desde o Amapá e estendendo-se até o estado de São Paulo. Nela, a transmissão ocorre principalmente pelo *An. aequalis*, que se reproduz exclusivamente em águas salobras. Esse sistema de transmissão se sobrepõe a um terceiro, situado em região de mata Atlântica mais densa, entre os estados do Espírito Santo e Rio Grande do Sul, no qual as espécies mais comuns são o *An. cruzii* e o *An. bellator* [17] (Figura

1.2.1). No Pantanal, além de *An. darlingi*, outros anofelinos como o *An. triannulatus* e *An. albitarsis* foram observados em frequências relativamente altas [19].

Outro fator relacionado ao padrão de infecção ao nível global é a temperatura da região, que pode afetar desde o tempo de eclosão de ovos até o desenvolvimento do parasita. Por exemplo, os ovos do *An. Gambiae*, um dos principais vetores da África eclodem preferencialmente em temperaturas entre 24°C e 30°C, temperatura semelhante a ideal para o desenvolvimento parasitário, que varia de 25°C a 30°C. Estes demoram aproximadamente 12 dias para se desenvolver à temperatura de 25°C. Entretanto, a 20°C, esse período pode durar mais de 30 dias. Assim, a taxa de transmissão da malária tende a aumentar em regiões com temperaturas mais elevadas [4, 20].

Mapa dos sistemas de transmissão da malária no Brasil

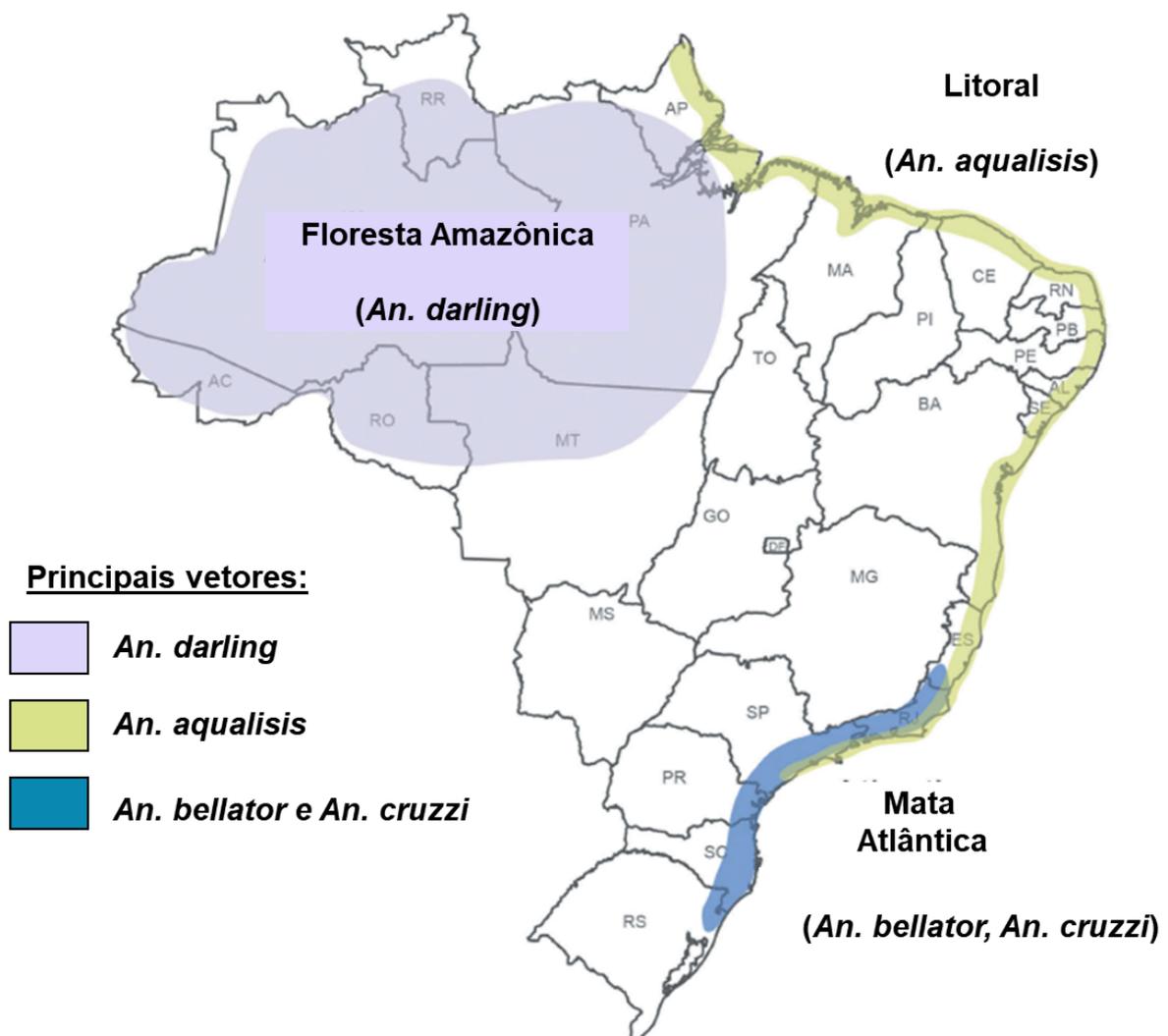


Figura 1.2.1 Mapa dos principais vetores da malária no Brasil, por região.

A floresta amazônica compreende 99% dos casos de malária, cujo principal vetor da região é o *An. darlingi*. Na Mata Atlântica encontram-se os mosquitos associados às bromélias *An.*

bellator e *An. cruzii*. E, no litoral, a transmissão ocorre pelo *An. aquasalis*. Adaptado de CARLOS *et al.*, 2019 [18].

Em seres humanos, a infecção envolve cinco espécies, sendo as mais comuns, o *P. falciparum* e o *P. vivax*. Também são relatados casos de transmissão por *P. ovale* e *P. malariae*, e em partes do sudeste da Ásia por *P. knowlesi* [21]. Um estudo publicado em 2004 relatou 120 casos de infecções por *P. knowlesi* até então descrito como capaz de infectar macacos, erroneamente diagnosticados por microscopia, sendo confundidos com *P. malariae* [22]. Além das cinco espécies descritas acima, em 2017 foram registrados casos autóctones de transmissão por *P. simium* no sudeste brasileiro, em região de mata Atlântica. Estes casos a princípio eram atribuídos a infecções por *P. vivax*, devido à similaridade de sintomas e o diagnóstico diferencial se deu por análise molecular das amostras [23].

O padrão de distribuição das espécies de plasmódio associadas aos casos de malária em determinadas regiões pode ter relação com a herança genética da população local. Por exemplo, apesar da infecção por *P. vivax* ser a mais comum na América Latina, casos de malária por *P. falciparum* são predominantes em áreas com populações de descendência africana, como as costas do Pacífico e do Caribe. Esses indivíduos não possuem o antígeno do grupo sanguíneo Duffy, no qual o *P. vivax* se liga para invadir as hemácias, e, portanto, são resistentes à infecção por essa espécie. Já na bacia amazônica, com populações indígenas, há uma predominância de infecções por *P. vivax*. A predominância dessas espécies pode, no entanto, variar de acordo com o fluxo migratório da população nessas áreas [10].

1.3. Ciclo da doença

O ciclo de vida de todas as espécies de parasitas da malária humana é caracterizado por uma fase sexual exógena, denominada esporogonia, que ocorre no mosquito anofelino e uma fase assexual endógena, denominada esquizogonia, realizada no hospedeiro vertebrado [24]. O ciclo parasitário no hospedeiro vertebrado se inicia durante o repasto sanguíneo, no qual o mosquito infectado inocula o parasita na fase esporozoíta na derme. Nessa fase, cerca de 10 a 100 esporozoítas são inoculados e, em seguida, penetram nos vasos sanguíneos e/ou linfáticos [25]. O processo de migração dos esporozoítos dura de 1 a 3 horas e ocorre por motilidade de deslizamento, um processo aleatório que permite que uma proporção alcance e penetre um vaso sanguíneo para entrar na corrente sanguínea.

Nessa etapa, a chamada “Trap-like protein” (TLP) desempenha um papel fundamental para a saída da derme, uma vez que os esporozoítos mutantes para esta proteína não conseguem entrar na circulação. Aqueles que entram na corrente sanguínea alcançam rapidamente o fígado por um processo conhecido como travessia, no qual o parasita atravessa a barreira sinusoidal, que compreende as células endoteliais fenestradas e as células de Kupffer [26]. Após a invasão do hepatócito, os esporozoítos formam o vacúolo parasitóforo, no qual ocorre sua fase de reprodução assexuada - denominada estágio pré-eritrocítico ou esquizogonia. Nela, os esporozoítos passam por uma fase de maturação em trofozoítos, e em seguida, em esquizontes. Os esquizontes são capazes de produzir milhares de merozoítos, que são liberados através de estruturas vesiculares denominadas merossomas [21, 25].

Nesta primeira etapa da infecção o indivíduo infectado não apresenta sintomas da doença. Algumas diferenças entre as espécies do plasmódio são observadas tanto no estágio pré-eritrocítico quanto no ciclo eritrocítico, afetando o desenvolvimento da doença em humanos. O período de duração do ciclo pré-eritrocítico na infecção por *P. falciparum*, por exemplo, varia entre 5 e 7 dias. Já em indivíduos infectados pelo *P. vivax*, esse período varia entre 6 a 8 dias. Na infecção por *P. malariae*, a duração é de 14 a 16 dias e em casos de infecção por *P. ovale*, esse período é de 9 dias [27].

A quantidade de merozoítos liberados através dos merossomas também pode variar. Enquanto na infecção por *P. falciparum* e *P. vivax* são liberados 30.000 e 10.000 merozoítos, respectivamente, nas infecções por *P. malariae* e *P. ovale* ocorre a liberação em média de 15.000 merozoítos pelo esquizonte [28].

Posteriormente, inicia-se o ciclo eritrocítico da malária, na qual os merozoítos livres na corrente sanguínea invadem as hemácias e se replicam. As principais proteínas parasitárias que medeiam as interações com os receptores do hospedeiro durante a invasão dos eritrócitos estão localizadas no complexo apical. Após a ligação ao eritrócito, o merozoíto reorienta-se de tal forma que sua extremidade apical, que é marcada pela presença de organelas ligadas à membrana chamadas micronemas e roptrias, permanece voltada para o eritrócito. Dentre as proteínas-alvo do hospedeiro nas quais o parasita se liga podemos citar as proteínas do sistema sanguíneo Duffy, as glicoforinas A, B e C (GPA, GPB e GPC) e a banda 3 [29].

A duração do ciclo eritrocítico também varia de acordo com a espécie causadora da infecção. Tal ciclo se repete a cada 48 horas nas infecções por *P.*

vivax, *P. falciparum* e *P. ovale*, a cada 72 horas nas infecções por *P. malariae* e em apenas 24 horas para *P. knowlesi* [30]. Este processo de multiplicação celular nas hemácias é denominado esquizogonia eritrocitária. Ao final desse período, os eritrócitos se rompem e liberam novos merozoítos, que invadem outras células. A parasitemia no sangue periférico varia de acordo com a espécie causadora da infecção. Quando ocasionada pelo *P. falciparum*, a parasitemia frequentemente ultrapassa 50.000 hemácias infectadas por microlitro de sangue. Entretanto, a infecção por *P. vivax* resulta em uma menor quantidade de parasitas no sangue periférico. Inicialmente, os níveis encontrados são de aproximadamente 10 parasitas/ μL . O pico da parasitemia acontece entre 5 a 7 dias após o início dos sintomas, e o número de parasitas é inferior a 12.000/ μL [31].

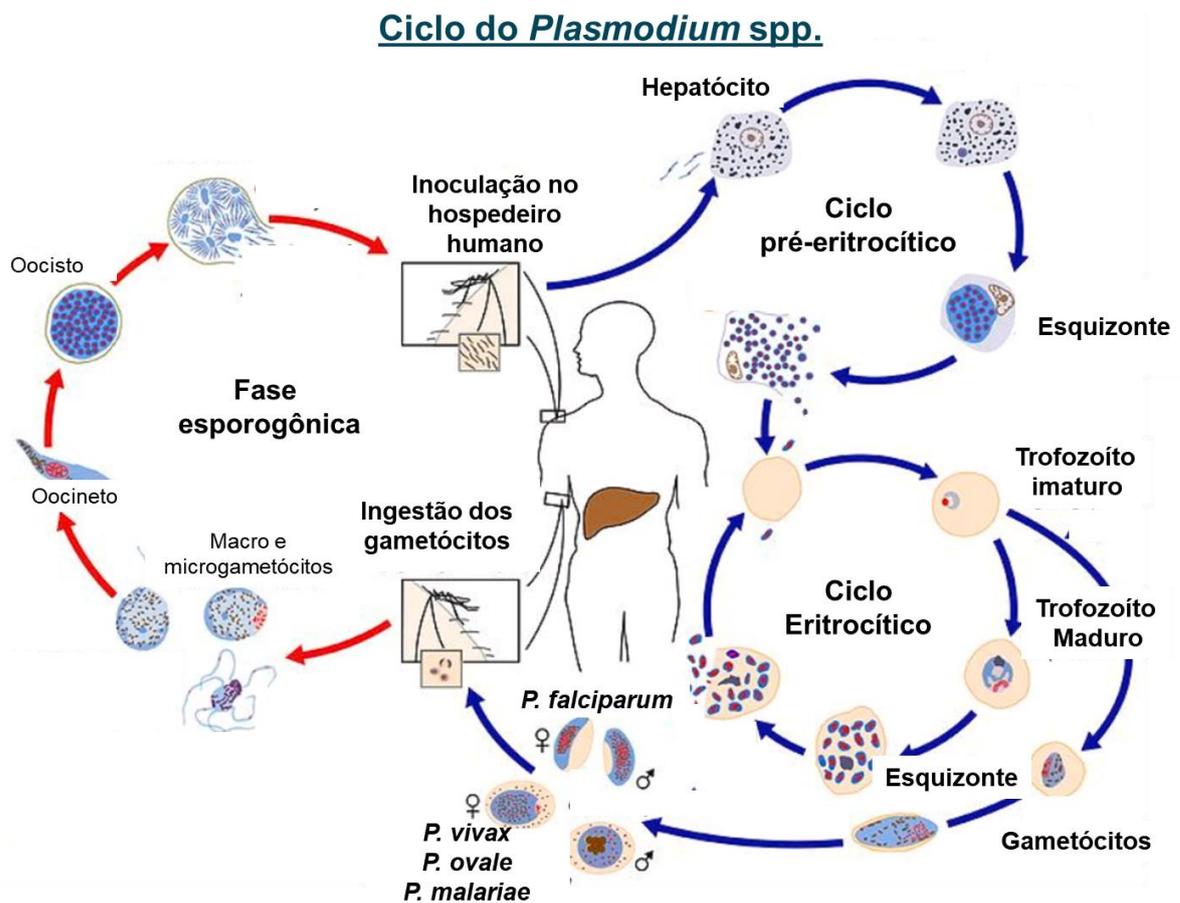


Figura 1.3.1 Ciclo do *Plasmodium* spp.

Representação esquemática da fase sexuada, denominada fase esporogônica, e assexuada, que compreende a fase pré-eritrocítica e o ciclo eritrocítico, da reprodução do plasmódio no hospedeiro humano. Durante a alimentação, a fêmea infectada do mosquito anofelino inocula os esporozoítas no hospedeiro humano. Estes alcançam o fígado e podem infectar os hepatócitos. Em seguida, os esporozoítas se transformam em esquizontes hepáticos. Os esquizontes hepáticos se rompem e os merozoítos são, então, liberados na corrente sanguínea a partir de estruturas vesiculares – os merossomas. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale* ocorre a formação de hipnozoítas, que são formas latentes responsáveis pelas recaídas da doença. Os merozoítos liberados invadem os eritrócitos, iniciando assim o

ciclo eritrocítico. Após essa invasão, os merozoítos passam para o estágio de anel, depois trofozoíto maduro e esquizonte, culminando com a ruptura da hemácia e a liberação de novos merozoítos na circulação. Esses merozoítos invadem novos eritrócitos dando continuidade ao ciclo eritrocítico. Alguns parasitas na forma anel se diferenciam em gametócitos masculino e feminino. Ao serem ingurgitados pela fêmea do mosquito durante a alimentação, os gametócitos masculino e feminino se diferenciam no estômago do inseto em microgameta e macrogameta, respectivamente. O ciclo assexuado culmina na ruptura do oocisto, e liberação dos esporozoítos responsáveis pela infecção em humanos. Adaptado de CDC, disponível em: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>.

Alguns parasitas na fase eritrocítica se diferenciam em sua forma sexuada, denominada gametócito. Esses gametócitos são ingeridos pelo anofelino, no qual ocorre o ciclo sexuado do parasita, conforme mostrado na figura 1.3.1. A multiplicação do plasmódio no hospedeiro humano ocorre por mitose. Já a recombinação genética acontece apenas no mosquito [21].

A compreensão relativamente limitada da epidemiologia do *P. vivax* está relacionada a algumas peculiaridades relacionadas à espécie. A malária por *P. vivax* é caracterizada pela infecção de hemácias imaturas – os reticulócitos, e consequentemente, por baixa parasitemia [32]. Além disso, o parasita possui uma fase de latência no fígado, sob a forma de hipnozoíta. Nela, os hipnozoítas permanecem em quiescência por meses, e podem causar reincidência da doença [31]. Por último, ao contrário do *P. falciparum*, ainda não existe um sistema de cultivo in vitro de *P. vivax*, o que limita o estudo aprofundado sobre mecanismos de invasão aos reticulócitos e de resposta imune à infecção [32].

1.4. Fisiopatologia da malária

A compreensão dos mecanismos relacionados a patogênese da malária é importante para a determinação de novos alvos terapêuticos, e elucidação acerca da resistência aos antimaláricos disponíveis atualmente para tratamento da doença. Os mecanismos centrais na fisiopatologia da malária envolvem a interação das hemácias infectadas com o endotélio em alguns órgãos, a liberação de toxinas e outras moléculas bioativas, e o processo inflamatório gerado a partir desses subprodutos, pela produção local e sistêmica de mediadores inflamatórios e recrutamento de células inflamatórias ao sítio de lesão [33].

Após a invasão das hemácias, o plasmódio é capaz de remodelar a célula hospedeira através de alterações no citoesqueleto e inserção de proteínas derivadas do parasita modificando a superfície celular [34]. Dentre elas, no caso de infecção pelo *P. falciparum*, destaca-se a proteína de membrana do eritrócito 1 (*PfEMP1*),

relacionada a adesão da hemácia infectada ao endotélio, que impede sua destruição no baço e pode levar à obstrução de microvasculatura. A PfEMP1 possui domínios que permitem sua ligação à diferentes receptores do hospedeiro como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM1), a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM1), sulfato de condroitina A (CSA), selectina E (ou CD62-E), CD31 e o CD36 [33]. Essa interação com diferentes moléculas de adesão faz com que a atividade da PfEMP1 no cérebro e na placenta esteja implicada na patogênese da malária grave em adultos e mulheres grávidas [35]. No caso da citoaderência placentária, uma variante do PfEMP1 denominada VAR2CSA medeia sua ligação ao CSA. Nesses casos, os efeitos dessa ligação podem ser agravados em mulheres na primeira gestação [36].

Outras moléculas presentes no plasmódio também possuem papel importante em mecanismos de invasão celular. No caso da infecção pelo *P. vivax*, algumas proteínas têm sido mais amplamente estudadas como a proteína de ligação em Duffy (DBP), as proteínas ligantes de reticulócitos (RBP), a proteína de superfície merozoíta-1 (MSP-1) e a “rhoptry neck protein-5” (RON5) [37]. A mais amplamente estudada é a DBP, localizadas em organelas denominadas micronemas e são liberadas para a superfície do merozoíto do *P. vivax* e do *P. knowlesi* apenas no momento da invasão das hemácias, quando se ligam ao receptor de antígeno para quimiocinas Duffy (DARC) [38].

Recentemente, um estudo identificou *in silico* e em amostras de *P. vivax* da cepa “Vivax Colombia Guaviare-I” (VCG-I) o antígeno de superfície de ligação a reticulócitos por *P. vivax* (PvRBSA). Nesse estudo, foi demonstrado que o PvRBSA, apesar de também se ligar a hemácias maduras, possui uma interação muito maior com reticulócitos [39]. Essa descoberta ajuda a elucidar os mecanismos de invasão do *P. vivax*, espécie responsável pela maioria de casos de malária na América Latina.

As hemácias infectadas podem se ligar a hemácias não-infectadas, formando rosetas. Nessas circunstâncias, as hemácias não-infectadas mais rígidas, exacerbando a obstrução microvascular. Tal processo é um fenômeno heterogêneo que ocorre através de diferentes moléculas ligantes, como o grupo sanguíneo ABO e o CD36, e moléculas solúveis, como imunoglobulinas e glicoconjugados sulfatados, de acordo com os quais o grau de formação de rosetas é modificado [40]. As imunoglobulinas G e M encontram-se associadas a estruturas fibrilares elétrondensas detectáveis por microscopia eletrônica e estão relacionadas a ligação entre

hemácias infectadas e não-infectadas. Estas estruturas fibrilares são observadas na superfície das hemácias infectadas presentes na microvasculatura cerebral de amostras de autópsia em contato tanto com o endotélio quanto com hemácias não-infectadas e parecem ter relação com a virulência do parasita [41].

A PfEMP1 expressa um sub-grupo de adesinas que se ligam a essas moléculas presentes nas hemácias infectadas. No caso da ligação a proteínas do grupo sanguíneo ABO, destaca-se a adesina VarO, que possui preferência pelo grupo sanguíneo A em relação aos grupos B e O [42]. Essas adesinas também se ligam ao receptor do complemento 1 (CR1) / CD35, que possui um papel importante na formação de rosetas. Nesse contexto, um polimorfismo de CR1 comum na população africana (SI (a-)) está relacionado a uma menor ligação de um dos domínios da PfEMP1 a hemácias não parasitadas e, conseqüentemente, a uma proteção contra a malária grave [40].

Outra molécula importante na patogênese da malária é o CD36, expresso em plaquetas, monócitos maduros e macrófagos, precursores eritroides. Sua expressão em monócitos presentes no baço permite o “clearance” do parasita por este órgão. Entretanto, a sua presença em plaquetas e no endotélio leva a formação de aglomerados ricos em plaquetas que podem ocasionar obstrução ou suboclusão da microvasculatura [43]. Foi demonstrado que plaquetas expressando CD36 em sua superfície formam uma espécie de ponte entre hemácias infectadas e o endotélio [44]. Nessa circunstância, as plaquetas se ligariam ao endotélio através do fator de von Willebrand e com as hemácias parasitadas via CD36 e estariam relacionadas ao seu aumento de adesão vascular [45].

O sistema imune inato do hospedeiro vertebrado é capaz de identificar componentes microbianos de diferentes naturezas através de receptores de reconhecimento padrão (PRR). No caso da infecção pelo plasmódio, dois padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) possuem papel fundamental na fisiopatologia da malária, sendo identificados e reconhecidos pelas células da imunidade inata: o glicosilfosfatidilinositol (GPI) e a hemozoína (ou pigmento malárico) [46, 47].

Os GPIs são glicolipídios evolutivamente conservados presentes na membrana celular de eucariotos, que contribui direta e indiretamente na fisiopatologia da malária. Eles estão presentes de forma abundante em especial em parasitas protozoários patogênicos, como *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Toxoplasma*. Ele é reconhecido pelo hospedeiro através de receptores semelhantes

a toll (TLR) do tipo 2 e 4 presentes na superfície de células dendríticas, macrófagos e células endoteliais [48, 49]. Além disso, ele pode ativar a resposta de células “Natural Killer” (NK), ligando-se ao receptor CD1d [33]. Indiretamente, ele é responsável por ancorar diversas proteínas que irão modular a resposta imune ao parasita, bem como a virulência do plasmódio. O GPI também pode induzir a expressão de genes que codificam mediadores inflamatórios em macrófagos, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), as interleucinas (IL) IL-1, IL-6, e o interferon gama (IFN- γ), além do óxido nítrico (NO) [33, 47].

Os cristais de hemozoína, também conhecidos como pigmento malárico, são formados pelo plasmódio a partir do metabolismo do heme nas hemácias infectadas. A síntese da hemozoína funciona como um mecanismo de detoxificação do heme, a partir da sua cristalização [50]. Esse processo ocorre durante o estágio eritrocítico, no qual o plasmódio digere no interior de seu vacúolo digestivo cerca de 60% a 80% da hemoglobina presente na hemácia através de enzimas proteolíticas como as plasmepsinas I e II, a protease histoespasmática, as falcipainas e a falcilisina [51, 52]. No entanto, apenas 16% dos aminoácidos provenientes do processo digestivo da hemoglobina são utilizados pelo parasita. Isso é justificado pela grande saída de aminoácidos de células infectadas e a baixa densidade das mesmas em comparação com hemácias não-infectadas [53]. Além disso, especula-se que a degradação da hemoglobina também pode servir para criar espaço para o crescimento do parasita na hemácia, bem como para equilíbrio osmótico [50, 52].

Outra molécula cuja liberação tem impacto na modulação da resposta inflamatória e estresse oxidativo na malária é o heme. Ele é ubiquamente expresso como um grupo prostético que participa de processos biológicos essenciais, como transporte de gás e transferência de elétrons. No entanto, quando liberado no meio extracelular, o heme atua como um padrão molecular associado ao dano (DAMP) na malária, possuindo efeitos deletérios aos lipídios, proteínas e DNA [54, 55]. Seus efeitos citotóxicos diretos se devem a peroxidação de lipídeos e desestabilização da membrana celular, levando a um aumento de permeabilidade e chance de lise celular [56]. O estímulo com heme em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) induz a expressão de heme oxigenase 1 (HO-1), como resposta regulatória ao estresse oxidativo, e de moléculas de adesão como a ICAM-1, a VCAM-1 e a selectina-E, relacionadas a transmigração de leucócitos. Nesse contexto, o heme induz a migração de neutrófilos, funcionando como um fator

quimiotático e é responsável pela ativação de macrófagos, induzindo a produção de TNF, IL-1 β , KC e leucotrieno B4 [56,57].

Células do sistema imune inato, como os monócitos, as células dendríticas (DCs) e os macrófagos desempenham papéis fundamentais durante a infecção por *Plasmodium* spp. Esse processo pode ocorrer de diferentes formas, culminando em respostas específicas para cada tipo de reconhecimento pelos macrófagos ou monócitos [52, 53].

Um processo importante para o reconhecimento das hemácias infectadas pelo sistema imune ocorre pela inserção de proteínas na superfície das hemácias infectadas após a invasão do merozoíto. A partir disso, o reconhecimento pelos fagócitos pode ocorrer pela interação direta entre a hemácia infectada e receptores presentes na superfície celular, culminando em sua fagocitose; pelo reconhecimento de forma indireta, através da opsonização destas hemácias, também culminando na fagocitose das mesmas; pelo reconhecimento de moléculas liberadas pelo parasita como a hemozoína e o GPI, levando à liberação de citocinas pró-inflamatórias; e pela interação com merozoítos opsonizados por anticorpos, via receptores Fc γ , como mostrado na figura 1.4.1 [58].

Mecanismo de interação das hemácias infectadas com macrófagos e monócitos

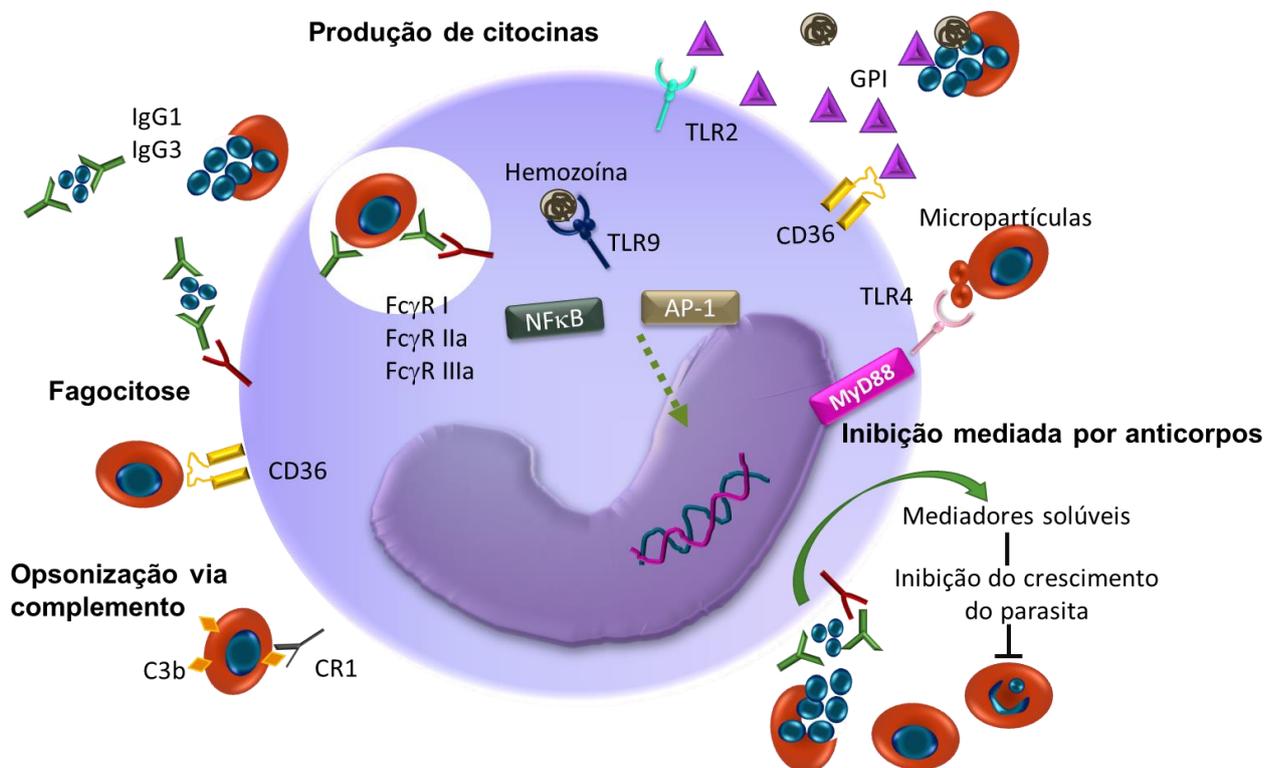


Figura 1.4.1 Mecanismos de interação das hemácias infectadas com os macrófagos e monócitos.

Macrófagos e monócitos podem realizar o “clearance” de parasitas no organismo por fagocitose tanto diretamente quanto a partir de hemácias infectadas opsonizadas por moléculas do sistema complemento. Merozoítos opsonizados por anticorpos também são reconhecidos e esse processo medeia a liberação de mediadores solúveis que inibem o crescimento do parasita. Este por sua vez pode liberar moléculas como a GPI e micropartículas, que também são reconhecidas via CD36, TLR2 e TLR4 e desencadear a produção de citocinas GPI= glicosilfosfatidilinositol, TLR= Receptores semelhantes a toll. Adaptado de CHUA *et al.*, 2013 [58].

A fagocitose de hemácias infectadas pode ocorrer através da interação com o receptor CD36 presente na superfície do fagócito. Assim, mutações nesse receptor têm sido relatadas em algumas populações na África e sido associadas à suscetibilidade à malária [59]. Apesar disso, a relação entre CD36 e a patogênese da malária também pode ter efeitos deletérios considerando que esse receptor é expresso em outros tipos celulares, conforme já descrito acima. Outro mecanismo de fagocitose envolve o sistema complemento, que desempenha um papel crítico na neutralização de parasitas invasores, mas cuja ativação excessiva pode resultar em agravos na doença. As hemácias infectadas podem ser opsonizadas por moléculas do sistema complemento como o C3b e serem reconhecidas pelos fagócitos. Apesar do “clearance” parasitário, esse mecanismo pode resultar em lise celular e contribuir para o agravamento da CM, malária placentária e anemia grave [60]. Em contrapartida, a ausência da molécula C5 foi relacionada ao não desenvolvimento dessa complicação e o bloqueio da via de sinalização através do receptor C5a (C5aR) a sobrevida na CM experimental [61].

A fagocitose de componentes parasitários opsonizados por anticorpos depende do tipo de receptor $Fc\gamma$ expresso pelas diferentes subpopulações de monócitos. Os receptores tipo $Fc\gamma RI$ e o $Fc\gamma RIIa$ estão relacionados à fagocitose, enquanto o tipo $Fc\gamma RIIb$ possui um efeito inibitório desse tipo de resposta. O receptor $Fc\gamma RIIa$ se liga preferencialmente as imunoglobulinas IgG1 e IgG3, que são os principais isotipos relacionados a fagocitose das hemácias infectadas. Esse processo desencadeia a liberação de mediadores solúveis capazes de inibir o crescimento e proliferação de parasitas, porém os mecanismos relacionados a essa resposta imune, bem como quais mediadores são liberados ainda não foram esclarecidos [58].

A produção de citocinas inflamatórias pela resposta imune inata ocorre também em resposta a captação de hemozoína pelos monócitos, resultando no aumento da transcrição de $IL-1\beta$, $TNF-\alpha$, do antagonista de receptor de $IL-1$ ($IL-$

1RA), MIP-1 α (“macrophage inflammatory protein 1”), MIP-1 β e da quimiocina MCP-1 (“monocyte chemoattractant protein-1”) [62]. Já em relação às DCs, o estímulo com a hemozoína leva ao aumento da secreção de MCP-1, altamente produzida por DCs com fenótipo imaturo. Consequentemente, a manutenção das DCs como perfil imaturo prejudica sua função como célula apresentadora de antígeno a células T naïve, que desencadeariam a resposta imune adaptativa [63].

Além da resposta inflamatória exacerbada, a plaquetopenia é comumente observada em pacientes. Apesar disso, a atividade das plaquetas na fisiopatologia da malária ainda não é totalmente compreendida e efeitos tanto protetores quanto deletérios têm sido descritos. Como já citado acima, um de seus efeitos deletérios está associado a adesão de hemácias infectadas ao endotélio, levando a oclusão vascular. Este mecanismo já foi descrito em análises post-mortem de crianças que morreram de CM, onde foi observado significativo acúmulo de plaquetas na microvasculatura cerebral [64]. Em contrapartida, alguns estudos indicam que a adesão de plaquetas a hemácias infectadas leva a morte do parasita [65], fenômeno regulado principalmente pelo fator plaquetário 4 (PF4), por CD36 e pela expressão de antígenos de eritrócito Duffy [66]. O efeito das plaquetas na morte parasitária foi recentemente relatado em um estudo em humanos publicado por Kho e colaboradores, no qual amostras de pacientes apresentando infecção por diferentes espécies de plasmódio foram analisadas [67]. Notou-se que a agregação plaquetária a hemácias infectadas levou a morte de aproximadamente 20% dos parasitas circulantes. No caso da infecção pelo *P. vivax*, a atividade de plaquetas foi responsável pela morte de 60% dos parasitas circulantes. Assim, o PF4 liberado pelas plaquetas parece ter um papel ambivalente, de acordo com o tipo celular que responde a ele. Ao interagir com monócitos, o PF4 desencadeia a liberação de mediadores inflamatórios como o TNF- α e a IL-6 [68]. E a atividade de mediadores inflamatórios liberados pelas plaquetas em leucócitos culmina na transmigração destes para o tecido, exacerbando o processo inflamatório.

1.5. Manifestações clínicas

O quadro clínico da malária pode ser leve, moderado ou grave, de acordo com a espécie e a quantidade de parasitas circulantes, o tempo de doença e a imunidade do indivíduo. Os sintomas da malária envolvem episódios de calafrios, febre alta e sudorese, além de cefaleia, mialgia, náuseas e vômitos [67]. Os quadros de maior gravidade e que podem ser letais atingem geralmente gestantes, crianças

e primoinfectados, especialmente em infecções pelo *P. falciparum*. Os perfis da população cujos casos são fatais variam de acordo com a incidência da doença. Em áreas endêmicas, a mortalidade é maior em crianças que ainda não desenvolveram imunidade para a doença. Já nas áreas em epidemia, nas quais os surtos da doença são frequentes, os casos fatais acometem todas as idades [1].

As manifestações clínicas da malária são variáveis e podem culminar na forma não complicada ou na malária grave. Isso se deve ao contexto epidemiológico do local e ao grupo da população atingido pela doença. Por exemplo, em indivíduos imunocomprometidos, a expansão dos parasitas no ciclo eritrocítico é mais rápida, e repostas à infecção como a produção de citocinas pró-inflamatórias e adesão endotelial do plasmódio estão exacerbadas, contribuindo para o agravamento do quadro clínico [68].

O período de incubação da malária é diferente de acordo com a espécie de plasmódio responsável pela infecção, todavia ele pode chegar a vários meses em caso de infecção por *P. vivax* e *P. ovale*. Após o período de latência, surgem os primeiros sinais e sintomas que, por não serem específicos, dificultam o diagnóstico da doença. Além dos sintomas acima mencionados, o indivíduo infectado pode apresentar hepatomegalia, mais comum em crianças, além de icterícia, mais presente em adultos [21, 69].

Quando não tratada adequadamente, a parasitemia continua a aumentar e o indivíduo pode apresentar complicações associadas a malária, especialmente em infecções por *P. falciparum*. Segundo o guia publicado pela OMS em 2010, a taxa de mortalidade nesses casos é de 10 a 20%. A progressão da doença é rápida e as manifestações clínicas características englobam coma em decorrência do quadro de malária cerebral, acidose metabólica, anemia grave, hipoglicemia e insuficiência renal aguda, além de complicações respiratórias. Nessa última, a síndrome do desconforto respiratório agudo é mais comum em adultos [70].

A coinfeção do *Plasmodium* spp. com outros patógenos, incluindo o vírus da imunodeficiência humana (HIV), *Mycobacterium tuberculosis* e helmintos, é comum. Adultos coinfectados pelo HIV, por exemplo, têm um risco aumentado de ter malária grave e de evoluir a óbito. Além disso, a prevalência de coinfeção por helmintos em regiões endêmicas é muito alta podendo acometer mais de 50% da população, e está associada ao aumento da parasitemia na malária [71]. Em áreas endêmicas, a população pode ter malária múltiplas vezes e o indivíduo desenvolve imunidade

parcial para a doença. Nesses casos, a parasitemia é baixa e conseqüentemente não há ativação deletéria da imunidade inata e o quadro é assintomático [72].

1.6. Síndrome do desconforto respiratório agudo associada à malária pulmonar

Casos não complicados de malária podem envolver alguns sinais e sintomas respiratórios, como tosse seca, relatada em 20 a 50% dos pacientes, e taquipneia [70]. A evolução clínica da doença pode ocasionar acidose metabólica, com conseqüente hiperventilação, desconforto respiratório e edema pulmonar [73, 74]. Por último, a manifestação clínica respiratória mais grave na malária, a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), pode ocorrer como conseqüência de um processo inflamatório exacerbado e do sequestro dos eritrócitos infectados nos capilares e vênulas, de acordo com o tipo de infecção relacionada à complicação [72]. Nesse contexto, casos relacionados ao *P. falciparum* ou *P. knowlesi* envolvem hiperparasitemia e maior adesão de eritrócitos infectados na microcirculação pulmonar [70].

Apesar da maioria de casos graves serem resultantes majoritariamente pela infecção por *P. falciparum*, a SDRA associada a malária pulmonar é relatada em 60% dos casos complicados de infecção zoonótica por *P. knowlesi* [75]. Casos de SDRA na infecção por *P. ovale* e *P. malariae* são raros e pouco descritos na literatura. Já a infecção por *P. vivax* também está associada a SDRA, que ocorre mais tipicamente de 2 a 3 dias após o início do tratamento antimalárico e, em alguns casos, pode acometer o paciente mesmo após o “clearance” do parasita. [73].

O conceito de SDRA, descrito pela primeira vez em 1967 por Ashbaugh e colaboradores, foi atualizado em 2012 com o intuito de estabelecer critérios mais uniformes, dando maior subsídio para pesquisas clínicas e definição da conduta terapêutica ao paciente. A publicação da Definição de Berlim pela “The ARDS Task Force” classifica a SDRA em grau leve, moderada ou grave. Ademais, os critérios de temporalidade, imagem torácica, origem do edema e oxigenação são considerados [76].

Em relação a temporalidade, o paciente deve apresentar sintomas dentro de 1 semana após um insulto pulmonar conhecido, do aparecimento ou agravamento de sintomas respiratórios. A imagem torácica deve evidenciar opacidade bilateral, podendo ser identificada por radiografia ou tomografia computadorizada. Além disso, o edema pulmonar que não possui origem cardiovascular, como, por exemplo, em

insuficiência cardíaca ou reposição de fluidos. Por último, a classificação da a SDRA em leve, moderada ou grave é baseada no grau de hipoxemia, mensurada pela relação entre a pressão arterial parcial de O₂ (PaO₂) e a fração inspirada de oxigênio (FIO₂). Assim, a SDRA leve compreende uma PaO₂/FIO₂ ≤ 300 mmHg e > 200 mmHg); a moderada a relação PaO₂/FIO₂ é ≤ 200 mmHg e > 100; e na SDRA grave a PaO₂/FIO₂ ≤100 mmHg, em níveis de pressão positiva expiratória final (PEEP) ou pressão positiva contínua nas vias aéreas CPAP ≥ 5 mmHg. O aumento do espaço morto fisiológico e redução da complacência pulmonar também são observados [76].

A fisiopatologia da malária pulmonar envolve principalmente dano à barreira alvéolo-capilar, com conseqüente aumento da permeabilidade capilar. A lesão leva ao acúmulo de fluido no espaço alveolar, e injúria ao epitélio alveolar, com liberação de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de neutrófilos. A ativação destes leva à liberação de mediadores inflamatórios, espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteases [77]. Além disso, a lesão epitelial prejudica a produção de surfactante e o “clearance” do fluido extravasado para o espaço alveolar. Já a produção de ROS sobrepuja as defesas antioxidantes do organismo culmina em estresse oxidativo e injúria celular [78].

O aprisionamento de eritrócitos na microcirculação pulmonar leva à ativação endotelial e recrutamento da resposta inflamatória, causando lesão pulmonar. Tal resposta pode continuar mesmo após o tratamento com drogas antimaláricas. Ademais, a malária promove o aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , relacionado ao aumento de expressão de moléculas de adesão endotelial, além de IL-1, IL-6, e IL-8 [70].

A evolução do quadro pulmonar da malária envolve edema intersticial, espessamento do septo alveolar e redução do lúmen dos capilares. Há o acúmulo de monócitos, linfócitos e neutrófilos, hemácias infectadas e não infectadas pelo parasita que causam congestão dos capilares e são observados leucócitos e fibrina no septo alveolar [79]. Outro fator relacionado ao estímulo inflamatório ao tecido pulmonar ocorre através do acúmulo de hemozoína, que possui uma correlação positiva com o aumento do peso pulmonar e edema alveolar em modelos experimentais, além de ser um componente observado em autópsia do pulmão de crianças que sucumbiram ao quadro de malária grave na África [75].

A aderência de hemácias infectadas estimula a coagulação por ativação da trombina, que converte fibrinogênio em fibrina nos vasos sanguíneos e está associada ao aumento da inflamação. Em decorrência desse processo, observa-se

nos pulmões a perda da integridade da barreira alvéolo-capilar, devido à lesão endotelial e de pneumócitos do tipo I e II, resultando na infiltração de leucócitos, edema em alvéolo e interstício, culminando em hipoxemia grave [72, 75]. Estudos apontam que a perda da integridade de pneumócitos do tipo II desencadeia um desequilíbrio no transporte de fluídos, além de reduzir a produção de surfactante. O surfactante é constituído por um complexo de componentes dentre os quais se destacam os fosfolipídeos, além de conter proteínas, colesterol, glicolipídeos e ácidos graxos livres e mantêm a tensão superficial. Assim, a redução deste componente culmina em redução da complacência pulmonar, aumento da elastância estática pulmonar, áreas de atelectasia e extravasamento de fluido ao espaço alveolar [75, 80, 81]. Assim, a obstrução dos capilares e vênulas, juntamente com a inflamação local e lesão à barreira alvéolo-capilar, contribui no desenvolvimento da síndrome do desconforto respiratório agudo [72]. (Figura 1.6.1).

Fisiopatologia da SDR associada à malária

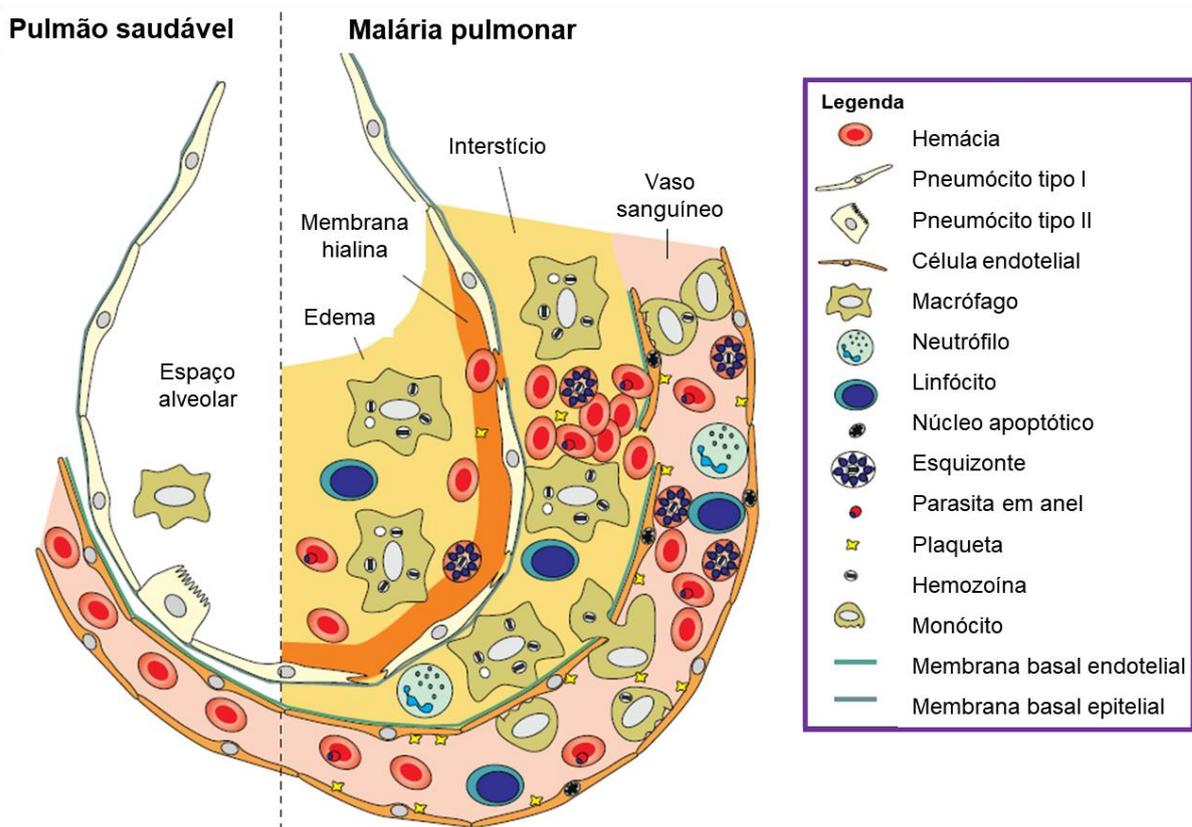


Figura 1.6.1 Fisiopatologia da síndrome do desconforto respiratório agudo associada à malária.

Sequestro de hemácias infectadas possuem um papel importante na iniciação e amplificação da imunopatologia local. Cristais de hemozoína são encontrados em fagócitos e induzem inflamação pulmonar. Ocorre abundante marginação e infiltrado de células inflamatórias, principalmente monócitos ou macrófagos, e presença de plaquetas em vasos sanguíneos, tecido intersticial e alvéolos. Lesão e apoptose das células endoteliais resultam

em aumento da permeabilidade vascular e micro-hemorragias. Note a formação de membrana hialina, edema alveolar e espessamento intersticial. Adaptado de VAN DE STEEN *et al.*, 2013 [73].

Os casos de SDRA associados à malária são mais comuns em adultos, especialmente em gestantes. A taxa de mortalidade é extremamente alta e ultrapassa 50% quando o paciente é ventilado mecanicamente e 80% quando não há suporte ventilatório mecânico [21]. Além disso, dados epidemiológicos apontam que 7 a 16% de crianças hospitalizadas com malária grave por *P. falciparum* evoluem para SDRA [70]. Apesar da alta mortalidade, alguns mecanismos relacionados à fisiopatologia da SDRA associada à malária ainda não foram totalmente elucidados.

1.7. Tratamento e medidas de controle da malária

A malária é uma doença de progressão rápida e por isso o diagnóstico apropriado, por microscopia, ou por teste rápido e início imediato do tratamento com drogas antimaláricas são cruciais. O exame da gota espessa é o método oficialmente adotado para o diagnóstico laboratorial da malária no Brasil, sendo considerado o padrão ouro para o diagnóstico da malária pela OMS. Mesmo com o avanço de outras técnicas diagnósticas, o exame da gota espessa continua sendo um método simples, eficaz, de baixo custo e de fácil realização em comparação às outras técnicas diagnósticas. No entanto, onde o acesso a serviço de microscopia é insuficiente, ou até inexistente, os testes rápidos para diagnóstico da malária, que ocorre por reconhecimento de antígenos do parasita, podem oferecer um resultado preciso e oportuno. Na Região Amazônica, os testes de diagnóstico rápido são usados em locais onde inexistente a disponibilidade do exame da gota espessa, como áreas remotas indígenas e áreas de garimpo [82].

Como medidas de controle e prevenção da malária, a OMS preconiza o uso de mosquiteiros tratados com inseticida, a rede inseticida de longa duração e a pulverização residual interna. Através do uso dessas estratégias busca-se minimizar a possibilidade de picada pelo anofelino, bem como a sua sobrevivência, o que reduz significativamente a capacidade e transmissão vetorial. Os mosquiteiros e a rede inseticida fornecem proteção para os indivíduos moradores de áreas endêmicas contra picadas de mosquitos dentro do ambiente doméstico, causando a morte do vetor. Já a pulverização residual interna eficaz na eliminação do vetor das residências [15]. Em determinados locais, poderá ser indicado o uso de métodos

suplementares, por exemplo, a gestão das fontes larvares onde os habitats aquáticos dos mosquitos são escassos, fixos e fáceis de encontrar [83].

A OMS recomenda desde 2006 a utilização da terapia combinada à base de artemisinina (ACT) como tratamento para casos não complicados de infecção por *P. falciparum* e em locais com história de resistência à cloroquina para infecção pelas outras espécies de plasmódio, exceto em mulheres no primeiro trimestre de gestação. Tal recomendação visa usar dois ou mais antimaláricos que possuam mecanismos de ação distintos, e assim, reduzir a resistência a um dos componentes da terapia em determinada região endêmica. Desta forma, os Guidelines para tratamento da malária publicados pela OMS em 2010 e 2015, não recomendam o uso de derivados de artemisinina como monoterapia [74, 84].

Os principais ACT em uso nesse tipo de infecção são as associações de:

- Artemeter + Lumefantrina;
- Artesunato + Amodiaquina;
- Dihidroartemisinina + Piperaquina;
- Artesunato + Mefloquina;
- Artesunato + Sulfadoxina + Pirimetamina. [74, 84].

Além das combinações supracitadas, o tratamento de infecções por *P. falciparum* ou de infecções mistas no Brasil, que correspondem a 24,3% dos casos, é realizado com a combinação Artemeter + Lumefantrina ou Artesunato + Mefloquina + Primaquina [9].

Na malária vivax, o tratamento de primeira linha é a cloroquina, como monoterapia ou associada a primaquina, 8-aminoquinolona capaz de eliminar hipnozoítos. Já em áreas onde há maior prevalência de infecções por cepas sensíveis à cloroquina, o tratamento de adultos e crianças infectadas com *P. vivax* é feito com ACT + primaquina [74]. Por último, em casos de complicações da malária, a OMS recomenda o uso de artesunato por via intramuscular ou intravenosa por pelo menos 24h, seguido de tratamento por via oral com ACT [84].

Assim, a utilização da dihidroartemisinina (DHA) aproxima o estudo em modelos experimentais ao indicado na clínica. Não existe um tratamento específico para a SDRA associada à malária (MA-SDRA). Nessas circunstâncias são adotadas as condutas referentes à SDRA não malárica em conjunto com os fármacos utilizados no tratamento da infecção [74, 85].

1.7.1. Dihidroartemisinina

As artemisininas são derivadas da *Artemisia annua* L., erva tradicional chinesa usada para o tratamento de febres. Elas pertencem ao grupo de lactonas sesquiterpênicas e possuem alta atividade antimalárica. Os primeiros estudos relatando seu potencial antimalárico datam da década de 1970 e, desde então, diversos derivados têm sido descritos [86].

Dentre os principais derivados da artemisinina destacam-se o artesunato, a dihidroartemisinina (DHA), o arteether e o artemeter. O artesunato é um derivado polar, enquanto o arteether e o artemeter são derivados lipídicos da artemisinina. Apesar do artesunato e do artemeter serem mais frequentemente usados nos esquemas de tratamento com ACTs, a DHA - que é o metabólito bioativo da artemisinina - é mais potente em relação aos outros fármacos de seu grupo [87]. A recomendação da DHA pela OMS deve-se ao seu efeito como esquizotocida de ação rápida, sendo ativa contra todas as espécies de *Plasmodium*, além de sua ampla atividade contra parasitas assexuados, matando todos os estágios de jovens anéis a esquizontes, e contra gametócitos na infecção por *P. falciparum* [74].

Diversos mecanismos de ação das artemisininas têm sido propostos, dentre os quais destaca-se a formação de radicais livres de artemisinina, devido à clivagem da ligação endoperóxido pelo ferro heme em sua estrutura [86]. Estes radicais livres de artemisinina podem mediar a morte do parasita devido à alteração de suas vias bioquímicas, como a alquilação de moléculas de heme e interferência com sua via de desintoxicação; alquilação de proteínas citosólicas, como o PfTCTP, uma proteína tumoral possivelmente relacionada a replicação do parasita; e a interrupção das funções mitocondriais do *Plasmodium* [87]. Outro mecanismo de ação das artemisininas, descrito mais recentemente envolve a inibição da fosfatidilinositol-3-quinase de *Plasmodium falciparum* (PfPI3K), que atua na exportação de proteínas do retículo endoplasmático do *P. falciparum* para a membrana celular da hemácia, e conseqüentemente induzir alterações no transporte e propriedades de membrana, no estágio em “anel”. A DHA também possui outros alvos no estágio posterior ao trofozoíto, retardando o crescimento do parasita [88].

A farmacocinética da DHA envolve rápida absorção por via oral ou retal, nas quais atinge o pico de concentração plasmática em 2,5h ou 4h, aproximadamente 55% de ligação a proteínas plasmáticas, e uma meia-vida de eliminação de 45 minutos, via glucuronidação intestinal e hepática [74]. De uma maneira geral, o uso de derivados da artemisinina é vantajoso, pois leva à rápida eliminação da

parasitemia e dos sintomas da malária. Entretanto, sua rápida eliminação do organismo demanda um período de tratamento mais longo, de aproximadamente 7 dias, e o uso conjugado à uma droga de eliminação mais lenta [84].

Clinicamente, a DHA é usualmente associada com a piperquina, uma 4-aminoquinolina com função semelhante à cloroquina, que inibe a detoxificação do heme. Segundo as recomendações estabelecidas pela OMS, a dosagem alvo para o tratamento é de 4 mg/kg/dia da DHA + 18 mg/kg/dia da piperquina, e o intervalo de doses terapêuticas varia entre 2 - 10 mg/kg/dia da DHA e 16 - 26 mg/kg/dia de piperquina [84]. Portanto, a fim de aproximar o estudo à prática clínica e considerando a dosagem usada e bem tolerada por camundongos C57BL/6 em modelo experimental de malária cerebral [118], o presente estudo utiliza a dose de 3/mg/kg/dia da DHA.

1.8. Ácido Acetilsalicílico

O ácido acetilsalicílico (AAS) é um anti-inflamatório não-esteroidal (AINE) amplamente utilizado no mundo, e que possui propriedades imunomodulatórias e antiplaquetárias. Estima-se que sejam consumidos anualmente 40,000 toneladas métricas de aspirina, equivalentes a cerca de 120 bilhões de comprimidos de aspirina [89].

O alvo do AAS é a ciclooxigenase (COX), que existe como uma isoforma COX1 constitutivamente expressa, uma isoforma COX2 induzível e uma variante genética de COX1 e COX2 descrita recentemente, a COX3. Em plaquetas, a COX1 é responsável pela geração de tromboxano A₂ (TXA₂), um potente vasoconstritor e agregador plaquetário. O AAS é um inibidor não seletivo da ciclooxigenase que acetila um resíduo de serina na posição 529, alterando o posicionamento do substrato ácido araquidônico, o que impede irreversivelmente seu metabolismo ao produto intermediário, o endoperóxido. Como resultado dessa interação, a produção de TXA₂ é inibida durante toda a vida das plaquetas (aproximadamente 10 dias). Este mecanismo é clinicamente relevante porque, apesar do seu rápido metabolismo – possui meia vida de 15 a 20 minutos- o AAS possui um efeito antiplaquetário prolongado [90]. A recuperação da função plaquetária após a administração do AAS está relacionada a renovação de plaquetas pelo organismo. Assim, considerando que diariamente são geradas 10 a 12% do total de plaquetas a partir dos megacariócitos, a hemostase quase normal pode ser recuperada de 2 a 3 dias após

a última dose de AAS, quando não há alguma condição patológica que influencie em sua produção [91].

A absorção do AAS é rápida e ocorre por difusão passiva através das membranas do trato gastrointestinal. Sua biodisponibilidade sistêmica é de cerca de 45-50% e permanece em um nível semelhante após administração oral em dose única ou em múltiplas doses [92].

Além do efeito antiplaquetário, o AAS também possui efeitos imunomodulatórios, devido à inibição de COX e da produção de prostanoídes. Suas propriedades anti-inflamatórias também estão associadas à mecanismos de ação independentes da COX. Estes incluem o aumento da produção de NO, e inibição da via do fator de transcrição nuclear kappa b ($\text{NF}\kappa\text{B}$) em macrófagos [93].

Mecanismos de ação do ácido acetilsalicílico independentes de COX

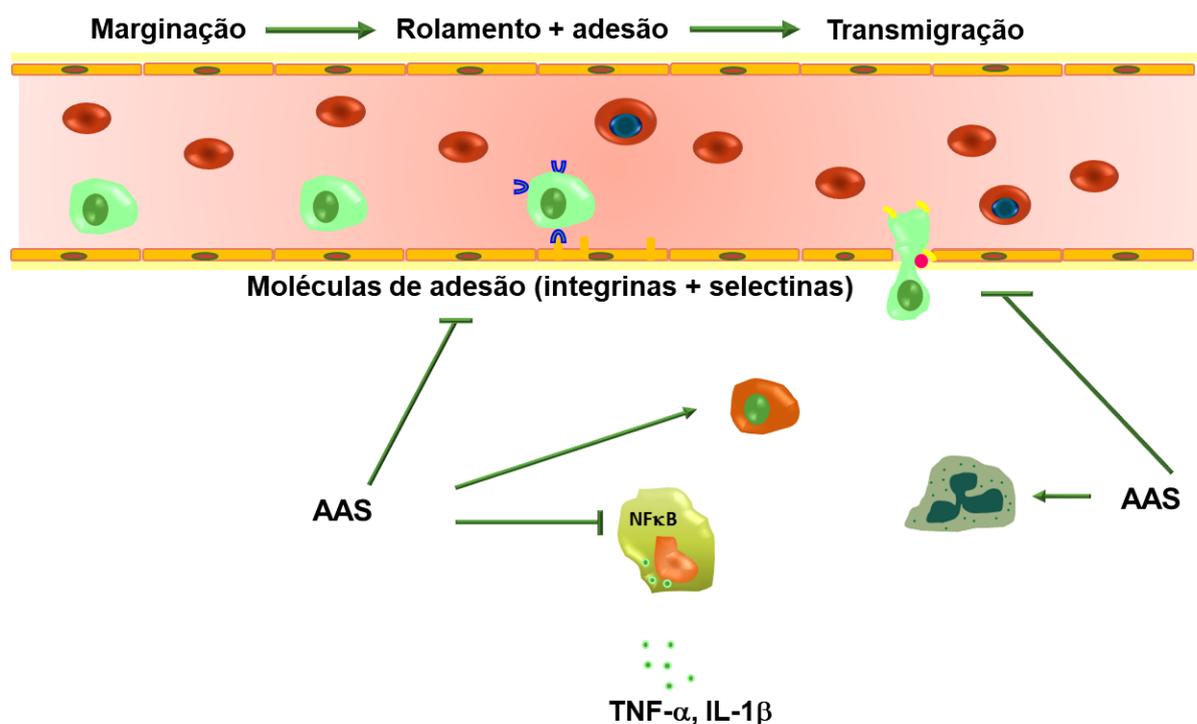


Figura 1.8.1 Mecanismos de ação do ácido acetilsalicílico independentes da ciclooxigenase.

O AAS e seus derivados podem inibir (barras) o recrutamento cascata de leucócitos inibindo sua adesão, transmigração e quimiotaxia juntamente com a inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β . Ele também pode induzir a apoptose (setas) em neutrófilos e monócitos. Adaptado de HUSSAIN *et al.*, 2012 [93].

No contexto da malária, foi demonstrado que as plaquetas interagem com os eritrócitos promovendo a trombogênese principalmente em pacientes com disfunção endotelial [94]. Nesse aspecto, a utilização do AAS, poderia atuar no curso da

doença. Apesar de seus efeitos antiplaquetário e anti-inflamatório, a utilização do AAS na malária ainda é controversa. McMorran e colegas observaram que a inibição da função plaquetária pelo AAS e outros inibidores revogou o efeito letal que plaquetas exercem sobre *P. falciparum* [65]. Todavia, foi demonstrado em modelo experimental murino de malária cerebral que eritrócitos infectados por *P. berghei* ANKA interagem e ativam plaquetas e que a inibição plaquetária com AAS foi capaz de reduzir a mortalidade dos animais [95].

Outro uso amplamente descrito do AAS está relacionado a cardiopatias como a síndrome coronariana aguda. Nesses casos, seu uso é preconizado em uma dose entre 150–325 mg para que ocorra a inibição de TXA₂. Como droga de escolha para terapia antitrombótica após o infarto agudo do miocárdio (IAM), o tratamento com AAS em baixas doses, entre 75 e 100 mg, é recomendado pela Sociedade Europeia de Cardiologia, devido ao seu efeito anti-isquêmico e menor chance de eventos adversos em comparação a altas doses [96]. O uso do AAS também é indicado pelo manual de rotinas para atenção ao AVC, do Ministério da Saúde. Nele, o uso do AAS é preconizado para a prevenção secundária ao AVC, na dose de 100 a 300 mg, e para pacientes com doença arterial coronariana isquêmica durante a terapia de anticoagulação oral, em doses de 100mg, preferencialmente tendo forma de apresentação como liberação entérica [97]. O AAS consta também na lista de medicamentos essenciais divulgada pela OMS, na qual ele é indicado na categoria de AINES pelo seu efeito analgésico e como inibidor plaquetário [98].

1.9. Modelos experimentais

Existem dezenas de espécies de *Plasmodium* capazes de infectar diferentes hospedeiros vertebrados, dentre os quais estão os humanos. Nesse contexto, algumas espécies capazes de causar malária em primatas e roedores têm sido importantes para a compreensão dos mecanismos relacionados a patogênese da doença e de resistência aos antimaláricos, bem como na busca por novos alvos terapêuticos, e elaboração de vacinas.

O estudo em roedores tem algumas vantagens importantes, como a semelhança de alguns eventos com as manifestações apresentadas por humanos, além do curto período necessário para a execução do desenho experimental. Dentre as espécies capazes de infectar roedores, destacam-se o *P. chabaudi*, o *P. berghei*, o *P. yoleii* e o *P. vinckei* [99].

P. chabaudi chabaudi AS e o *P. chabaudi adami*, por exemplo, são comumente usados para estudar mecanismos de resposta do sistema imune ao parasita e regulação de citocinas, além da identificação de loci de suscetibilidade. O *P. chabaudi chabaudi* AS leva a uma infecção não letal em espécies de camundongo resistentes, mas pode levar a letalidade em algumas espécies suscetíveis a infecção por esta cepa, enquanto o *P. chabaudi adami* leva a uma infecção moderada e não-letal [100].

Já o *P. yoelii* além de ser usado para estudos de mecanismos imunes da malária, serve como base para modelo de malária cerebral (CM), além de apresentar a proteína de superfície merozoíta-1 (MSP-1), cujos alguns polimorfismos estão relacionados à ativação plaquetária, amplificação da cascata de coagulação, levando à disfunção da hemóstase e aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica [101]. Ademais, o *P. yoelii* 17XL é amplamente usado para o estudo de resposta imune relacionada a vacinas e como modelo de CM [102].

O *P. vinckei* é usado menos frequentemente, possuindo duas espécies usadas em modelos experimentais para a identificação de genes que regulam a suscetibilidade à malária. O *P. vinckei vinckei* está associado à infecção letal, estudos com quimioterápicos e sobre a fisiopatologia da malária, e o *P. vinckei petteri* leva a uma infecção não-letal, sendo também uma alternativa para o estudo de mecanismos imunes da malária [99, 103].

Uma das espécies mais usadas em modelos murinos de malária é o *P. berghei*, em especial o *P. berghei* ANKA, o *P. berghei* K173 e o *P. berghei* NK65. O *P. berghei* ANKA é usado principalmente na CM experimental, modelo no qual há perda da integridade da barreira hematoencefálica, ativação de microglia, aumento da expressão e liberação de mediadores inflamatórios, como TNF- α , IFN- γ , além de haver uma resposta tipo Th2 pela expressão de TGF- β e IL-10 [104]. Além disso, a infecção pelo *P. berghei* ANKA também é usada para estudo de dano cognitivo em decorrência da CM [105].

A infecção pelo *P. berghei* ANKA, cujo genoma foi sequenciado em 2005 [106], também é usada para o estudo de outras complicações como a malária pulmonar. Nesse contexto, dois modelos de infecção por *P. berghei* ANKA são usados. No primeiro, a inoculação do *P. berghei* ANKA em camundongos C57BL/6 além do quadro de CM, também leva a um acometimento pulmonar. Estudos anteriores demonstraram que neste modelo, ocorre importante infiltrado inflamatório, em especial por neutrófilos, extravasamento de conteúdo plasmático para o espaço

alveolar, aumento dos níveis de mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-6, CCL-2 e CXCL-1, além de uma disfunção pulmonar, observada pelo aumento da elastância estática do pulmão e das pressões resistiva e viscoelásticas pulmonares [107, 108]. Nesse contexto, apesar de ser um modelo interessante, duas desvantagens na infecção por *P. berghei* ANKA em animais C57/BL6: a primeira se deve a alta mortalidade por CM, que ocorre a partir do sexto dia após a infecção, limitando assim o período de estudo para complicações respiratórias; a segunda se deve ao quadro de infiltrado neutrofílico, comum em outras etiologias de SDRA, mas não na associada à malária, na qual é observada a presença majoritária de macrófagos [73].

O segundo modelo de infecção pelo *P. berghei* ANKA é realizado pela inoculação deste plasmódio em camundongos DBA/2. Observam-se neste modelo características compatíveis com o quadro de malária pulmonar e uma maior janela de tempo para estudo. No entanto, foi demonstrado que cerca de 60% dos animais sucumbem a MA-SDRA, enquanto os 40% restantes morrem devido à hiperparasitemia [109]. Novamente, outra característica atípica na malária pulmonar – o recrutamento de neutrófilos ao tecido pulmonar – é observada nesse modelo, o que representa uma limitação no que tange a uma representação mais fidedigna do quadro da doença em humanos [110].

Mais recentemente, o *P. berghei* NK65 começou a ser usado no estudo de complicações pulmonares decorrentes da malária. Esta cepa de *P. berghei*, que não é capaz de causar CM em camundongos C57BL/6, leva a um quadro letal de inflamação pulmonar, caracterizada principalmente por edema intersticial e alveolar, havendo amplo extravasamento de conteúdo proteico para o espaço alveolar. Além disso, este modelo de infecção é bastante eficaz em comparação a outros anteriormente estudados, já que mais de 90% dos camundongos infectados desenvolvem MA-SDRA [111].

Apesar de haver um número considerável de publicações usando o *P. berghei* NK65 como modelo para a MA-SDRA, os estudos estão limitados a alterações histológicas e ao processo inflamatório, não havendo análises da função pulmonar em camundongos C57BL/6 descritas na literatura.

2. Justificativa

A malária é considerada a doença parasitária mais importante em seres humanos, e possui maior letalidade em crianças, especialmente as menores de 5 anos. Apesar de 90% dos óbitos se concentrarem na África subsaariana, a prevalência da doença também é alta em regiões de clima tropical e subtropical. No Brasil, em 807 municípios são responsáveis por 99,7% dos casos. Apesar dos esforços para a detecção precoce e prevenção da doença, 1422 casos foram registrados na região Extra-Amazônica através do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) em 2015, e 109 internações foram registradas através do SIH/SUS no primeiro semestre de 2018, representando um aumento de 30% em relação ao mesmo período de 2017.

As complicações mais comuns são a malária cerebral, anemia grave, problemas renais e respiratórios. Dentre os distúrbios respiratórios, o paciente pode apresentar hiperventilação, devido à acidose metabólica provocada pelo acúmulo de ácido láctico. Casos mais graves compreendem lesão pulmonar aguda e a SDRA, que apresenta alta taxa de mortalidade [73]. No contexto da patogênese da malária pulmonar, um estudo prospectivo observacional realizado em 2016 concluiu que a hepatopatia ocasionada pela malária está correlacionada a outras complicações nos casos graves de malária, incluindo o acometimento cerebral, choque, SDRA, hiponatremia e coagulação intravascular disseminada. Nestes pacientes, a lesão hepática envolve a fagocitose de pigmento malárico, acúmulo de hemácias infectadas no fígado, infiltrado inflamatório, havendo congestão de sinusoides, e hiperplasia de células de Kupffer [112].

De acordo com a OMS, o tratamento indicado para casos de malária grave envolve a administração de artesunato, que é rapidamente convertido em seu subproduto ativo – a dihidroartemisinina (DHA) – pelo organismo [74, 84]. Além do efeito antimalárico, a DHA possui ação anti-inflamatória e imunomodulatória [86, 123- 125], que poderia influenciar no desfecho da lesão pulmonar. Entretanto, o agravamento da lesão pulmonar durante ou mesmo após o tratamento antimalárico tem sido descrito em diversos estudos, o que torna fundamental a existência de modelos experimentais que mimetizem o ocorrido em humanos [73, 111, 116,117].

A infecção por *P. berghei* NK65 leva ao aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar, de infiltrado de células mononucleares ao tecido pulmonar, e de mediadores inflamatórios pulmonares, sem haver, no entanto, o quadro de malária cerebral descrito no modelo de infecção por *P. berghei* ANKA [73, 107].

Além das alterações pulmonares, o aumento do estresse oxidativo, bem como o acúmulo de pigmento malárico no fígado e hiperplasia de células de Kupffer tem sido descrita na malária induzida por *P. berghei* NK65 [75]. Em modelo experimental de CM, a DHA associada a artovastatina posterga a sobrevida dos animais, bem como a progressão da parasitemia [118]. Apesar de ser um modelo experimental interessante para o estudo da malária pulmonar, o efeito do tratamento com um derivado de artemisinina na infecção por *P. berghei* NK65 ainda não foi descrito na literatura.

Outro ponto a ser destacado se refere ao tratamento dos sintomas da malária, como febre, mialgia e cefaleia, com o uso de antitérmicos e analgésicos. Nesse contexto, o AAS é amplamente usado como analgésico e anti-inflamatório devido ao seu baixo custo e fácil obtenção. Ele também é utilizado em casos de doenças vasculares [90, 91], sendo indicado nas rotinas para atenção ao AVC, publicada pelo Ministério da Saúde [97]. Assim, seu uso corriqueiro em áreas endêmicas pode representar um fator risco em casos de malária.

O AAS atua inibindo permanentemente a COX e, com isso, a agregação plaquetária, além de possuir propriedades imunomodulatórias [93]. A ativação de plaquetas possui envolvimento na inflamação, na adesão de hemácias infectadas na microcirculação em diferentes órgãos. Nesse contexto, o efeito de inibição plaquetária do AAS foi descrita por Srivastava e colegas como uma estratégia interessante no quadro de malária cerebral. Em modelo induzido por *P. berghei* ANKA, o PF4 liberado pelas plaquetas após sua ativação facilitaria a interação entre células endoteliais e hemácias, a exacerbação do quadro e a oclusão da microcirculação [95]. Entretanto, outros estudos têm descrito efeitos deletérios do uso do AAS na malária [65,67]. Esses efeitos estariam relacionados à inibição da atividade plaquetária, que seria responsável pela morte do parasita intraeritrocítico [65]. Neste aspecto, outro estudo em modelo de CM indica que o efeito da ativação plaquetária é tempo-dependente. Na fase imediata após a infecção, elas seriam responsáveis por reduzir a carga parasitária, corroborando a hipótese de McMorrán e colegas. Já a ativação plaquetária após a fase inicial da doença leva a liberação de mediadores inflamatórios como IL-1 β , e conseqüente efeito deletério [119].

Considerando a inibição permanente da agregação plaquetária após dose única de AAS [90] e que este fenômeno é referido como protetor no início da infecção, optamos por avaliar os efeitos da administração do AAS no quadro de SDRA já estabelecido, a fim de investigar se estes seriam terapêuticos ou deletérios.

Portanto, a fim de aproximar o estudo ao observado em pacientes com malária grave, o presente estudo visa a avaliar os efeitos do tratamento com dihidroartemisinina e ácido acetilsalicílico em modelo de SDRA associada à malária induzida por *P. berghei* NK65.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Investigar os efeitos do tratamento com ácido acetilsalicílico (AAS) e da terapia combinada com a dihidroartemisinina (DHA) em modelo murino de malária pulmonar induzida por *P. berghei* NK65.

3.2. Objetivos específicos

- Identificar o início das alterações de mecânica respiratória em camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* NK65;
- Avaliar os efeitos do tratamento com a DHA no dano ao tecido pulmonar induzido por *P. berghei* NK65;
- Investigar a melhor forma de solubilização da DHA para o controle da sobrevivência na infecção por *P. berghei* NK65;
- Avaliar os efeitos do AAS e DHA sobre a sobrevivência, mecânica respiratória, parâmetros hematológicos e achados histológicos no tecido pulmonar, hepático, e em medula óssea em modelo de malária pulmonar induzida por *P. berghei* NK65;
- Avaliar os efeitos do AAS e DHA na celularidade total e diferencial no tecido pulmonar, lavado broncoalveolar e sangue;
- Quantificar os níveis dos mediadores inflamatórios pulmonares, no lavado broncoalveolar após o tratamento com AAS e DHA;
- Analisar a integridade da barreira alvéolo-capilar após tratamento com AAS e DHA na infecção por *P. berghei* NK65;
- Analisar a função hepática e alterações histológicas decorrentes da infecção por *P. berghei* NK65 após tratamento com AAS e DHA;
- Analisar o efeito do AAS e DHA na função renal na infecção por *P. berghei* NK65;
- Avaliar a permeabilidade da barreira hematoencefálica após tratamento com AAS e DHA na infecção por *P. berghei* NK65;
- Avaliar os efeitos do AAS e DHA na progressão das alterações histológicas pulmonares e hepáticas pela infecção por *P. berghei* NK65.

4. Metodologia

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética com Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz (CEUA-IOC), licença nº L021-15. Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos (18-20 g) obtidos no ICTB, Fiocruz.

4.1. Infecção com *Plasmodium berghei* NK65

Amostras de *Plasmodium berghei* NK65 foram gentilmente cedidas pela doutora Juliana Tavares, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Ao longo do estudo, amostras de sangue de animais infectados foram coletadas por punção cardíaca, sob anestesia com isoflurano (Cristália, Itapira, SP, Brasil), usando uma seringa de 1mL acoplada à agulha de 26G. Em seguida, os animais foram eutanasiados por deslocamento de cervical e o sangue obtido foi centrifugado a $x500\ g$ por 10 minutos, a 4°C (centrífuga Eppendorf, modelo 5415C). Em seguida, o plasma foi descartado, as hemácias foram ressuspensas em solução de glicerol tamponado e as amostras foram preservadas em nitrogênio líquido.

Antes do início do protocolo experimental, 2 a 3 animais, chamados de passagem foram inoculados com $200\ \mu\text{L}$ das amostras criopreservadas, após o descongelamento das mesmas. A parasitemia dos animais passagem foi monitorizada diariamente até que atingissem entre 6 a 10% de parasitemia. Posteriormente, o sangue destes animais foi coletado por punção cardíaca para a preparação do inóculo e manutenção do estoque de amostras. Para a infecção, foram utilizadas 10^4 hemácias parasitadas com *P. berghei* NK65 diluídas em $200\ \mu\text{L}$ de solução salina inoculadas por via intraperitoneal (ip) imediatamente após diluição. Os animais controles receberam o mesmo número de hemácias não-parasitadas.

A parasitemia foi analisada em lâminas de esfregaço sanguíneo coradas através do kit Panótico rápido (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil). Para tal, foi realizado um pequeno corte com tesoura cirúrgica na ponta da cauda do animal, pelo qual foi coletada uma gotícula de sangue para a realização do esfregaço sanguíneo. Em seguida, as lâminas foram analisadas em microscópio de luz (BX51, Olympus), no qual foram contadas entre 500 a 1000 hemácias totais para a determinação da parasitemia.

Posteriormente, $1\ \mu\text{L}$ de sangue foi coletado, diluído em $999\ \mu\text{L}$ de PBS e a contagem do número total de hemácias foi realizada em câmara de Neubauer.

Através da parasitemia e do número de hemácias, o volume de sangue para o preparo do inóculo foi determinado a cada experimento.

4.2. Desenho Experimental

Camundongos C57BL/6 machos foram inoculados por via intraperitoneal com 10^4 hemácias infectadas com *Plasmodium berghei* NK65 (grupo *PbNK65*) ou hemácias não infectadas (C) [107]. Na primeira etapa deste estudo, os animais foram divididos aleatoriamente entre o grupo infectado e não infectado, com o intuito de determinar o início das alterações da mecânica pulmonar causadas pela inoculação com *P. berghei* NK65. Para tal, os animais foram ventilados mecanicamente e tiveram os pulmões coletados para análise de edema pulmonar entre os dias 6 e 10 pós-infecção (dpi). Ademais, a análise da parasitemia foi realizada no dia 3 e entre o 6^o e 10^o dpi.

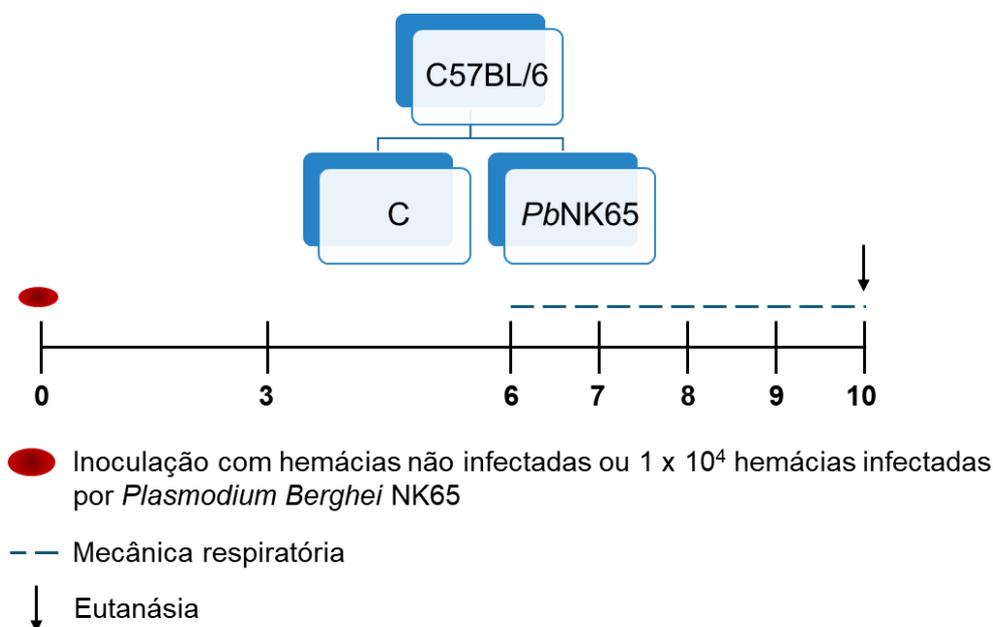


Figura 4.2.1 Desenho experimental: Análise do início das alterações em mecânica respiratória.

Camundongos C57BL/6 foram inoculados com hemácias não infectadas ou com 10^4 hemácias infectadas por *P. berghei* NK65, ventilados mecanicamente e tiveram os pulmões coletados para análise do edema pulmonar entre os dias 6 e 10. A parasitemia foi analisada nos dias 3, 6, 7, 8, 9 e 10 pós-infecção.

Legenda: C= Controle; *PbNK65*= *Plasmodium berghei* NK65.

A partir dos resultados obtidos na análise da mecânica respiratória e da formação de edema pulmonar, e a fim de investigar os efeitos do tratamento com antimalárico dihidroartmisinina (DHA) (Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, EUA), os animais foram tratados no 8^o dpi nos experimentos seguintes. Ademais,

considerando a dose de DHA recomendada pela OMS, os animais foram tratados com a dosagem de 3 mg/kg/dia [74, 84, 118].

A fim de analisar a melhor forma de solubilização da DHA, realizamos dois blocos de experimentos: no primeiro, a fim de investigar o efeito imediato da DHA sobre a celularidade e perfil de proteínas do fluido do lavado broncoalveolar (BALF), os animais foram tratados no oitavo dia de infecção usando os seguintes veículos: salina (sal), Dimetilsulfóxido (DMSO), ou uma proporção 60:40 de DMSO: polissorbato 80 (PS) e tiveram o BALF coletado no 9º dpi. Um grupo tratado com Cloroquina (CQ) 25 mg/kg, por via oral, foi usado como controle positivo do tratamento antimalárico. Adicionalmente, a fim de analisar a sobrevivência e parasitemia com as diferentes formas de solubilização da droga, os animais foram tratados durante 7 dias consecutivos com DHA ou cloroquina e acompanhados diariamente até o 15º dpi, conforme o desenho experimental abaixo.

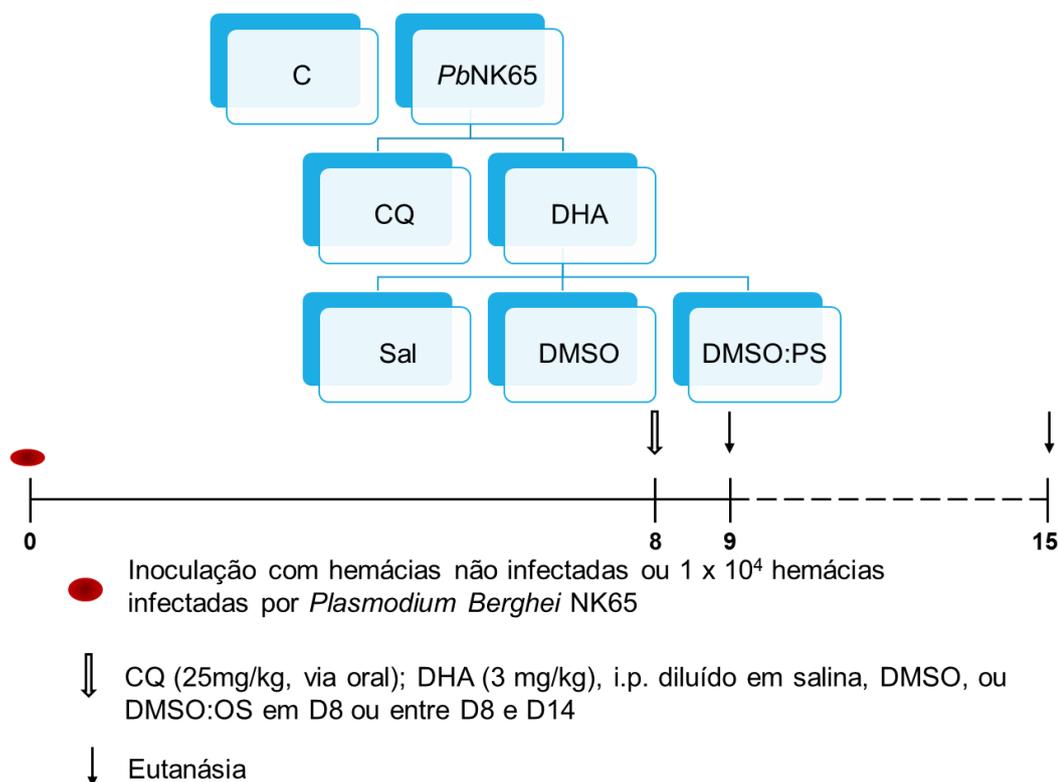


Figura 4.2.2 Desenho experimental: Solubilização da DHA.

Camundongos foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65 e tratados entre os dias 8 e 14 dpi com 3 mg/kg de DHA solubilizada em salina, DMSO, ou uma proporção de 60:40 DMSO:PS, via intraperitoneal, ou 25 mg/kg de cloroquina, por via oral.

Legenda: *Pb*= *Plasmodium berghei* NK65; DMSO= dimetilsulfóxido; DHA= dihidroartemisinina; CQ= cloroquina DMSO:PS= DMSO: Polissorbato 80; Sal= salina.

Nos experimentos subsequentes, os animais foram tratados no oitavo dia de infecção com ácido acetilsalicílico (AAS) (Bayer, Leverkusen, Alemanha) 100 mg/kg por via oral, DHA, 3 mg/kg por via intraperitoneal ou com a terapia combinada de AAS+DHA e a coleta de materiais para análise foi realizada no 9º dpi, conforme a figura 4.2.3.

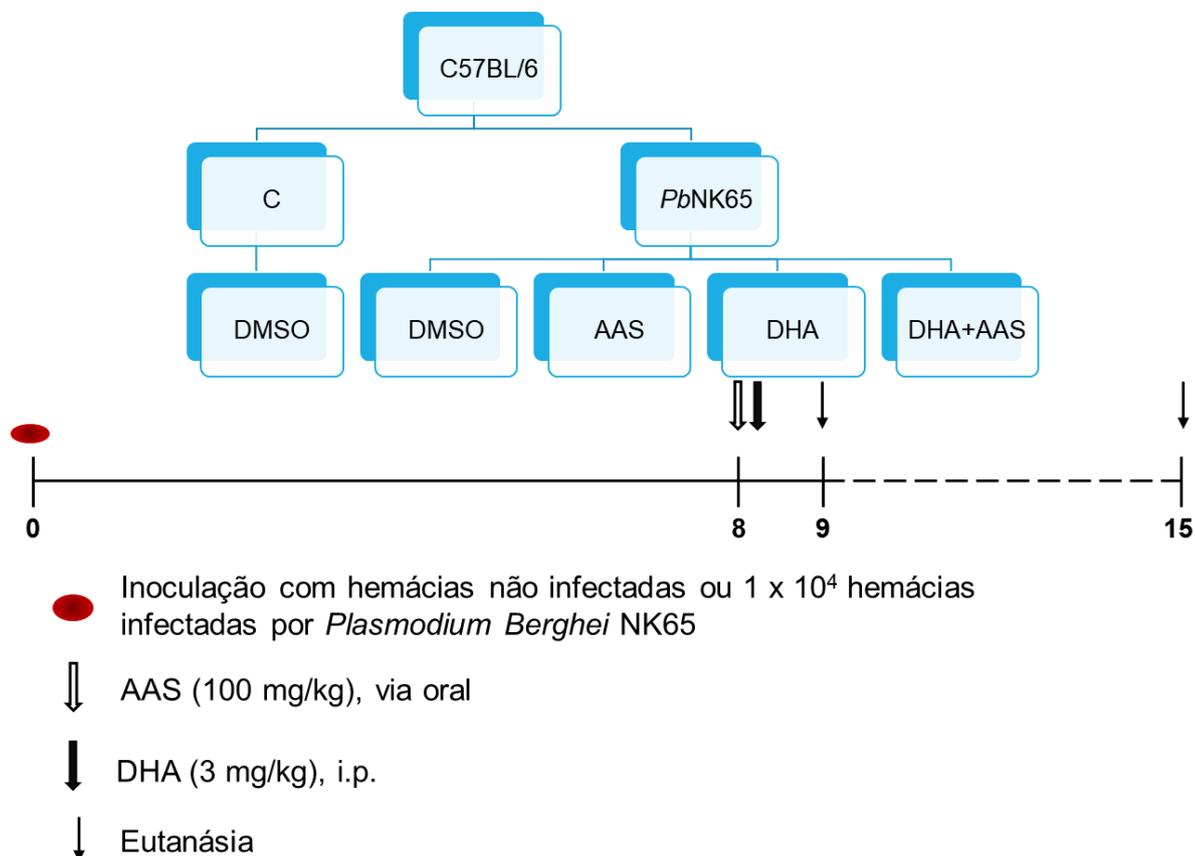


Figura 4.2.3 Desenho experimental: tratamento com AAS e DHA.

Camundongos C57BL/6 foram tratados com DHA (seta preta) ou AAS (seta branca) no 8º dpi e sofreram eutanásia no 9º dpi ou no 15º dpi, conforme o esquema acima. Grupo não-infectado (C); Grupos infectados (*Pb*): Veículo (DMSO); Dihidroartemisinina (DHA); Ácido acetilsalicílico (AAS), e DHA+AAS.

Para o experimento de sobrevivência, o tratamento com DHA foi realizado por 7 dias consecutivos, a partir do 8º dia pós-infecção. Os animais que sobreviveram até o 15º dpi foram anestesiados e eutanasiados para a coleta de órgãos para análises histológicas e de sangue para a realização do hemograma, conforme descrito abaixo.

4.3. Mecânica Respiratória

Nove dias após a inoculação com *P. berghei* NK65, os animais foram sedados com diazepam (1 mg, ip) e, então, anestesiados com tiopental sódico (20 mg/kg, ip).

Depois de anestesiados, os animais foram colocados em uma pequena mesa sob foco cirúrgico em decúbito dorsal, sendo seus membros fixados por esparadrapo. Os membros superiores foram mantidos horizontalmente abduzidos a 90 graus em relação ao corpo e os membros inferiores estendidos em diagonal.

Após o posicionamento cirúrgico, foi realizada traqueostomia com introdução de jelco 20G com 32 mm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno e a cânula foi fixada à traqueia por meio de fios de algodão.

Os animais tiveram a sua musculatura paralisada após a administração de brometo de vecurônio [0,005 mg/kg intravenosamente (i.v.)] e a ventilação artificial foi instituída por um ventilador mecânico para pequenos animais (Samay VR15, Universidad de La Republica, Montevideu, Uruguai) acoplado à outra extremidade do pneumotacógrafo. O modo ventilatório instituído foi uma ventilação controlada a volume com volume corrente (VT) de 0,2 mL e frequência respiratória de 100 incursões respiratórias por minuto (irpm), relação I:E de 1:2 e fração inspirada de oxigênio (FiO₂) de 0,21.

Após a adaptação ao respirador, os animais foram submetidos à incisão cirúrgica por tesoura na linha média do abdômen justo abaixo do apêndice xifoide. A incisão foi estendida, superficialmente, ao longo da parede torácica sobre o esterno, sendo, então, a pele do animal retirada por tração lateral. A seguir, a incisão abdominal foi estendida lateralmente, para esquerda e para direita, seguindo o bordo inferior das costelas até atingir a linha axilar anterior, bilateralmente. Com a cavidade abdominal aberta, foi possível visualizar o diafragma, que foi perfurado e seccionado segundo a mesma orientação da abertura da parede abdominal. Imediatamente antes da perfuração do diafragma, foi instalada pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 2 cmH₂O [120]. A utilização da PEEP evita o colapso alveolar e o desenvolvimento de atelectasias resultantes da retirada da parede torácica.

Após a retirada do diafragma, a parede torácica foi removida por cortes longitudinais bilaterais ao nível da linha axilar anterior, em toda sua extensão, e corte superior, abaixo da clavícula.

O ventilador fora ajustado previamente para gerar, quando desejado, uma pausa de 5 segundos ao final da inspiração. Foram tomados cuidados especiais na manutenção do volume (VT = 0,2 mL) e fluxo (V' = 1 mL/s) constantes em todos os animais, a fim de evitar os efeitos de diferentes fluxos, volumes e duração da inspiração nas variáveis medidas [121,122].

A cânula traqueal do animal foi conectada a um pneumotacógrafo para pequenos animais [123] para medida de fluxo aéreo (V'). O pneumotacógrafo que foi utilizado consiste de uma cânula metálica com duas saídas laterais com as seguintes características: diâmetro interno = 1,5 mm, comprimento = 4,2 cm e distância entre as saídas laterais = 2,1 cm. O gradiente de pressão através do pneumotacógrafo foi determinado utilizando-se um transdutor diferencial de pressão [SCIREQ Scientific Respiratory Equipment Inc. (SC-24), Montreal, Canadá]. Essa forma de medir fluxo aéreo, além de bem simples, é adequada, visto que, em animais de pequeno porte, os fluxos baixos e as dimensões traqueais reduzidas são responsáveis pela existência de fluxo laminar e, portanto, o fluxo aéreo pode ser medido de acordo com a lei de Poiseuille, onde a diferença de pressão entre as saídas laterais do pneumotacógrafo é proporcional ao V' . Através de outra saída lateral, a via aérea foi conectada a outro transdutor diferencial de pressão para medida da pressão traqueal (P_{tr}). A inexistência de mudanças abruptas no diâmetro do circuito (da traqueia até a extremidade da tubulação) evitou erros de medida de resistência ao fluxo [124, 125]. O volume corrente (V_T) mobilizado foi obtido por integração digital do sinal de fluxo.

O espaço morto da montagem foi de 0,2 mL. Para computá-lo, foi pesado o conjunto de equipamentos utilizados entre a via aérea do animal e o ventilador (cânula traqueal, tubo em "T", pneumotacógrafo e conexões de borracha) vazio e cheio de água. A diferença de peso permite saber o volume de água e, portanto, o volume do espaço morto do sistema. Para fechar as saídas do conjunto e enchê-lo de água foi usada massa de modelar, que foi também pesada, junto com os demais equipamentos. Durante os experimentos, evitou-se ao máximo a manipulação da cânula traqueal com aspirações e insuflações, para eliminar possíveis interferências sobre os parâmetros medidos (Figura 4.3.1).

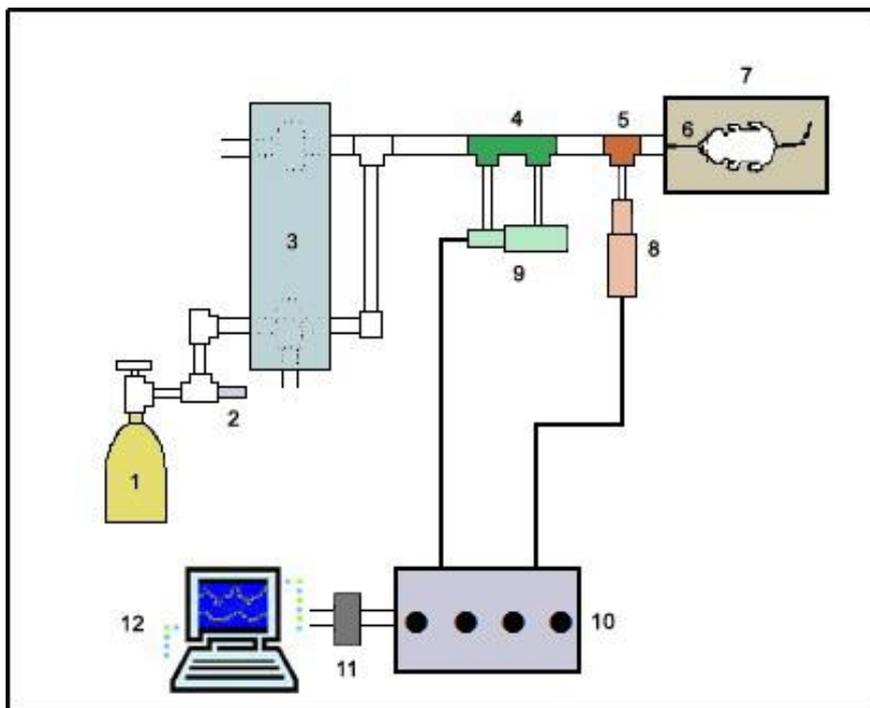


Figura 4.3.1 Montagem experimental para a medida da mecânica pulmonar.

- 1- Cilindro de ar comprimido.
- 2 - Rotâmetro de agulha.
- 3 - Ventilador de fluxo inspiratório constante com duas válvulas solenoides.
- 4 - Pneumotacógrafo.
- 5 - Peça T para medida de pressão nas vias aéreas.
- 6 - Cânula traqueal.
- 7 - Mesa cirúrgica.
- 8 - Transdutor de pressão traqueal.
- 9 - Transdutor diferencial de pressão para medida de fluxo.
- 10 - Scireq-24
- 11 - Conversor analógico-digital de 12 bits.
- 12 - Microcomputador

A mecânica pulmonar foi avaliada pelo método de oclusão ao final da inspiração, que permite analisar os componentes elástico, resistivo e viscoelástico e/ou inhomogêneo, separadamente [121, 122, 126-128].

No animal com o tórax aberto, a pressão traqueal (P_{tr}) é, na realidade, a pressão transpulmonar (P_L). Após a oclusão das vias aéreas ao final da inspiração, sob fluxo constante, ocorre uma queda súbita da P_L até um ponto de inflexão (P_i) a partir do qual o decaimento da pressão assume caráter mais lento, atingindo um platô em sua porção terminal. Esta fase de platô corresponde à pressão de retração elástica do pulmão (P_{el}). A diferença de pressão ($\Delta P_{1,L}$), que caracteriza a queda rápida inicial, representada pela diferença entre a pressão máxima inicial ($P_{m\acute{a}x}$) e o ponto a partir do qual a queda se torna mais lenta (P_i), corresponde ao componente viscoso pulmonar, ou seja, reflete a pressão necessária para vencer a resistência do

pulmão [121, 122, 126-128]. A segunda variação de pressão ($\Delta P_{2,L}$), representada pela queda lenta, do P_i ao platô (P_{el}), reflete a pressão dissipada para vencer o componente viscoelástico “stress relaxation” e/ou inhomogêneo “pendelluft” do tecido pulmonar (Figura 4.3.2). A variação de pressão total ($\Delta P_{tot,L}$) foi obtida pela soma de ΔP_1 e ΔP_2 . A elastância estática do pulmão (Est,L) (inverso da complacência pulmonar) foi calculada dividindo-se P_{el} pelo V_T . As seguintes fórmulas foram utilizadas na análise da mecânica pulmonar:

$$\Delta P_{1,L} = P_{max} - P_i;$$

$$\Delta P_{2,L} = P_i - P_{el} ;$$

$$\Delta P_{tot,L} = \Delta P_{1,L} + \Delta P_{2,L};$$

$$Est,L = P_{el}/V_T$$

Para a realização da oclusão, o aparelho utiliza uma válvula com tempo de fechamento definido (10 ms). Como este fechamento não é absolutamente instantâneo, o fluxo nunca cai à zero imediatamente após a oclusão, propiciando, assim, a existência de um pequeno volume. Esse fluxo é responsável pelo aumento do volume pulmonar e, conseqüentemente, da $P_{i,L}$ e da $P_{el,L}$.

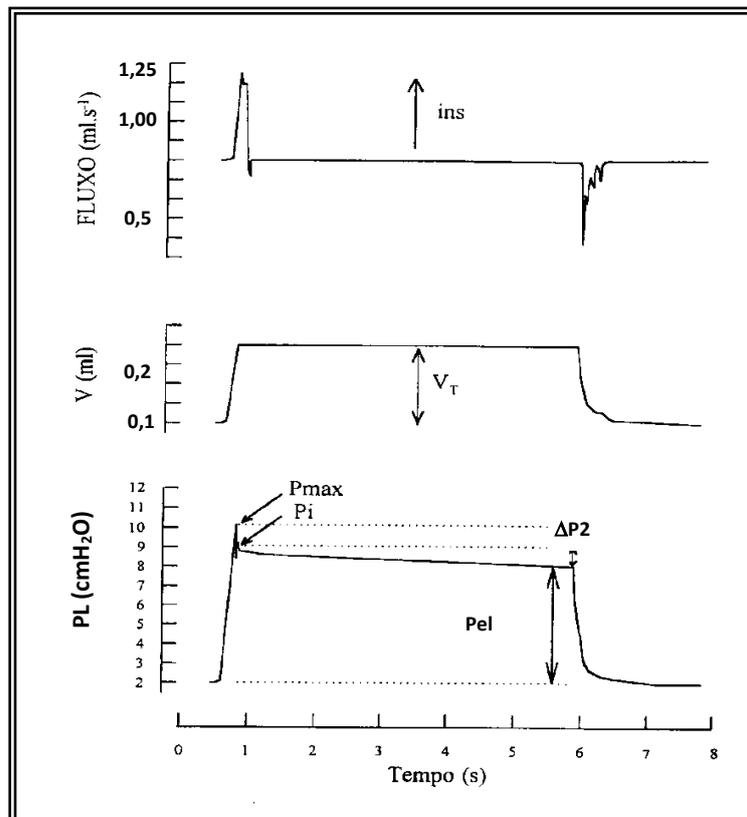


Figura 4.3.2. Representação esquemática do método de oclusão ao final da inspiração.

Registros dos sinais de fluxo aéreo (V'), volume corrente (V_T) e pressão transpulmonar (PL) em função do tempo. Os pulmões foram ventilados com volume corrente de 0,2 mL e fluxo aéreo de 1 mL/s. O platô foi alcançado após uma pausa inspiratória de 5 s. Após a oclusão

das vias aéreas, há uma queda rápida na PL (ΔP_1) que corresponde a $P_{max} - P_i$, pressão dissipada para vencer o componente viscoso do pulmão, seguida por uma queda lenta (ΔP_2), pressão dissipada para vencer os componentes viscoelástico e/ou inhomogêneo do pulmão, até um ponto de equilíbrio elástico, representada pela pressão de retração elástica pulmonar (P_{el}). A linha de base do registro de pressão corresponde à pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 2 cmH₂O.

Foram coletados 10-15 ciclos pelo método de oclusão ao final da inspiração em cada animal. Os transdutores conectados ao pneumotacógrafo e ao tubo traqueal registraram os sinais de V' e PL, respectivamente. As respostas de frequências dos sistemas de registro da PL são estáveis até 20 Hz. Em seguida, os sinais foram condicionados, filtrados [©SCIREQ Scientific Respiratory Equipment Inc. (SC-24), Montreal, Canadá], convertidos em sinais digitais por um conversor analógico-digital de 12-bitz (DT-2801A, Data Translation, Malboro, MA, EUA) e amostrados a uma frequência de 200 Hz. Os sinais foram armazenados em microcomputador para posterior análise, através do programa ANADAT (RHT-InfoData, Montreal, Canadá).

A resistência total do equipamento (Req), incluindo a cânula traqueal, foi aferida previamente através da aplicação de diferentes fluxos de ar ao sistema (até fluxos de 26 mL/s, bem acima da faixa de fluxo utilizada no presente experimento), com concomitante registro das variações de pressão (ΔP). Uma vez que $Req = \Delta P/V'$, a resistência do equipamento corresponde ao coeficiente angular da curva $\Delta P \times V'$. A pressão resistiva do equipamento ($= Req.V'$) foi subtraída da pressão resistiva dos pulmões de tal forma que os resultados representassem as propriedades mecânicas intrínsecas. A inexistência de mudanças abruptas no diâmetro do circuito (da traqueia até a extremidade do pneumotacógrafo) evita erros de medida de resistência ao fluxo [124, 125].

4.4. Remoção dos pulmões

Ao término do experimento, o animal foi imediatamente morto por secção da aorta abdominal e veia cava inferior, e a traqueia foi ocluída ao final da expiração com um fio de algodão. A porção abdominal do esôfago foi identificada e isolada, sendo presa por uma pinça hemostática. As estruturas do pescoço foram dissecadas com liberação das vias aéreas. A pinça que prende o esôfago foi suavemente tracionada para cima, permitindo separá-lo das estruturas aderidas à parede torácica posterior. Com todas as estruturas individualizadas, a traqueia foi seccionada acima

do local ligado pelo fio e, posteriormente, o esôfago foi separado do conjunto por leve tração.

4.5. Análise histológica

Os pulmões esquerdos foram mantidos na capacidade residual funcional através da oclusão do brônquio fonte esquerdo com um fio de algodão. A seguir, o pulmão e fêmur esquerdos, e um lobo do fígado foram mantidos em formalina 3,7% a 4°C, por 24 horas. O processamento histológico foi realizado através de desidratação progressiva do material através de imersão em soluções com concentração crescente de etanol a 80%, 85%, 90%, 95% e, por último, etanol absoluto. As amostras foram então diafinizadas em banhos de xilol, para posterior impregnação e inclusão em parafina a 56°C. o material foi embebido em parafina, e, com o uso de um micrótomo, obteve-se cortes histológicos com 4 µm de espessura.

Para o processamento da medula, os fêmures dos animais foram removidos cirurgicamente e mantidos em solução de formalina de Carson em tampão Millionig (Formol 4%, fosfato monobásico de sódio e hidróxido de sódio, pH 7,2 – 7,4), por pelo menos 72h. Após isso, as amostras passaram por uma etapa de descalcificação. Para tal, foi utilizada tampão fosfato 0,1M, pH 7,0, associado ao EDTA. O espécime foi então imerso na solução descalcificadora, com o volume igual ou superior a 20x o volume da peça e mantido sob agitação. A solução foi trocada diariamente por um período de 2 a 3 semanas até que a descalcificação fosse completa, lavada em água e o processamento histológico aplicado às demais amostras foi realizado.

As lâminas de pulmão, medula óssea e fígado foram coradas com hematoxilina eosina (HE) e analisadas por microscopia óptica (Eclipse E800, Nikon), por um especialista em patologia, segundo seus aspectos qualitativos e quantitativos. A determinação do dado alveolar difuso (DAD) foi realizada através de um sistema de escore ponderado por um pesquisador cego para o protocolo experimental. Resumidamente, pontuações de 1 a 5 foram usadas para representar edema alveolar, espessamento de septo alveolar, hemorragia, inflamação e atelectasia. O escore 1 representa normalidade e a pontuação 5 é atribuída à gravidade máxima. Além disso, a extensão de cada característica pontuada no corte histológico também foi determinada em uma escala de 1 a 5, sendo 1 para nenhuma evidência visível e 5 para o envolvimento completo do tecido. As pontuações foram

calculadas como o produto da gravidade pela extensão de cada característica e, portanto, variaram de 0 a 25.

4.6. Análise morfométrica

A análise quantitativa foi realizada através da técnica convencional de contagem de pontos “point-counting” [129], utilizando-se um retículo acoplado a ocular do microscópio, contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 segmentos de reta dispostos em paralelo (Figura 4.6.1). A celularidade tecidual foi quantificada em 10 campos aleatórios e não-coincidentes por lâmina, em um aumento de 1000x, no qual foi computado o número de pontos do campo que coincidiam com a área de tecido, células mononucleares e polimorfonucleares, obtendo-se o número de células por área de tecido.

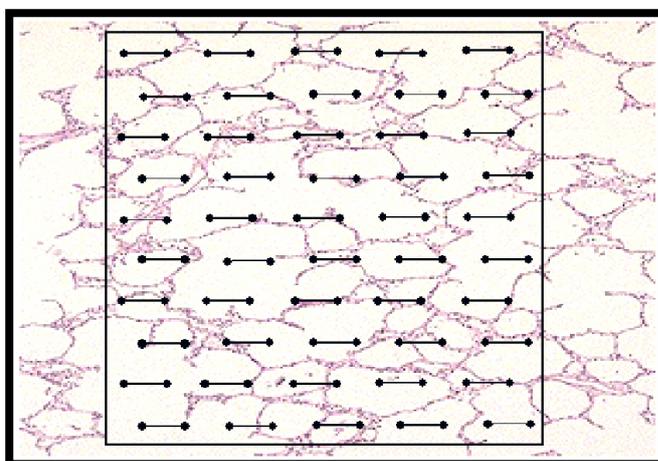


Figura 4.6.1 Representação esquemática do retículo utilizado para a técnica de contagem de pontos.

Retículo de 100 pontos e 50 retas utilizado para o cálculo da celularidade total e diferencial no tecido pulmonar.

4.7. Análises do fluido do lavado broncoalveolar e sangue

4.7.1. Coleta das amostras

Os animais foram anestesiados com isoflurano (Cristália, Itapira, SP, Brasil), e o sangue foi coletado por punção cardíaca, usando uma agulha de 26G conectada a uma seringa 1mL rinsada com citrato de sódio 3,4%. O sangue foi transferido para tubos eppendorf também contendo citrato de sódio 3,4%, centrifugado duas vezes a 1500 rpm durante 10 min a 4°C (Centrífuga da Eppendorf 5810 R, Eppendorf do Brasil Ltda, SP) e o plasma foi congelado a – 80°C para análises posteriores.

Também sob anestesia, os animais foram submetidos a traqueostomia para a obtenção do fluido do lavado broncoalveolar (BALF). A traqueia foi exposta e uma

pequena incisão em sua região anterior foi realizada para a inserção de um cateter flexível (40 mm x 12 mm) conectado a uma seringa com 1 ml de PBS contendo EDTA 10 mM. O lavado foi então centrifugado uma vez, seguindo o mesmo protocolo para separação do plasma e congelado a -80°C .

4.7.2. Contagem da celularidade diferencial

O precipitado de células do BALF obtido após centrifugação foi ressuspenso em 250 μL de PBS. Uma alíquota de sangue e da suspensão de células do BALF foi diluída em solução de Türk (1:10) para a contagem de leucócitos totais. A análise diferencial das populações mononucleares e polimorfonucleares foi realizada em citoesfregaços, centrifugados a uma rotação de 18.06 xg , por 5 min (citocentrífuga Shandon) e de lâminas de esfregaço sanguíneo, ambas coradas pelo método de May-Grunwald-Giemsa. A quantificação da celularidade total e diferencial foi realizada em uma câmara de Neubauer, utilizando microscópio óptico (BX51, Olympus) sob aumento de 200x e 1000x, respectivamente.

4.7.3. Análise de mediadores inflamatórios no BALF

Os níveis de MCP-1, IL-1 β e KC (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) no BALF foram detectados pelo método ELISA de acordo com instruções do fabricante. Os níveis dos mediadores inflamatórios foram expressos como quantidade do mediador pelo volume instilado (pg/ml). Resumidamente, o anticorpo primário foi diluído em PBS e adicionado à placa de 96 poços (50 μL / poço) e reservado *overnight* em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas 3 vezes em PBS-Tween 0,25% e foi adicionado o tampão de bloqueio (PBS-BSA 1%) por 1 hora. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas, seguindo o mesmo procedimento acima descrito, e o padrão do experimento e as amostras foram adicionados e mantidos por pelo menos 2 horas, em temperatura ambiente. Após lavagem, o anticorpo secundário foi adicionado e incubado por 2 horas. A estreptavidina-HRP foi diluída de acordo com as instruções do fabricante. Como substrato da reação de peroxidação, os poços foram incubados com 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), incubado a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A reação foi monitorizada e bloqueada com 2 M de H_2SO_4 . A leitura da absorbância foi realizada em um comprimento de onda de 450nm. Com os valores da curva padrão foi feita uma regressão não-linear no programa de estatística GraphPad Prism 6 (GraphPad, San Diego, CA, EUA).

4.7.4. Quantificação de proteínas no BALF

Após a coleta e centrifugação do BALF, a quantificação de proteínas das amostras foi realizada pelo método BCA utilizando-se um kit comercial (Pierce® BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific Inc., Rockford, IL, EUA). O método do ácido bicinconínico (BCA) permite a detecção colorimétrica e a quantificação de proteínas. Este método combina a redução de Cu^{2+} a Cu^+ por proteínas em meio alcalino (reação do biureto) com a detecção colorimétrica, muito sensível e seletiva, do cátion Cu^+ usando um reagente contendo ácido bicinconínico (Pierce). Nesta reação forma-se um produto de cor roxa, solúvel em água, com pico de absorbância a 562 nm.

A determinação do perfil de proteínas no BALF foi realizada através da comparação com uma amostra de plasma de animal infectado por *P. berghei* NK65. O perfil proteico foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%. O gel de corrida foi preparado com Tris- HCl 0,375 M pH 8.8, SDS 0,1%, acrilamida 10%, persulfato de amônio (APS) 0,1% e N,N,N,N tetra-metiletenodiamina (Temed, Sigma®). O gel de compactação foi preparado com Tris 0,125 M pH 6.8, SDS 0,1%, acrilamida 5%, persulfato de amônio 0,1% e Temed. As amostras de BALF e plasma foram diluídas em tampão de amostra (Tris HCl 0,0625 M pH 6.8, SDS 2%, glicerol, azul de bromofenol 0,01%, e β -mercaptoetanol). A eletroforese foi feita em tampão Tris 25 mM, glicina 0,19 M, SDS 0,1% à temperatura ambiente e sob uma voltagem constante de 120 V.

4.7.5. Hemograma e análise bioquímica

Amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca, conforme descrito acima, e transferidas para tubos de coleta para hemograma e bioquímica, e encaminhadas para análise na Plataforma de Análises Clínicas de Animais de Laboratório, ICBT, Fiocruz.

As análises de hemograma foram realizadas no analisador automatizado hematológico Poch 100 iV- DIFF (Sysmex, Kobe, Japão), que permite a contagem de diferentes parâmetros hematológicos, dentre os quais se incluem os analisados no presente trabalho: contagem de hemácias, leucócitos e plaquetas, hemoglobina e hematócrito.

As funções hepática e renal foram realizadas também por método automatizado, utilizando o equipamento Vitros 250 (Ortho clinical - Johnson & Johnson, New Brunswick, Nova Jersey, EUA) através da metodologia de química

seca, que utiliza um pequeno “slide” contendo seis camadas com reagentes sólidos, filtros, diferentes membranas, entre outras composições, que permitem a análise simultânea de diferentes parâmetros bioquímicos, dentre os quais foram analisados sódio, ureia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina e albumina.

4.8. Análise da formação de edema pulmonar

A relação entre o peso úmido e o peso seco pulmonar foi usada como metodologia para avaliar a formação do edema pulmonar, conforme descrito anteriormente [130]. Resumidamente, após a eutanásia do animal, os pulmões foram isolados cirurgicamente e a traqueia foi removida. Em seguida, os pulmões foram pesados e secos em micro-ondas, em potência baixa (200W), por 30 segundos e pesados novamente. O processo de secagem foi repetido até que a diferença entre os dois últimos valores obtidos fosse inferior a 5%. A última verificação do peso após o processo de secagem foi considerada como o peso seco.

4.9. Análise da permeabilidade da barreira hematoencefálica por Azul de Evans

A análise da integridade da barreira hematoencefálica foi realizada através da injeção de Azul de Evans a 2%, no sino retro-orbital. O azul de evans é um corante com alta afinidade pela albumina, o que permite a avaliação do extravasamento de conteúdo plasmático ao tecido estudado, e assim, indicar perda da integridade endotelial. Resumidamente, os animais foram anestesiados com isoflurano (Cristália, Itapira, SP, Brasil), mantidos em posição lateralizada e imobilizados, realizando um movimento de pinça para segurar a pele da região dorsal, entre as orelhas. Em seguida, foi realizada a injeção de 150 μ L da solução no ângulo médio do olho, com o bisel da agulha lateralizado e voltado para o focinho do animal, formando um ângulo de 30°. A agulha foi retirada lentamente, para que houvesse tempo de redistribuição do azul de evans no local.

Após 1 hora, os animais foram anestesiados e, após eutanásia, o cérebro foi coletado e imerso em 4 mL de solução de formamida (VETEC), e mantido em estufa (REVCO technologies, modelo RC03000TVBB) a 37°C por 24 horas, para a extração do corante. Em seguida, 200 μ L da formamida foram transferidos e a análise das amostras foi realizada em duplicada, em um comprimento de onda de 620 nm.

4.10. Análise estatística

O teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov foi realizado nos grupos. Os dados paramétricos foram submetidos a análise de variância (One-Way ANOVA) seguida do teste de Tukey para comparação entre grupos, ou a análise de dupla variância (Two-Way ANOVA) também seguida do teste de Tukey, quando indicado. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (grau de significância de 5%). Aos dados percentuais foi aplicada a transformação angular para a posterior realização dos testes estatísticos. Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism 6 (GraphPad, San Diego, CA, EUA).

5. Resultados

5.1. Infecção por *P. berghei* NK65 leva à alterações na função pulmonar e formação de edema pulmonar

Dentre os modelos experimentais de malária pulmonar existentes, a infecção por *Plasmodium berghei* NK65 (*PbNK65*) apresenta grande similaridade com a complicação pulmonar observada em humanos. Nele, são observadas a formação de edema pulmonar, hemorragia e um importante infiltrado inflamatório, composto majoritariamente por células mononucleares. Considerando a cinética do modelo escolhido, previamente descrita por Van den Steen e colaboradores [77, 111], no qual observa-se um aumento da parasitemia a partir do sexto dia pós-infecção (dpi), optou-se por investigar as alterações da função pulmonar a partir desse momento do protocolo experimental.

A fim de acompanhar o curso da infecção dos animais inoculados com *P. berghei* NK65, a análise da parasitemia em amostras de esfregaço sanguíneo foi iniciada no terceiro dpi, momento no qual observou-se uma média de 0,65% hemácias infectadas. No sexto dpi, houve um aumento da parasitemia para 3,45%, evoluindo para 7,99% no sétimo dpi, 14,02% no oitavo dpi, 23,63% no nono dpi e 22,48% no décimo dpi (Fig. 5.1.1 A).

Em paralelo a isso, a análise da função pulmonar e da formação de edema foi realizada através do método de oclusão ao final da expiração e da relação entre o peso úmido e peso seco pulmonar os dias 6 e 10 pós-infecção. A inoculação com 10^4 hemácias infectadas por *P. berghei* NK65 não levou a alteração dos parâmetros avaliados no sexto e sétimo dpi. Já no oitavo dpi, os animais do grupo *PbNK65* apresentaram aumento da pressão dissipada para vencer o componente viscoelástico do tecido pulmonar, representado por $\Delta P_{2,L}$ (Fig. 5.1.1 B), bem como da relação entre o peso úmido e peso seco pulmonar, em relação ao grupo controle (C) (Fig. 5.1.1 D). Análise realizada no nono dpi também indica um aumento de $\Delta P_{2,L}$, bem como da elastância estática do pulmão (Est,L), sendo esta o inverso da complacência pulmonar (Fig. 5.1.1 C), e a presença de edema pulmonar. Por último, os animais analisados no décimo dpi apresentaram maior $\Delta P_{2,L}$ e Est,L, além do aumento da pressão necessária para vencer o componente resistivo pulmonar ($\Delta P_{1,L}$), que corresponde ao componente viscoso do pulmão (Fig. 5.1.1 B). Apesar disso, não houve aumento da relação entre o peso úmido e peso seco pulmonar no

décimo dpi, o que pode indicar o início de um processo de remodelamento do parênquima pulmonar.

Em suma, observa-se que a inoculação do *P. berghei* NK65 acarreta em disfunção pulmonar, inicialmente através do aumento de pressão viscoelástica e da formação de edema pulmonar no oitavo dpi, havendo progressão do dano funcional pelo aumento de Est,L e $\Delta P_{2,L}$ nos dias nove e dez pós-infecção, respectivamente. Também no oitavo dia do protocolo experimental notou-se que os animais começam a sucumbir à infecção, havendo redução da taxa de sobrevivência, conforme mostrado a seguir. Assim, considerando o início das alterações supracitadas, conclui-se que a infecção por *P. berghei* NK65 leva à disfunção pulmonar a partir do oitavo dia de infecção.

Portanto, nos experimentos subsequentes, foram avaliados os efeitos do tratamento terapêutico com ácido acetilsalicílico (AAS) e do antimalárico dihidroartemisinina (DHA) no quadro já estabelecido de malária pulmonar. No protocolo adotado a seguir, os animais foram tratados no oitavo dpi com AAS 100mg/kg, v.o., DHA 3 mg/kg (ip) ou com a terapia combinada de DHA+AAS, e tiveram seus órgãos coletados para análise no nono ou décimo quinto dia pós-infecção, de acordo com o experimento a ser executado.

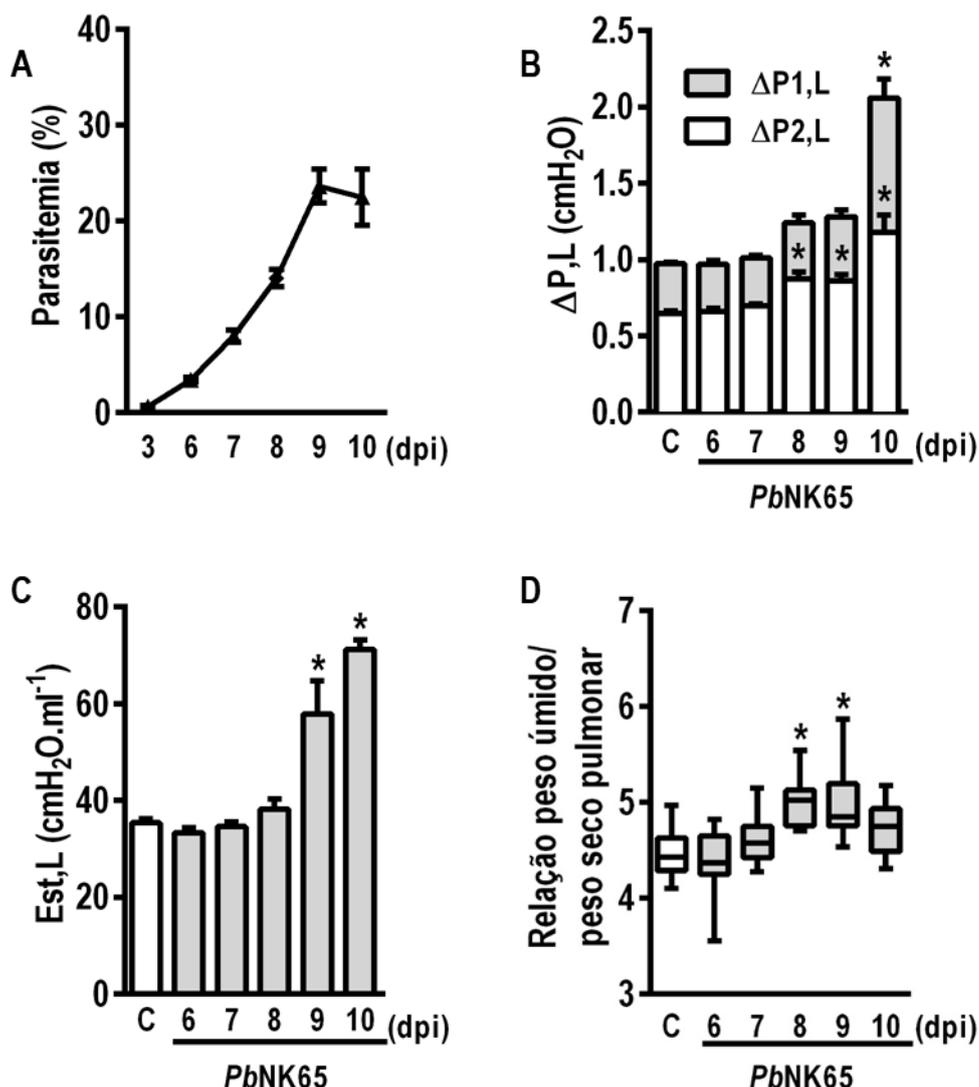


Figura 5.1.1 Infecção por *P. berghei* NK65 leva a disfunção pulmonar associada à edema.

A parasitemia foi determinada através de amostras de esfregaço sanguíneo nos dias 3, e 6 a 10 pós-infecção com 10^4 hemácias infectadas por *P. berghei* NK65 (A). Variação de pressão necessária para vencer os componentes resistivos ($\Delta P_{1,L}$) e viscoelásticos do pulmão ($\Delta P_{2,L}$). A variação de pressão total do pulmão ($\Delta P_{,L}$) corresponde a barra inteira (B). Elastância estática do pulmão (Est,L) (C). A formação de edema pulmonar foi analisada através da relação entre peso úmido e peso seco do pulmão entre o sexto e o décimo dia pós-infecção (D). Valores correspondem à média \pm erro padrão da média. *Significativamente diferente do controle salina (C-Sal) ($p < 0,05$). N= 7- 10 animais/grupo.

5.2. Tratamento com DHA não melhora as alterações morfo-funcionais induzidas por *P. berghei* NK65

De acordo com o manual de tratamento da malária publicado pela OMS, a terapia combinada à base de artemisinina (ACT) é recomendada em casos graves da doença ou quando há resistência à cloroquina [74]. Dentre os derivados da artemisinina, a dihidroartemisinina (DHA) é conhecida por promover o “clearance” de

parasitas rapidamente [74], bem como por seus efeitos anti-inflamatórios [86], sendo este outro mecanismo vantajoso para o tratamento da disfunção pulmonar causada pela infecção por *P. berghei* NK65.

Assim, considerando as características supracitadas, os animais do grupo controle e infectado receberam DHA (3 mg/kg, ip.) ou salina no oitavo dpi, e as análises de mecânica respiratória e da formação de edema pulmonar foram realizadas no nono dpi. Não houve diferença entre os parâmetros morfofuncionais analisados entre os grupos controle salina e DHA. O grupo *Pb*+Sal apresentou maiores pressões resistiva e viscoelástica pulmonar, além de maior elastância estática e formação de edema pulmonar em comparação ao grupo C+Sal (Fig. 5.2.1 A-C). O tratamento com DHA solubilizada em salina (*Pb*+DHA(Sal)), descrito anteriormente em modelo de malária cerebral [118], levou a uma redução da pressão viscoelástica em relação ao grupo infectado não tratado. Entretanto, a pressão resistiva e elastância estática pulmonar permaneceram elevados em comparação ao grupo C+Sal. O tratamento com DHA não foi capaz de reduzir a relação entre peso úmido e peso seco pulmonar em comparação ao grupo *Pb*+Sal, indicando assim a permanência do edema pulmonar mesmo após o tratamento com o antimalárico (Fig. 5.2.1 C).

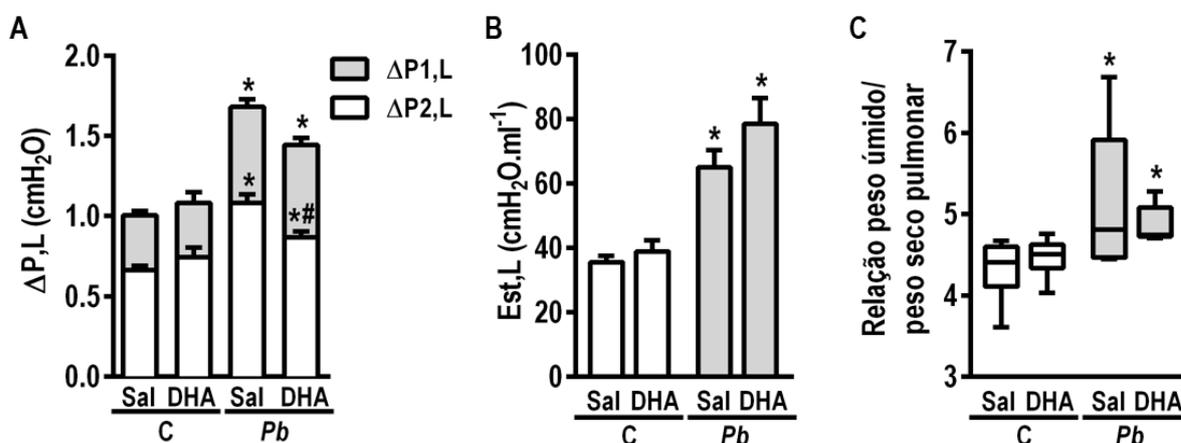


Figura 5.2.1 DHA não reverte disfunção pulmonar e edema causados pela infecção por *P. berghei* NK65.

Camundongos C57BL/6 foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65, tratados com DHA solubilizada em salina no 8º dpi e ventilados mecanicamente no 9º dpi. Variação de pressão necessária para vencer os componentes resistivos ($\Delta P_{1,L}$) e viscoelásticos do pulmão ($\Delta P_{2,L}$). A variação de pressão total do pulmão (ΔP_{L}) corresponde a barra inteira (A). Elastância estática do pulmão (Est_L) (B). A formação de edema pulmonar foi analisada através da relação entre peso úmido e peso seco do pulmão (C). Valores correspondem à média \pm erro padrão da média. *Significativamente diferente de C-Sal ($p < 0,05$); #Significativamente diferente de *Pb*-Sal ($p < 0,05$). N= 7- 10 animais/grupo. Legenda: C= Controle; DHA= dihidroartemisinina; *Pb*= *Plasmodium berghei* NK65; Sal= Salina.

Os animais submetidos à análise da mecânica respiratória tiveram os pulmões coletados ao término do experimento para análise das alterações histológicas decorrentes da infecção. A avaliação do dano alveolar difuso (DAD), foi realizada através de um escore semiquantitativo, no qual foram observadas a formação de edema alveolar, espessamento de septo alveolar, inflamação, áreas de atelectasia e hemorragia. Os animais não-infectados tratados com a DHA mantiveram a integridade do tecido pulmonar, e não foram observados recrutamento de leucócitos ou alterações da arquitetura do parênquima pulmonar (Figura 5.2.2).

A infecção por *P. berghei* NK65 leva a alterações histológicas caracterizadas por edema intersticial, importante infiltrado inflamatório, bem como áreas de micro-hemorragia (asterisco), edema perivascular e atelectasia (círculo preto), observáveis em menor aumento (Figura 5.2.2 E-F). Tal infiltrado de leucócitos para o tecido pulmonar é marcado pela presença majoritária de células mononucleares, dentre as quais destaca-se a abundância de macrófagos (setas pretas) no interstício e menos frequentemente, no espaço alveolar. Nota-se também que estes macrófagos realizam a fagocitose de pigmento malárico (ou hemozoína, cabeça de seta branca e áreas em maior aumento), observáveis de forma discreta como pontos de coloração acastanhada, no interstício (Figura 5.2.2 F).

Os achados histológicos no grupo infectado e tratado com DHA se assemelham ao observado no grupo *Pb*+Sal. Há presença aumentada de leucócitos no interstício, bem como espessamento de septo alveolar, que corrobora o comprometimento pulmonar observado na mecânica respiratória. No entanto, os pontos de hemorragia são menos frequentes ao longo do corte histológico, quando observado em menor aumento. As fotomicrografias representativas em maior aumento também evidenciam a presença abundante de macrófagos no interstício (setas pretas), e pigmento malárico (cabeça de seta branca) (Figura 5.2.2 G-H).

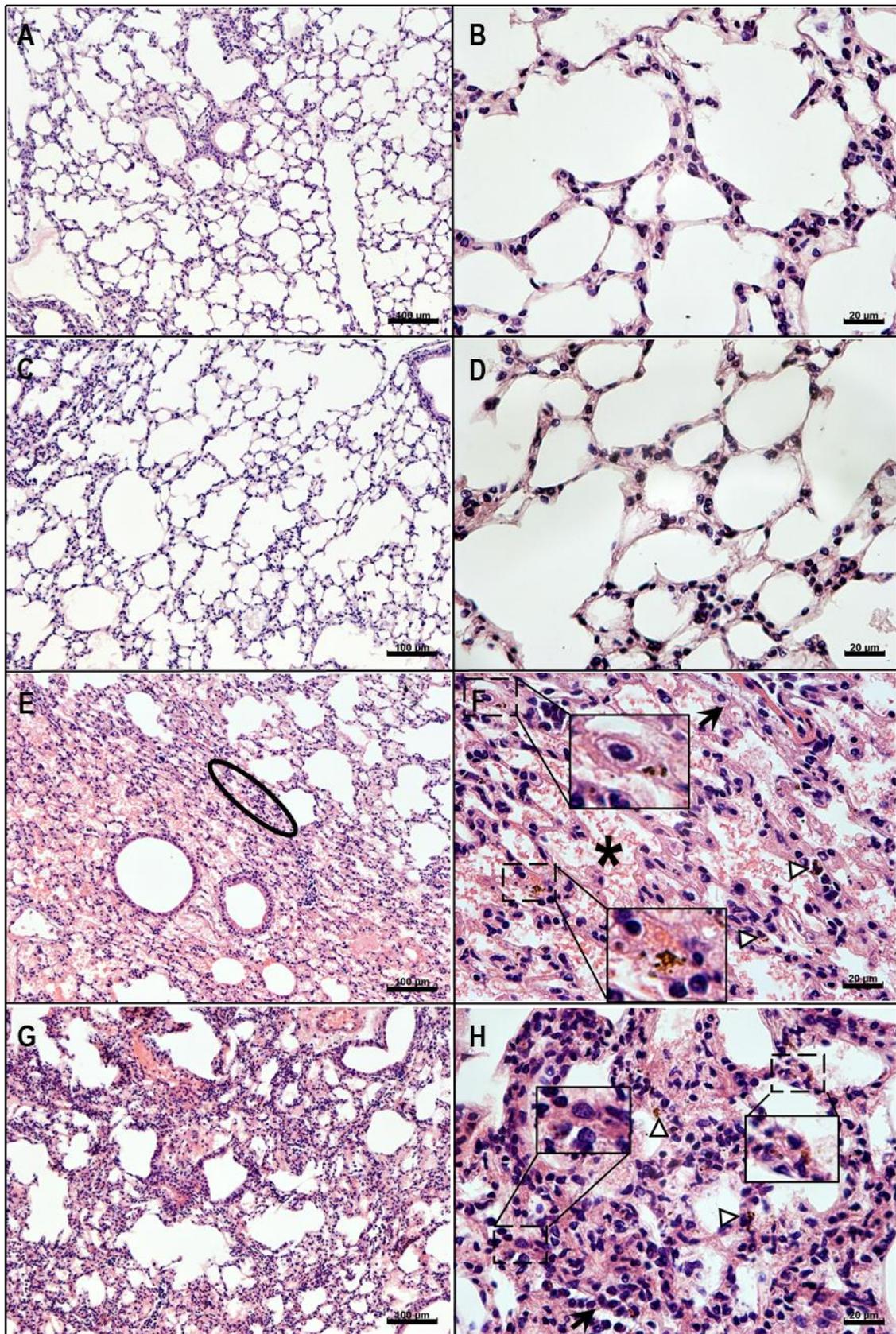


Figura 5.2.2 Infecção por *P. berghei* NK65 leva a alterações morfológicas no tecido pulmonar.

Camundongos C57BL/6 foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65, tratados com DHA solubilizada em salina no 8º dpi. Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar utilizado para análise do dano alveolar difuso (DAD) no 9º dpi. Observe-se o espessamento de septo alveolar, infiltrado inflamatório, atelectasia (círculo) e

hemorragia (asterisco) nos grupos infectados. Note a presença abundante de macrófagos (setas) e de pigmento malárico (hemozoína, cabeça de seta) nos animais infectados, ambos salientados em maior magnificação. Grupos: Controle+salina (**A-B**); Controle+DHA (**C-D**); *Pb*+Sal (**E-F**); e *Pb*+DHA (**G-H**). Barras correspondem a 100 μ m (imagens à esquerda) e 20 μ m (direita).

Legenda: C= Controle; DHA= dihidroartemisinina; *Pb*= *Plasmodium berghei* NK65; Sal= Salina.

Dentre as alterações histológicas observadas, o grupo *Pb*+Sal apresentou aumento de todos os parâmetros quantificados em relação ao grupo controle. O tratamento com DHA solubilizada em salina não foi capaz de mitigar o acometimento pulmonar ocasionado pela infecção por *P. berghei* NK65, havendo também presença de edema alveolar, espessamento de septo alveolar, presença de infiltrado inflamatório e áreas de atelectasia. No entanto, apesar de haver áreas focais de micro-hemorragia no grupo *Pb*+DHA não houve diferença estatística em relação aos grupos controle, ou redução em relação ao grupo *Pb*+Sal (Figura 5.2.3 A-F).

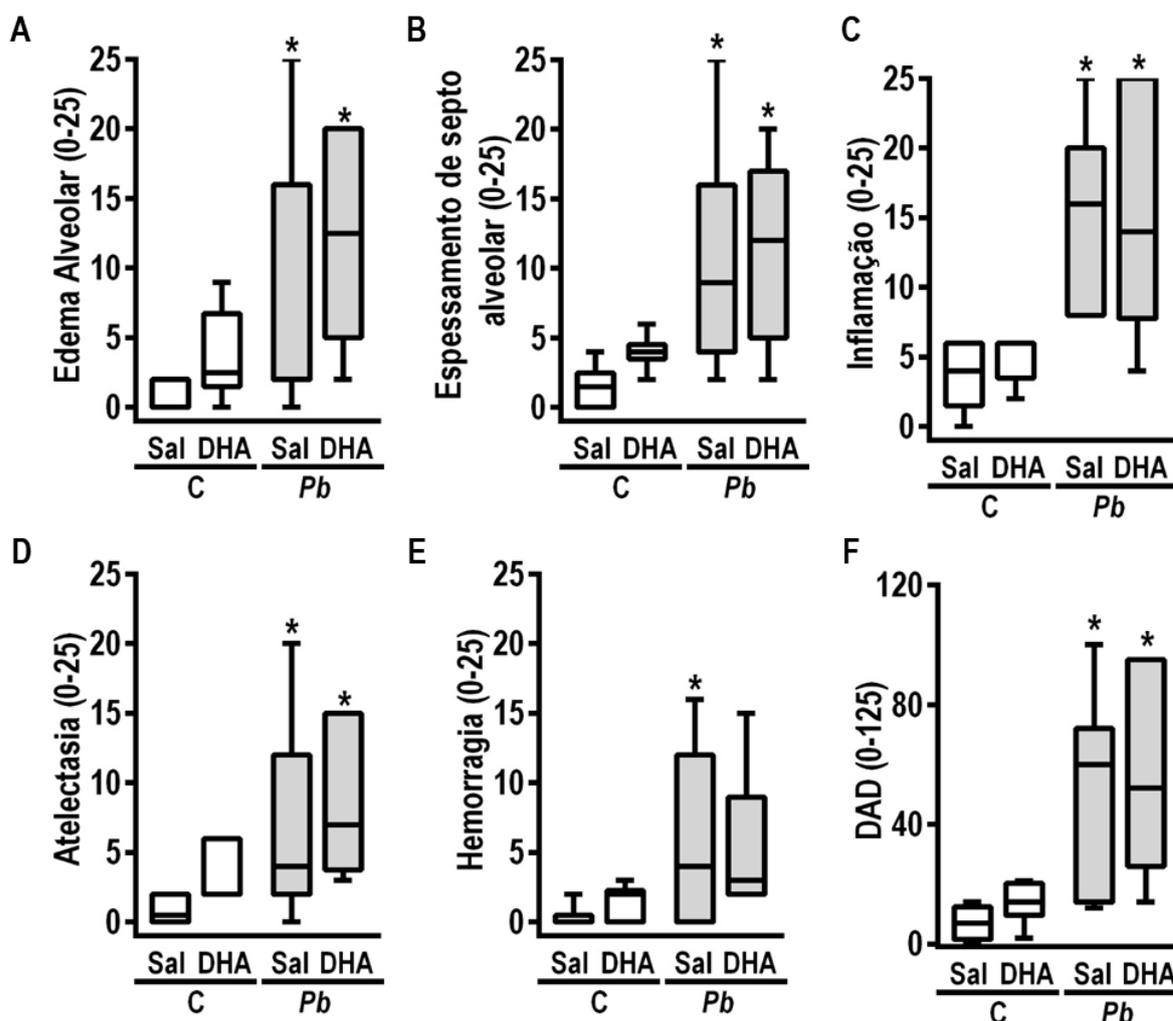


Figura 5.2.3 Análise do dano difuso alveolar após infecção por *P. berghei* NK65 e tratamento com DHA.

Camundongos C57BL/6 foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65, tratados com DHA solubilizada em salina no 8º dpi. A análise do dano alveolar difuso (DAD) foi realizada através de um sistema de escore ponderado por um pesquisador cego para o protocolo experimental, no 9º dpi. As pontuações foram calculadas como o produto da gravidade pela extensão de cada característica. Foram analisados a formação de edema alveolar (A), espessamento de septo alveolar (B), inflamação (C), atelectasia (D) e hemorragia (E). O escore final é apresentado como a soma de todos os parâmetros avaliados (F). Valores correspondem à média \pm erro padrão da média. *Significativamente diferente de C+Sal ($p < 0,05$). N= 7- 10 animais/grupo.

Legenda: Pb= *Plasmodium berghei* NK65; DHA= dihidroartemisinina; Sal= salina.

5.3. DHA prolongou a sobrevivência e modulou a celularidade total e diferencial do BALF na infecção por *P. berghei* NK65

A permanência de alterações morfofuncionais após o tratamento com a DHA nos levou a investigar se a eficácia do antimalárico poderia variar de acordo com sua forma de solubilização. Tal hipótese é reforçada pela pluralidade de veículos usados em diferentes estudos publicados, sem haver a padronização ou um protocolo estabelecido. Nesse contexto, a DHA solubilizada em salina foi descrita em modelo murino de malária cerebral, para tratamento de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA [118]. Em contrapartida, estudos sobre a farmacodinâmica da DHA usando camundongos Swiss também infectados por *P. berghei* ANKA usaram como veículo uma proporção de 60:40 de Dimetilsulfóxido (DMSO) e Polissorbato 80 (PS) [131, 132]. E mais frequentemente, modelos murinos usando camundongos balb/c [133] e C57BL/6 [134], além de estudos in vitro [135] referem o uso de DMSO para a solubilização da DHA.

Com o intuito de avaliar se o efeito da DHA na sobrevivência e parasitemia no presente modelo poderia variar de acordo com o veículo utilizado, os animais foram tratados com a DHA solubilizada em solução salina, DMSO ou uma proporção de 60:40 de (DMSO: PS), entre os dias 8 e 15 pós-infecção. Além disso, a cloroquina (CQ) foi usada como controle positivo do tratamento antimalárico, tendo em vista que ela é capaz de eliminar a parasitemia em outros modelos murinos de malária. A infecção por *P. berghei* NK65 levou a uma sobrevivência de 33,3% no dia 15 pós-infecção. Surpreendentemente, o grupo Pb+DHA (Sal) apresentou uma sobrevivência de apenas 50% não havendo, portanto, diferença em relação ao grupo Pb+DMSO. Os grupos Pb+DHA (DMSO) e Pb+CQ apresentaram 100% de sobrevivência, e o grupo Pb+DHA (DMSO:PS) manteve 87,5% de sobrevivência no 15º dpi, havendo, assim diferença significativa de todos os grupos em relação ao Pb+DMSO. Cabe ressaltar que os animais do grupo Pb+DHA (Sal) e o grupo não tratado apresentaram início

da mortalidade em tempos semelhantes, entre o nono e décimo dias pós-infecção (Figura 5.3.1 A).

A parasitemia foi avaliada diariamente, a partir do início do tratamento com a DHA. Os grupos *Pb+CQ*, *Pb+DHA* (DMSO:PS) e *Pb+DHA* (DMSO) apresentaram queda da parasitemia em relação ao grupo *Pb+DMSO* no 9º dpi. Entretanto, o grupo *Pb+DHA* (Sal) manteve a progressão da parasitemia 24 horas após o início do tratamento, momento no qual o grupo passou a apresentar redução da sobrevivência, conforme indicado acima. Cabe enfatizar que os tratamentos com cloroquina e com DHA solubilizada em DMSO levaram a uma redução da parasitemia em comparação ao grupo *Pb+DHA* (Sal), também no 9º dpi.

Houve redução da parasitemia em todos os grupos tratados com antimalárico no dia 10 em comparação com o grupo *Pb+DMSO*. No entanto, apenas o tratamento com cloroquina foi capaz de reduzir drasticamente a parasitemia entre o 11º e o 12º dpi (0,48% e 0,34%, respectivamente), e eliminar a parasitemia a partir do dia 13 pós-infecção. Nota-se que neste a partir do 11º dpi, o grupo *Pb+DHA* (DMSO) começa a recuperar a parasitemia e que o mesmo ocorre com os demais grupos tratados com DHA a partir do 12º dpi. Todos os grupos tratados com DHA mantiveram uma progressão semelhante da parasitemia entre os dias 12 e 15 pós-infecção (Figura 5.3.1 B).

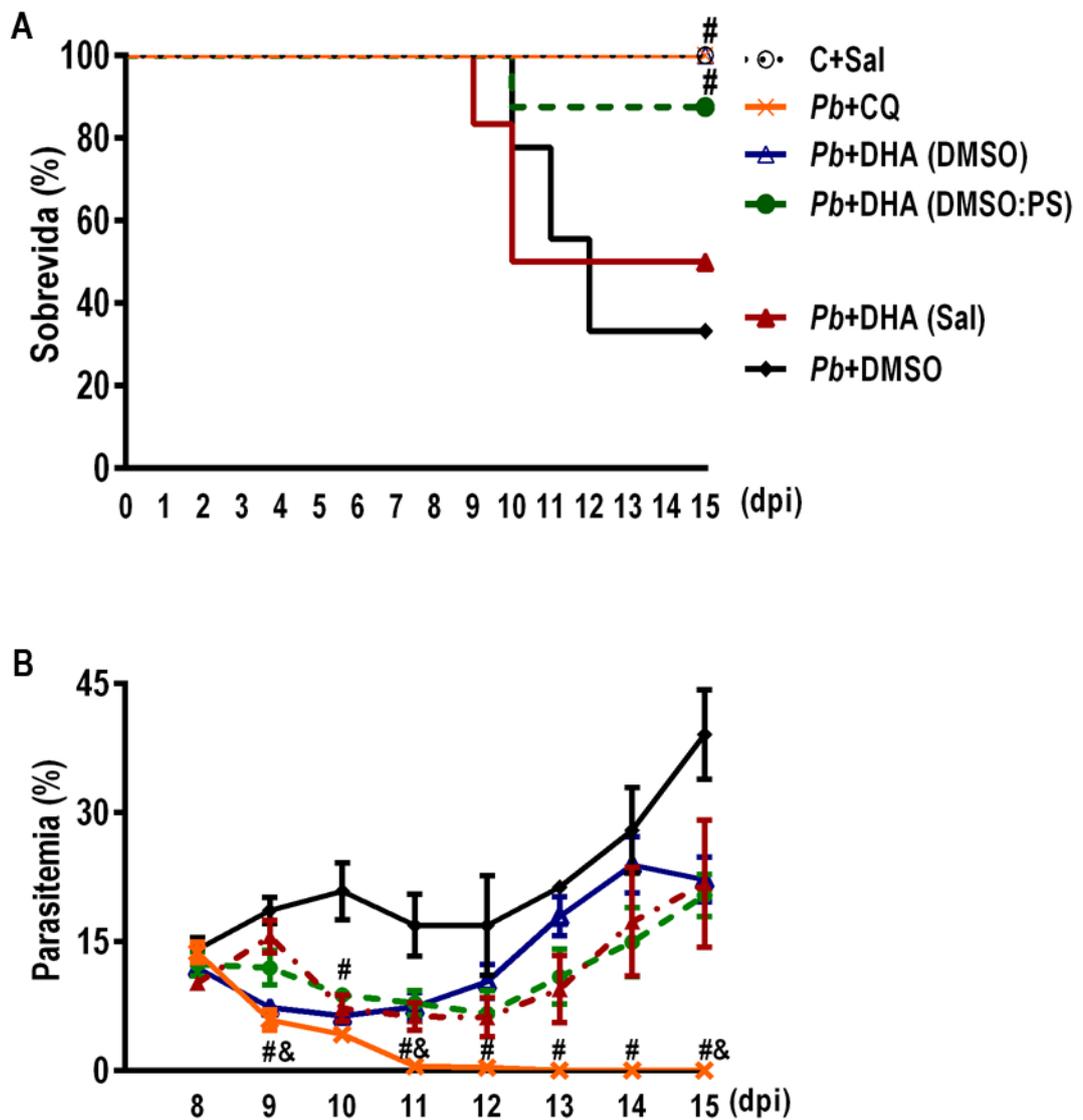


Figura 5.3.1 Sobrevida e parasitemia varia de acordo com a forma de solubilização da DHA.

Camundongos foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65 e tratados entre os dias 8 e 14 dpi com 3 mg/kg de DHA solubilizada em salina, DMSO, ou uma proporção de 60:40 DMSO:PS, via intraperitoneal, ou 25 mg/kg de cloroquina, por via oral. Sobrevida (A) e parasitemia (B) foram avaliadas diariamente, até o 15º dpi. Valores correspondem à média \pm erro padrão da média. #Significativamente diferente de *Pb*+DMSO; &Significativamente diferente de *Pb*+DHA (Sal) ($p < 0,05$). N= 7-10 animais/grupo.

Legenda: *Pb*= *Plasmodium berghei* NK65; DMSO= dimetilsulfóxido; DHA= dihidroartemisinina CQ= cloroquina DMSO:PS= DMSO: Polissorbato 80; Sal= salina.

Desta forma, conclui-se que a forma de solubilização da DHA influencia na sobrevida e parasitemia de animais infectados com *P. berghei* NK65, e que tais diferenças podem ser observadas nas primeiras 24 horas após o tratamento, de forma significativa. Assim, com o intuito de observar se o tratamento com DHA ou cloroquina poderia influenciar no o perfil de migração de leucócitos para os pulmões, analisamos a celularidade total e diferencial do sangue periférico e do BALF no nono dia de protocolo experimental.

A infecção com *P. berghei* NK65 levou a um aumento do número de células polimorfonucleares no sangue comparado ao grupo controle, sem haver, no entanto, aumento no total de leucócitos ou da fração mononuclear no 9º dpi. Apesar disso, a análise da celularidade total e diferencial no BALF indica revelou um importante aumento do número de leucócitos totais, relacionado ao aumento da fração de células mononucleares em comparação ao grupo controle. Cabe ressaltar que não houve aumento de células polimorfonucleares no BALF no grupo *Pb*+DMSO. Tal resultado sugere que o presente modelo de malária pulmonar leva a um recrutamento de células mononucleares ao espaço alveolar, mimetizando assim o padrão observado em humanos [58] (Figura 5.3.2 A-F).

De forma interessante, o tratamento com cloroquina levou ao aumento no total de leucócitos no sangue, apesar de não haver diferença significativa na contagem diferencial de células (Figura 5.3.2 A-C). Entretanto, a contagem de células totais, bem como a celularidade diferencial no BALF foi semelhante ao grupo controle não-infectado (Figura 5.3.2 D-F). Assim, os dados obtidos demonstram que a cloroquina foi capaz de reduzir significativamente a parasitemia e mitigar a contagem total e das frações mononuclear e polimorfonuclear no BALF 24 horas após o tratamento.

O grupo *Pb*+DHA (DMSO) manteve o perfil de celularidade total e diferencial no sangue observado no grupo *Pb*+DMSO, havendo aumento total de leucócitos e da fração de células polimorfonucleares em relação ao controle (Figura 5.3.2 A-C). Entretanto, apesar de haver um discreto aumento do número de leucócitos no BALF, não foi observada diferença nas contagens total ou diferencial em comparação ao controle (Figura 5.3.2 D-F).

Os grupos *Pb*+DHA (Sal) e *Pb*+DHA (DMSO:PS) não apresentaram alterações nos leucócitos totais ou diferenciais do sangue ou BALF em comparação ao grupo controle (Figura 5.3.2 A-F).

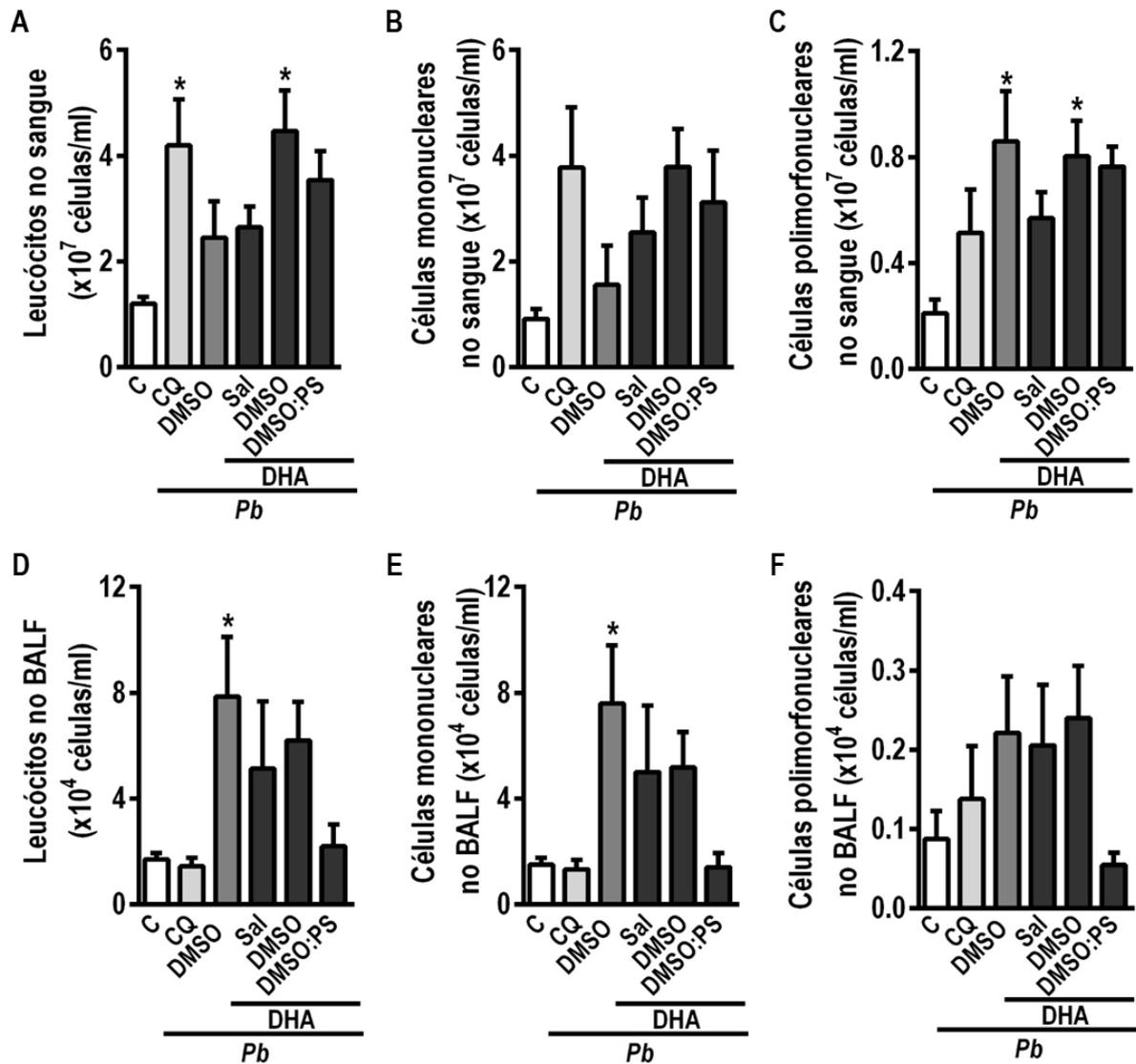


Figura 5.3.2 Celularidade total e diferencial no BALF varia de acordo com a solubilização da DHA.

Camundongos foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65 e tratados entre no dia 8 dpi com 3 mg/kg de DHA solubilizada em salina, DMSO, ou uma proporção de 60:40 DMSO:PS, via intraperitoneal, ou 25 mg/kg de cloroquina, por via oral. A contagem total e diferencial de leucócitos no sangue (A-C) e BALF (D-F) foi realizada 24h após o tratamento com DHA ou cloroquina. Valores correspondem à média \pm erro padrão da média. *Significativamente diferente de C+Sal ($p < 0,05$). N= 4- 9 animais/grupo.

Legenda: *Pb*= *Plasmodium berghei* NK65; DMSO= dimetilsulfóxido; DHA= dihidroartemisinina; CQ= cloroquina; DMSO:PS= DMSO: Polissorbato 80; Sal= salina; BALF= Fluido do lavado broncoalveolar.

5.4. Efeitos da DHA na permeabilidade da barreira alvéolo-capilar e níveis de MCP-1 no BALF na SDRA associada à malária

Considerando que o modelo de malária pulmonar usado deste estudo leva ao aumento do número total de leucócitos no fluido do lavado broncoalveolar (BALF), devido ao influxo de células mononucleares ao espaço alveolar, realizamos a avaliação da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar através da quantificação de proteína no BALF, no 9º dpi.

A infecção por *P. berghei* NK65 levou a uma maior concentração de proteínas no BALF em comparação aos animais controle. Tal aumento também foi observado os grupos tratados com DHA solubilizada em salina e DMSO:PS. No entanto, os grupos *Pb*+DHA (DMSO) e *Pb*+CQ, não obtiveram aumento estatisticamente significativo na quantificação de proteínas no BALF relação ao controle (Figura 5.4.1 B). Este resultado é corroborado pelo gel de poliacrilamida de amostras representativas dos grupos estudados e de uma amostra de plasma, que indica que o perfil de proteínas encontrado no BALF dos grupos infectados é semelhante ao observado no plasma. De forma interessante, ao contrário do grupo *Pb*+DHA (DMSO), o tratamento com cloroquina levou a um perfil de proteínas no BALF semelhante ao controle (Figura 5.4.1 A).

Além disso, a infecção por *P. berghei* NK65 levou a maior quantificação dos níveis da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) no BALF em relação ao grupo controle, o que justifica a migração de células mononucleares ao BALF observada na figura 5.3.2 E. Todos os grupos tratados com a DHA, independente da forma de solubilização, também apresentaram aumento MCP-1 no BALF em relação ao controle, sem haver, no entanto, redução em relação ao grupo *Pb*+DMSO (Figura 5.4.1 C).

O uso da cloroquina também foi capaz de reduzir a quantificação de MCP-1 a níveis similares ao grupo controle (Figura 5.4.1 C). Tal resultado indica que a redução do número de células mononucleares no BALF após tratamento com cloroquina pode ser atribuída à redução dos níveis do MCP-1 no BALF.

Surpreendentemente, não houve diferença significativa nos níveis de IL-1 β entre os grupos infectados, tratados com DHA ou cloroquina e o grupo controle (Figura 5.4.1 D). Considerando que a análise foi realizada 24h após o tratamento, a similaridade na quantificação de IL-1 β poderia ser justificada pela cinética do mRNA no presente modelo. Desta forma, os resultados obtidos sugerem que a DHA é

capaz de prolongar a sobrevida no presente modelo experimental, apesar de não reverter a lesão pulmonar em 24 horas.

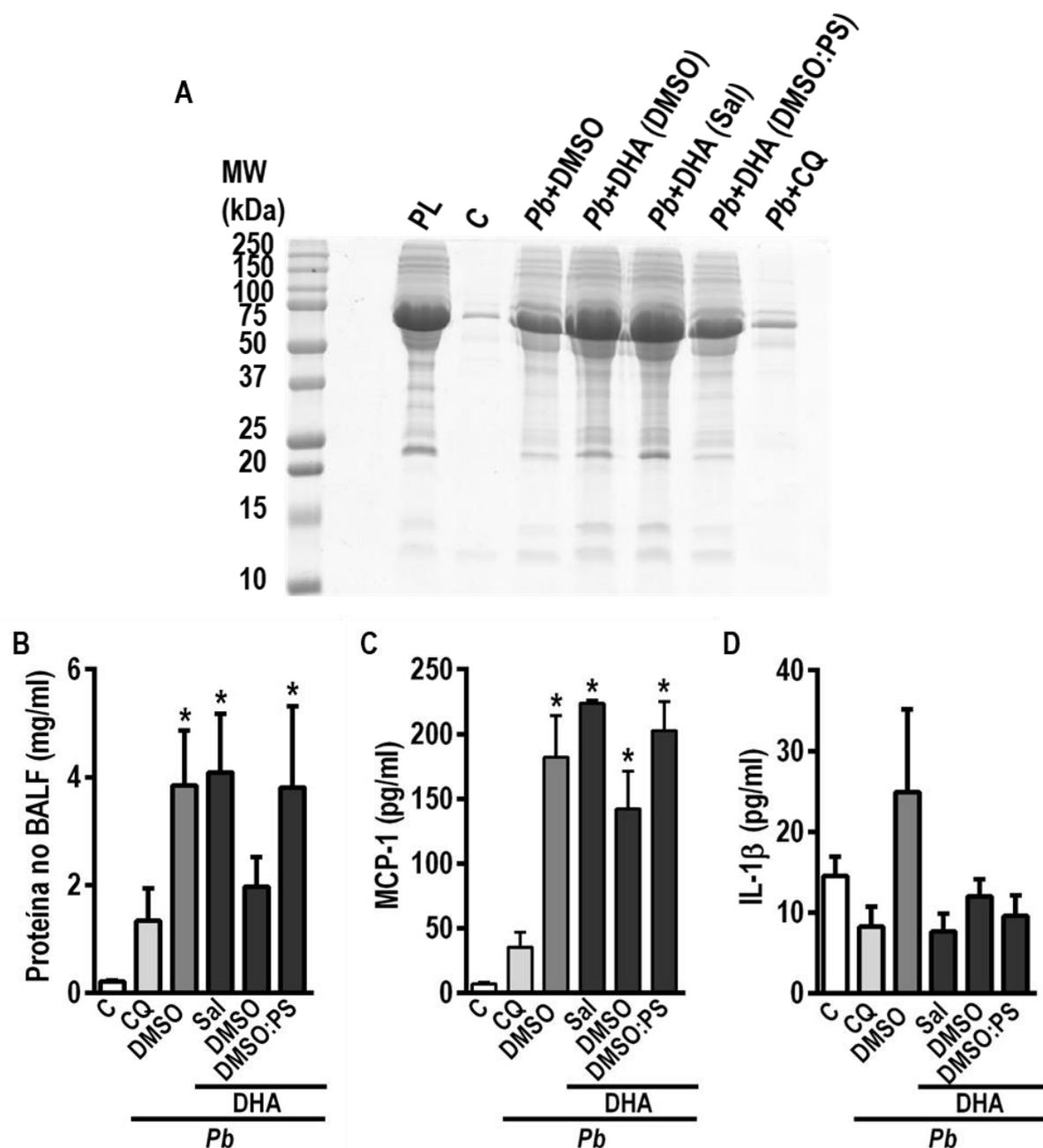


Figura 5.4.1 Permeabilidade da barreira alvéolo-capilar e níveis de MCP-1 e IL-1 β na SDR associada à malária.

Camundongos foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65 e tratados entre no dia 8 dpi com 3 mg/kg de DHA solubilizada em salina, DMSO, ou uma proporção de 60:40 DMSO:PS, via intraperitoneal, ou 25 mg/kg de cloroquina, por via oral. Amostras de BALF de animais controle, infectados, e tratados com DHA ou cloroquina foram analisadas no 9º dpi. O perfil de proteínas no BALF foi comparado com amostra de plasma por eletroforese em gel de poliácridamida corado com coomassie blue (A) e a concentração de proteínas foi determinada por BCA (B). Níveis de MCP-1 e IL-1 β foram avaliados por ELISA (C-D). Valores correspondem à média \pm erro padrão da média. *Significativamente diferente de C+Sal ($p < 0,05$). N= 4- 9 animais/grupo.

Legenda: *Pb*= *Plasmodium berghei* NK65; DMSO= dimetilsulfóxido; DHA= dihidroartemisinina CQ= cloroquina DMSO:PS= DMSO: Polissorbato 80; Sal= salina; BALF= Fluido do lavado broncoalveolar; IL-1 β = interleucina 1 beta; MCP-1= proteína quimiotática de monócitos.

Neste primeiro bloco, infecção por *P. berghei* NK65 levou a um acometimento pulmonar caracterizado pelo influxo de células mononucleares para o tecido pulmonar e BALF, bem como pelo aumento da quantificação de proteínas e dos níveis de MCP-1 no BALF, conforme previamente descrito na literatura [111]. Em conjunto, notou-se o aumento da elastância estática pulmonar, das pressões resistiva e viscoelástica e do escore de dano alveolar difuso, que endossa o presente modelo experimental como uma alternativa que mimetiza as alterações observadas em humanos e possibilita o estudo da fisiopatologia da malária pulmonar e possíveis tratamentos.

Considerando que o tratamento antimalárico não impede que o paciente apresente complicações respiratórias; que a cloroquina impediu a progressão das alterações pulmonares; e que o tratamento com DHA solubilizado em DMSO manteve a sobrevivência após a infecção sem, no entanto, eliminar a parasitemia ou reduzir a quantificação de proteínas e os níveis de MCP-1 no BALF, optamos por usar este esquema de tratamento nos experimentos subsequentes.

5.5. DHA e AAS não interferem em 24h na anemia e plaquetopenia causadas pela infecção por *P. berghei* NK65

A partir dos resultados obtidos no primeiro bloco de experimentos, utilizamos a DHA como tratamento antimalárico no modelo de SDRA associada à malária e investigamos se o ácido acetilsalicílico (AAS) poderia ter algum efeito deletério na malária pulmonar. A malária, dentre outros sinais e sintomas, pode levar a um quadro de anemia e plaquetopenia, que em infecções por *P. falciparum* pode ser grave. Tal quadro pode ser reproduzido em modelos experimentais da doença, como ocorre pela inoculação do *P. berghei* ANKA e *P. berghei* NK65.

No presente estudo, a infecção por *P. berghei* NK65 levou à redução da contagem de hemácias, da quantificação de hemoglobina e do hematócrito no nono dia após a infecção, em comparação aos animais não-infectados. A anemia observada no grupo infectado foi mantida 24 horas após o tratamento com DHA, AAS ou DHA+AAS, não havendo diferença entre os grupos experimentais (Figura 5.5.1 A-C).

Além da anemia, a infecção por *P. berghei* NK65 reduziu bruscamente a contagem de plaquetas no 9º dpi. O tratamento com antimalárico sozinho ou associado ao AAS não promoveu alterações na plaquetopenia provocada pela infecção. Cabe ressaltar que o tratamento apenas com AAS, conhecido por seu efeito de inibição da agregação plaquetária, também não interferiu na contagem de plaquetas em relação ao grupo *Pb*+DMSO (Figura 5.5.1 D).

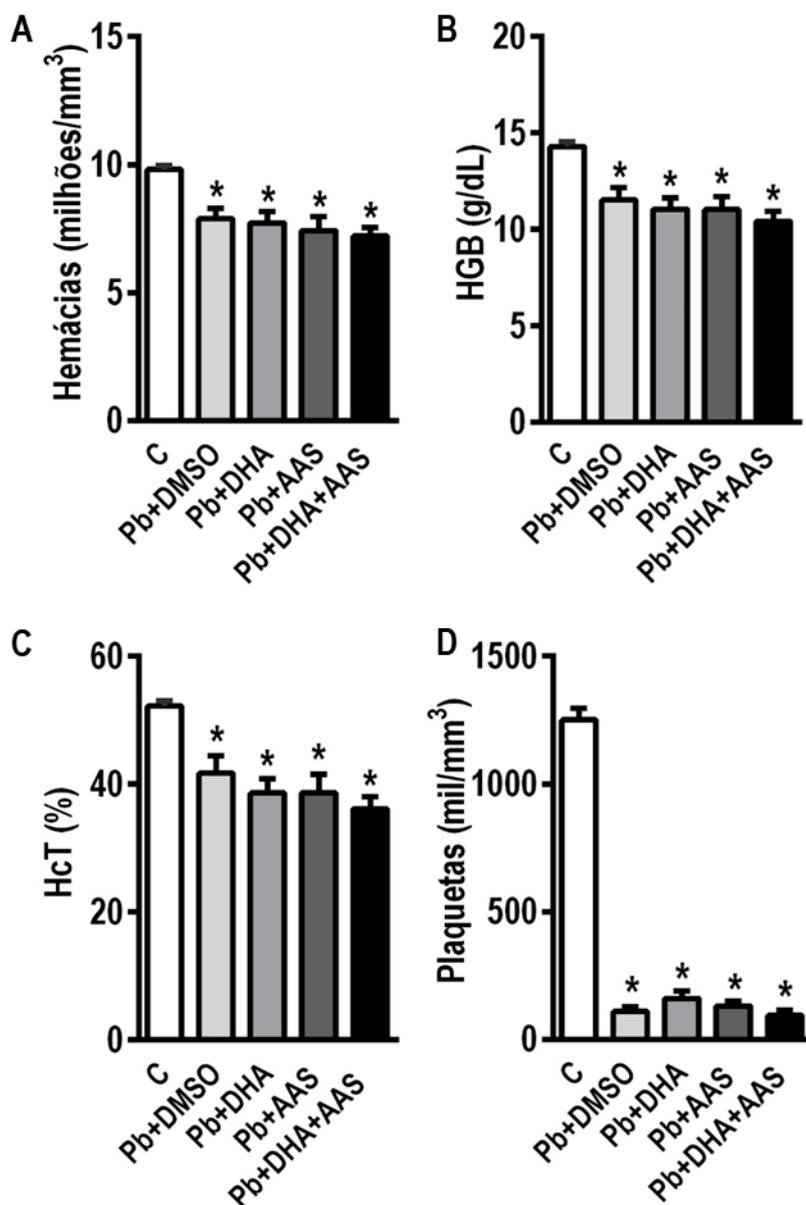


Figura 5.5.1 Infecção por *P. berghei* NK65 leva à anemia e plaquetopenia. Camundongos foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65 e tratados com AAS, DHA, DHA+AAS ou veículo (DMSO) no 8º dpi. A contagem de hemácias (A), quantificação de hemoglobina (B), do hematócrito (C) e contagem de plaquetas (D) foram realizadas no dia 9 pós-infecção. Valores correspondem à média \pm erro padrão da média. *Significativamente diferente de C ($p < 0,05$). N= 7- 9 animais/grupo. *Pb*= *Plasmodium berghei* NK65; C= controle+DMSO; DMSO= dimetilsulfóxido; AAS= Ácido acetilsalicílico DHA= dihidroartemisinina; HGB= Hemoglobina; HcT= hematócrito.

A fim de determinar se o tratamento com DHA ou AAS levaria a alterações na contagem total e diferencial de leucócitos no sangue a celularidade foi analisada no 9º dpi. O grupo *Pb*+DMSO não apresentou diferença significativa no número de leucócitos totais ou na contagem diferencial em relação ao grupo não-infectado.

De forma semelhante, tratamento somente com a DHA também não levou a alterações na contagem de leucócitos no sangue. Entretanto, 24 horas após o tratamento com AAS ou DHA+AAS observou-se um aumento significativo de leucócitos totais, devido ao aumento do número de células polimorfonucleares no grupo *Pb*+AAS e das frações mononucleares e polimorfonucleares no grupo *Pb*+DHA+AAS (Figura 5.5.2 A-C).

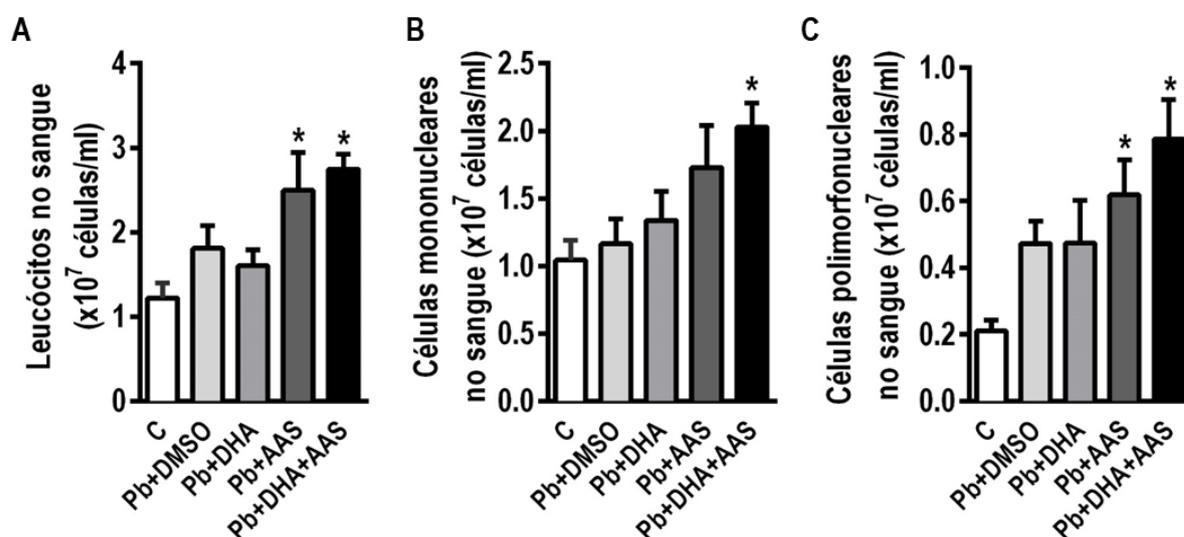


Figura 5.5.2 Celularidade diferencial no sangue após infecção por *P. berghei* NK65 e tratamento com DHA e AAS.

Camundongos foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65 e tratados com AAS, DHA, DHA+AAS ou veículo (DMSO) no 8º dpi. A contagem total de leucócitos (A), de células mononucleares (B) e polimorfonucleares (C) no sangue foi realizada no 9º dpi em 10 campos não coincidentes de lâminas de esfregaço sanguíneo, em microscópio de campo claro, sob aumento de 1000x. Valores correspondem à média \pm erro padrão da média. *Significativamente diferente de C ($p < 0,05$). N= 6- 14 animais/grupo. Legenda: *Pb*= *Plasmodium berghei* NK65; C= controle+DMSO; DMSO= dimetilsulfóxido; AAS= Ácido acetilsalicílico; DHA= dihidroartemisinina.

5.6. AAS modula a migração de células mononucleares ao tecido pulmonar na SDRA associada à malária

Com o intuito de averiguar se o aumento de leucócitos circulantes após o tratamento com AAS ou associado ao antimalárico poderia influenciar o recrutamento destes para o tecido pulmonar, analisamos a celularidade total e diferencial do pulmão e do BALF.

A infecção por *P. berghei* NK65 levou a um importante infiltrado inflamatório, havendo presença majoritariamente de macrófagos, tanto no tecido pulmonar quanto no espaço alveolar (Figura 5.6.1 B, setas pretas). Tais achados são compatíveis com a análise do DAD, na qual observou-se espessamento de septo alveolar, edema alveolar e inflamação (Figura 5.2.2). Além disso, a análise da celularidade total e diferencial no pulmão demonstrou que o grupo *Pb*+DMSO apresentou aumento da celularidade total no pulmão, devido ao aumento da fração de células mononucleares em comparação ao grupo controle. Não houve aumento da fração polimorfonuclear após a infecção por *P. berghei* NK65 (Figura 5.6.2 A-C). Estes dados corroboram a similaridade entre o presente modelo e as alterações histológicas observadas em humanos, tendo em vista que, ao contrário de outras etiologias de SDRA, a malária pulmonar é caracterizada por uma importante migração de macrófagos ao invés de haver infiltrado neutrofílico [58].

O grupo tratado com DHA também apresentou, de forma mais discreta, influxo de leucócitos para o interstício, e a presença de edema alveolar foi mitigada (Figura 5.6.1 C). Ademais, houve redução da porcentagem de leucócitos no pulmão em relação ao grupo não tratado, relacionada a menor contagem da fração mononuclear (Figura 5.6.2 A e B).

Em relação ao tratamento com AAS, notou-se um importante aumento de fluido no espaço alveolar, além da presença de macrófagos no interstício e espaço alveolar, e uma discreta redução do espessamento de septo alveolar (Figura 5.6.2 D, setas). A contagem total de leucócitos, bem como da fração mononuclear se manteve maior em relação ao grupo controle e foi reduzida em comparação ao grupo *Pb*+DMSO. O grupo *Pb*+DHA+AAS manteve um padrão semelhante ao tratamento somente com o antimalárico, havendo infiltrado inflamatório e discreto edema alveolar (Figura 5.6.2 E, setas), além de redução da contagem total e da fração mononuclear no tecido pulmonar em relação ao grupo não tratado (Figura 5.6.2 A-B). Assim como no grupo *Pb*+DMSO, nenhum dos grupos tratados

apresentou alteração na contagem de células polimorfonucleares no tecido pulmonar em relação ao grupo controle (Figura 5.6.2 C).

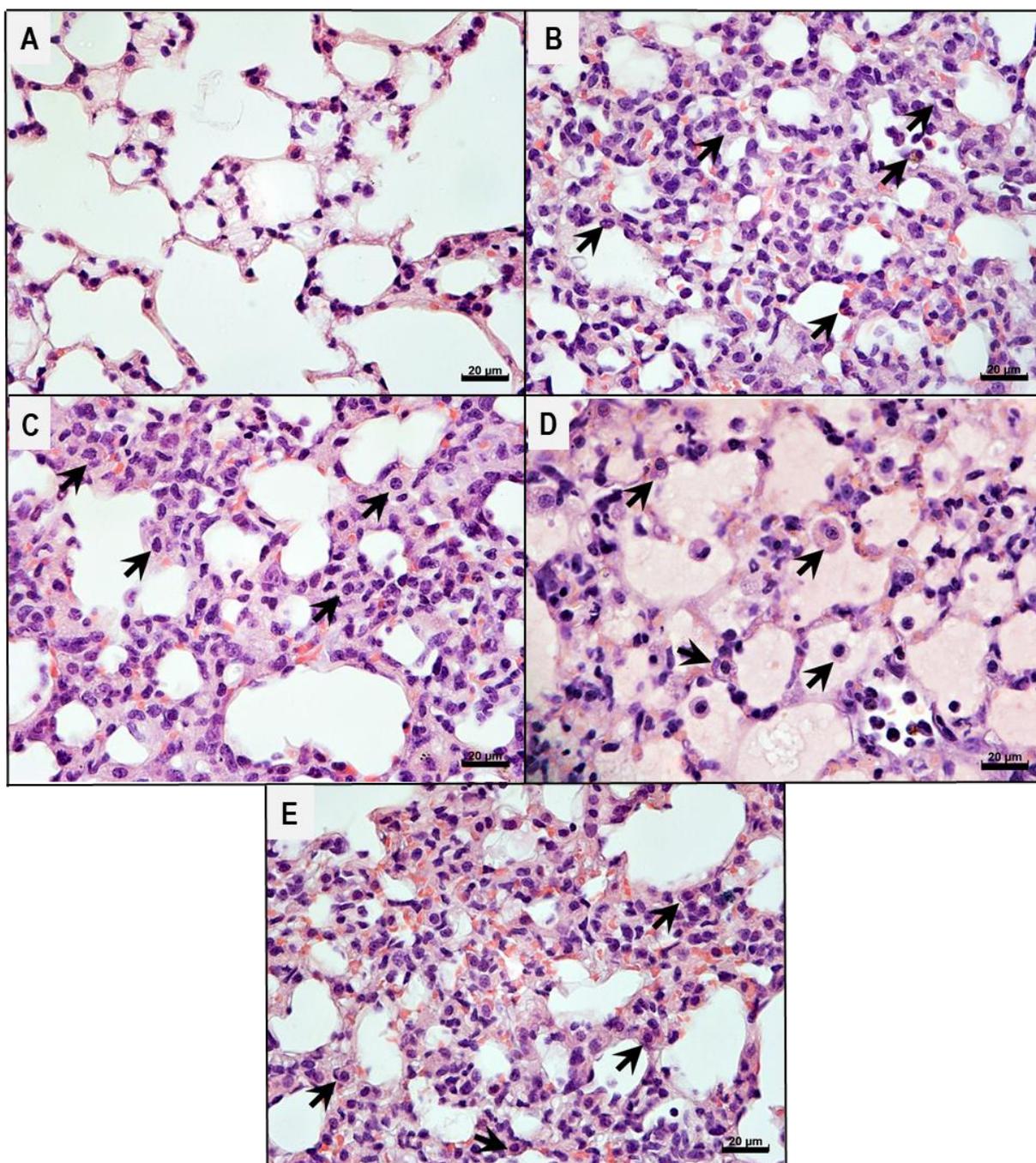


Figura 5.6.1 Efeitos do tratamento com DHA e AAS sobre o infiltrado inflamatório no tecido pulmonar.

Camundongos foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65 e tratados com AAS, DHA, DHA+AAS ou veículo (DMSO) no 8º dpi. Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar coradas com hematoxilina-eosina dos grupos controle (A), *Pb*+DMSO (B), *Pb*+DHA (C), *Pb*+AAS (D) e *Pb*+DHA+AAS (E) no 9º dpi. Note a presença de macrófagos (setas) no espaço alveolar e interstício. N= 5- 7 animais/grupo. Barras: 20µm.

Legenda: *Pb*= *Plasmodium berghei* NK65; C= controle+DMSO; DMSO= dimetilsulfóxido; AAS= Ácido acetilsalicílico DHA= dihidroartemisinina.

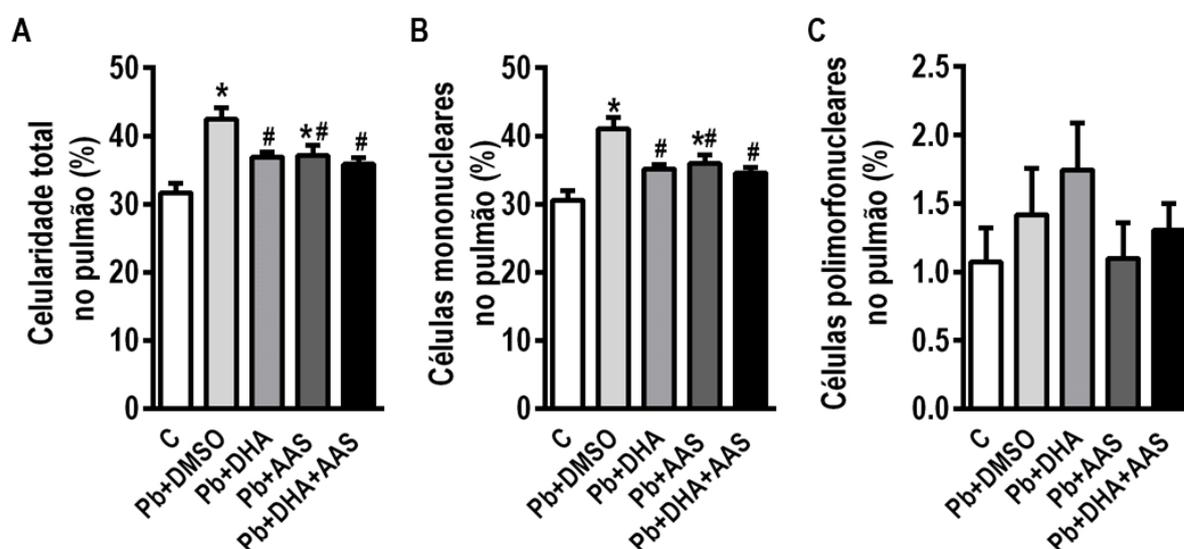


Figura 5.6.2 Efeitos da DHA e AAS na celularidade total e diferencial no tecido pulmonar na SDR associada à malária. Camundongos foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65 e tratados com AAS, DHA, DHA+AAS ou veículo (DMSO) no 8º dpi. Contagem total de leucócitos **(A)**, porcentagem de células mononucleares **(B)** e polimorfonucleares **(C)** no tecido pulmonar foi realizada em 10 campos não coincidentes em microscópio de campo claro, sob aumento de 1000x, no 9º dpi. Valores correspondem à média \pm erro padrão da média. *Significativamente diferente de C ($p < 0,05$); #Significativamente diferente de Pb+DMSO ($p < 0,05$). N= 5- 7 animais/grupo.
 Legenda: Pb= *Plasmodium berghei* NK65; C= controle+DMSO; DMSO= dimetilsulfóxido; AAS= Ácido acetilsalicílico DHA= dihidroartemisinina.

A fim de investigar se o tratamento com antimalárico ou com AAS influencia na migração de leucócitos para o espaço alveolar, foi realizada a contagem da celularidade total e diferencial no BALF. Assim como no primeiro bloco de resultados, a infecção por *P. berghei* NK65 levou ao aumento da celularidade total no BALF, caracterizada pela presença majoritária da fração mononuclear. Após 24h do tratamento com a DHA sozinha ou associada ao AAS, a contagem total e diferencial de leucócitos não foi significativamente diferente em relação ao grupo controle. Entretanto, a administração do AAS não interferiu no aumento do número de leucócitos totais, e no influxo de células mononucleares para o BALF causada pela infecção. Por fim, não houve aumento da população de células polimorfonucleares ao BALF em nenhum dos grupos infectados (Figura 5.6.3 A-C).

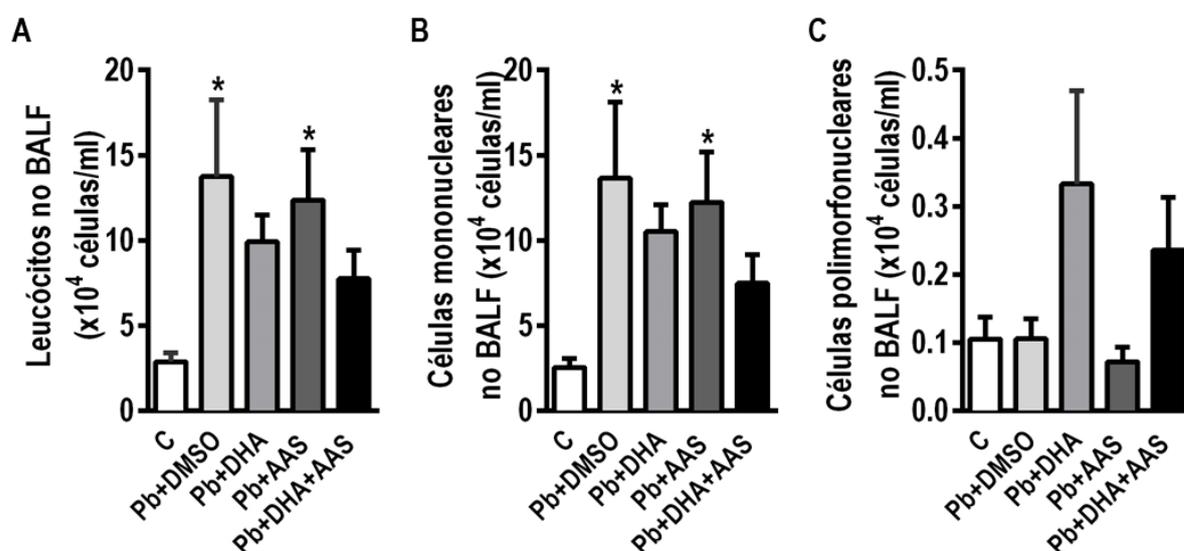


Figura 5.6.3 Efeitos da DHA e AAS na celularidade total e diferencial no BALF na SDR associada à malária.

Camundongos foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65 e tratados com AAS, DHA, DHA+AAS ou veículo (DMSO) no 8º dpi. Contagem total de leucócitos (A), porcentagem de células mononucleares (B) e polimorfonucleares (C) no BALF foi realizada em 10 campos não coincidentes em microscópio de campo claro, sob aumento de 1000x, no 9º dpi. Valores correspondem à média \pm erro padrão da média. *Significativamente diferente de C ($p < 0,05$). N= 6- 10 animais/grupo.

Legenda: Pb= *Plasmodium berghei* NK65; C= controle+DMSO; DMSO= dimetilsulfóxido; AAS= Ácido acetilsalicílico DHA= dihidroartemisinina.

Considerando que as alterações morfofuncionais no tecido pulmonar ocasionadas pelo presente modelo se iniciam no 8º dpi, momento no qual o tratamento com DHA ou AAS é iniciado, houve a necessidade de estabelecer um critério confiável de predição de lesão pulmonar antes do tratamento e coleta das amostras. Nesse aspecto, avaliamos se a parasitemia no 8º dpi poderia ser um indicador de acometimento pulmonar. Um dos principais mecanismos da fisiopatologia da malária pulmonar se dá pelo aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar, que leva ao influxo de fluido rico em proteína para o espaço alveolar e pode ser mensurado através da concentração de proteína no BALF.

Assim, a análise de correlação entre a parasitemia no 8º dpi e a concentração de proteína no BALF no 9º dpi indica que os dois parâmetros possuem correlação forte, com $r = 0,719$ e significativa, com $p = 0,002$ (Figura 5.6.4 A). Desta forma, sugere-se que o aumento da parasitemia é um fator preditivo para alteração da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar. De fato, o grupo Pb+DMSO apresentou maior concentração de proteínas no BALF em relação ao grupo controle, no 9º dpi. Tal parâmetro não foi mitigado 24 horas após o tratamento com AAS ou AAS+DHA.

No entanto, o grupo *Pb*+DHA não apresentou diferenças na quantificação de proteína no BALF em relação ao controle (Figura 5.6.4 B).

A infecção por *P. berghei* NK65 levou ao aumento dos níveis de MCP-1 em relação ao grupo controle, que foi mantido 24 horas após o tratamento com a DHA. No entanto, observou-se uma redução dos níveis desta quimiocina nos grupos *Pb*+AAS ou *Pb*+AAS+DHA em relação ao grupo *Pb*+DMSO (Figura 5.6.4 C).

Não houve diferença nos níveis de quimiocina derivada de queratinócito (KC) entre o grupo controle e os infectados, que levaria a migração de células polimorfonucleares ao espaço alveolar (Figura 5.6.4 D). Tal achado corrobora o observado na contagem da celularidade diferencial no BALF, no qual há predominância de células mononucleares.

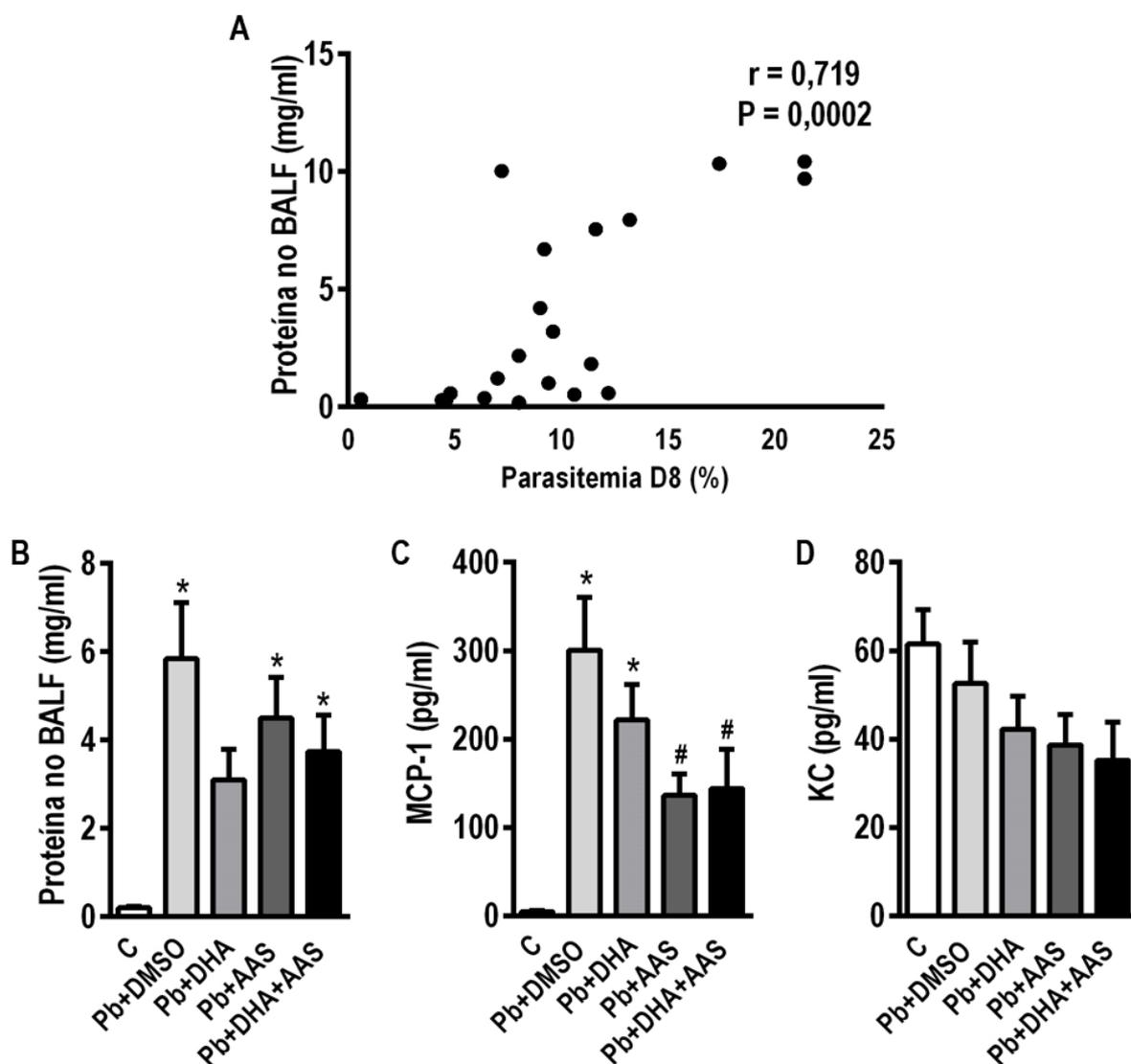


Figura 5.6.4 Permeabilidade da barreira alvéolo-capilar e níveis de MCP-1 e KC após tratamento com DHA e AAS.

Camundongos foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65 e tratados com AAS, DHA, DHA+AAS ou veículo (DMSO) no 8º dpi. Correlação entre a

parasitemia no 8º dpi e a concentração de proteínas no BAL no 9º dpi **(A)**. A concentração de proteínas foi determinada por BCA **(B)**. Níveis de MCP-1 **(C)** e KC foram avaliados por ELISA **(D)**. Valores correspondem à média \pm erro padrão da média. *Significativamente diferente de C ($p < 0,05$). N= 4- 9 animais/grupo.

Legenda: *Pb*= *Plasmodium berghei* NK65; C= controle+DMSO; DMSO= dimetilsulfóxido; AAS= Ácido acetilsalicílico DHA= dihidroartemisinina, KC= quimiocina derivada de queratinócito; MCP-1= proteína quimiotática de monócitos.

5.7. AAS não mitiga disfunção pulmonar na SDR associada à malária

Conforme observado anteriormente, a infecção com *P. berghei* NK65 promove alterações funcionais, iniciadas no 8º dpi. Com o intuito de avaliar se o tratamento com a DHA ou AAS poderia modular a disfunção pulmonar, a análise da mecânica respiratória foi realizada 24 horas após o tratamento, no 9º dpi. O grupo *Pb*+DMSO apresentou maior elastância estática pulmonar (Est,L), pressão resistiva ($\Delta P1,L$) e pressão viscoelástica ($\Delta P2,L$) em comparação ao grupo controle.

O tratamento com DHA reduziu a Est,L e $\Delta P2,L$ em relação ao grupo *Pb*+DMSO, e não mitigou a alteração de $\Delta P1,L$ ocasionada pela infecção. Entretanto, os animais tratados com AAS mantiveram maior Est,L e $\Delta P1,L$ em relação ao grupo controle, apesar de não haver diferença significativa em $\Delta P2,L$. Nota-se também, que o grupo AAS apresentou maior Est,L em comparação ao grupo tratado apenas com antimalárico, indicando que a administração de AAS poderia levar a um efeito deletério neste modelo experimental de malária pulmonar. A administração da DHA associada ao AAS não levou a alterações significativamente diferentes de Est,L e $\Delta P2,L$ em relação ao grupo *Pb*+DMSO. Todavia, $\Delta P1,L$ permaneceu elevado em comparação ao grupo controle (Figura 5.7.1 A-B).

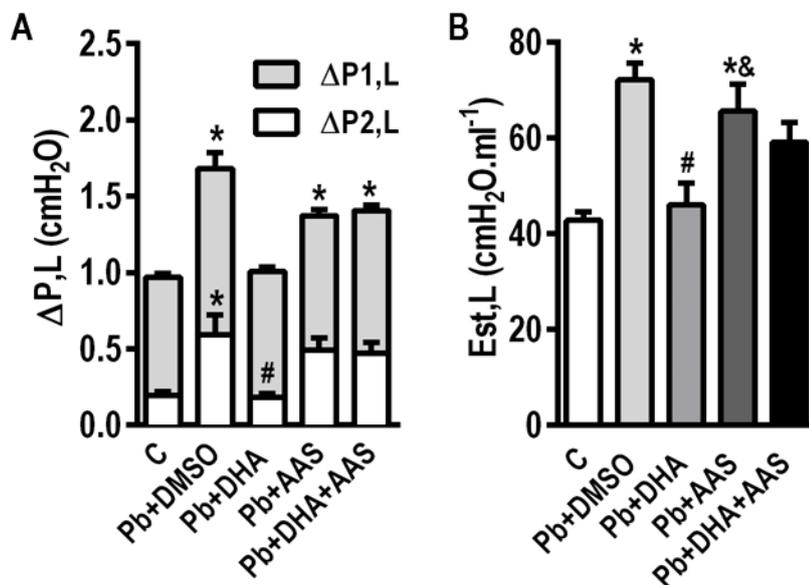


Figura 5.7.1 AAS não mitiga disfunção pulmonar na SDR associada à malária.

Camundongos foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65, tratados com AAS, DHA, DHA+AAS ou veículo (DMSO) no 8º dpi e ventilados mecanicamente no 9º dpi. Variação de pressão necessária para vencer os componentes resistivos ($\Delta P_{1,L}$) e viscoelásticos do pulmão ($\Delta P_{2,L}$). A variação de pressão total do pulmão ($\Delta P,L$) corresponde a barra inteira (A). Elastância estática do pulmão (Est,L) (B). Valores correspondem à média \pm erro padrão da média. *Significativamente diferente de C ($p < 0,05$). #Significativamente diferente de Pb+DMSO ($p < 0,05$); &Significativamente diferente de Pb+DHA ($p < 0,05$). N= 7- 10 animais/grupo.

Legenda: Pb= *Plasmodium berghei* NK65; C= controle+DMSO; DMSO= dimetilsulfóxido; AAS= Ácido acetilsalicílico DHA= dihidroartemisinina.

De fato, as alterações na função pulmonar podem ser justificadas pelo rearranjo da arquitetura do parênquima pulmonar, demonstrado nas fotomicrografias representativas apresentadas na figura 5.7.2. Nota-se que a infecção por *P. berghei* NK65 leva a um infiltrado inflamatório, regiões de colapso alveolar e um importante edema alveolar, como observado nos resultados anteriores. No grupo tratado apenas com o antimalárico, observou-se menor área de extravasamento de fluido para o espaço alveolar, em relação aos demais grupos infectados, apesar de ainda haver áreas de colapso alveolar (Figura 5.7.2 C). Os grupos Pb+AAS e Pb+DHA+AAS mantiveram um padrão de alterações do parênquima pulmonar semelhantes ao grupo Pb+DMSO. Cabe enfatizar que o extravasamento de fluido para o espaço alveolar permanece após a terapia combinada, e ocorre de maneira intensa no tratamento apenas com AAS (Figura 5.7.2 D-E).

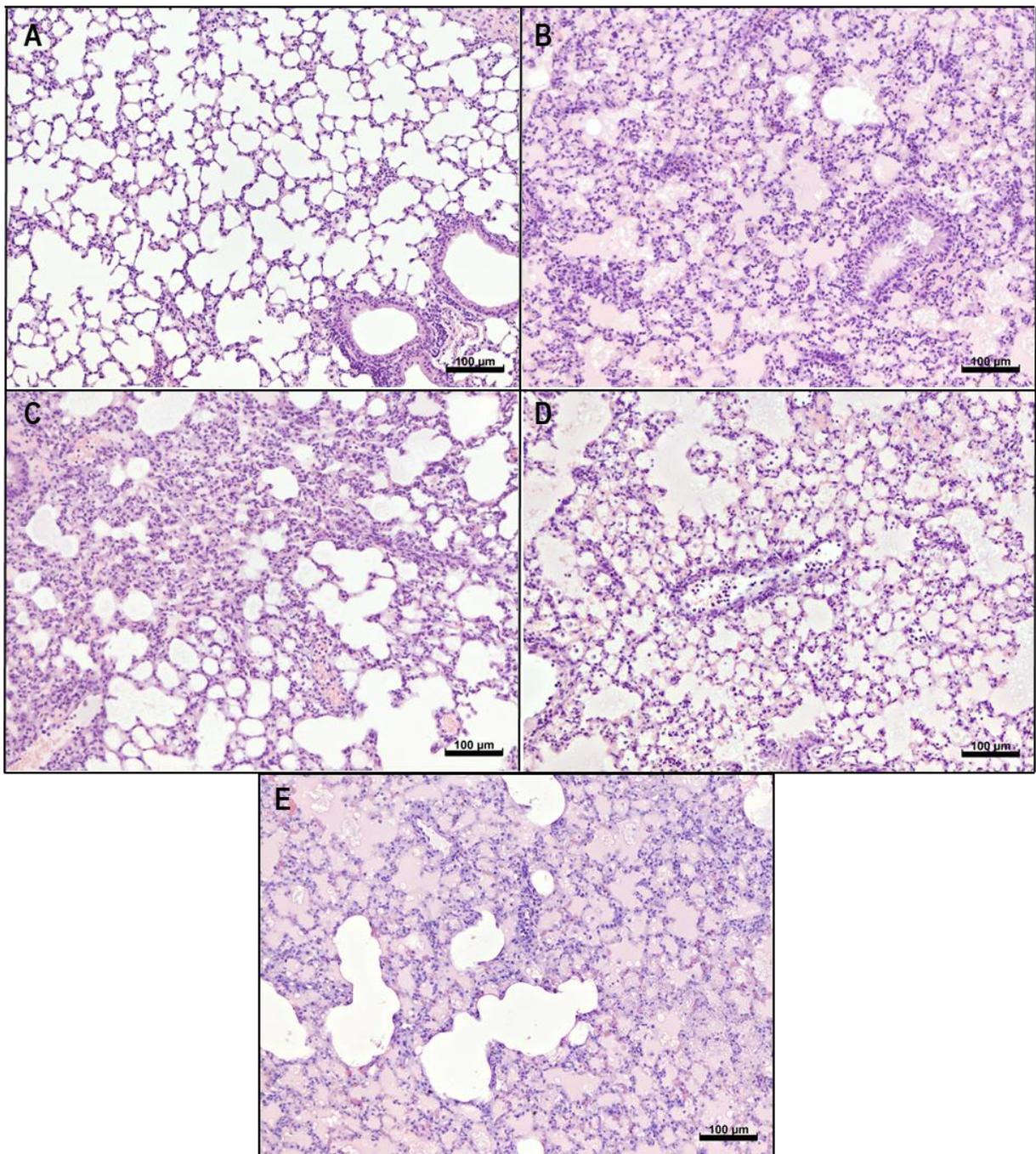


Figura 5.7.2 Alterações histológicas no tecido pulmonar após tratamento com DHA e AAS.

Camundongos foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65, tratados com AAS, DHA, DHA+AAS ou veículo (DMSO) no 8^o dpi e tiveram os pulmões coletados após realização da mecânica respiratória. Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar coradas com hematoxilina-eosina dos grupos controle (A), *Pb*+DMSO (B), *Pb*+DHA (C), *Pb*+AAS (D) e *Pb*+DHA+AAS (E). Observa-se a presença áreas de atelectasia e importante infiltrado inflamatório. Note a presença abundante de exsudato, principalmente nos grupos *Pb*+DMSO, *Pb*+AAS e *Pb*+DHA+AAS. N= 7- 10 animais/grupo. Barras: 100µm.

Legenda: *Pb*= *Plasmodium berghei* NK65; C= controle+DMSO; DMSO= dimetilsulfóxido; AAS= Ácido acetilsalicílico DHA= dihidroartemisinina.

5.8. Infecção por *P. berghei* NK65 leva ao acúmulo de pigmento malárico na medula óssea

Após a mecânica respiratória realizada no 9º dpi, o fêmur e parte do fígado também foram coletados para análise qualitativa das alterações sistêmicas decorrentes da infecção pelo *P. berghei* NK65.

Notou-se que o grupo *Pb*+DMSO apresenta de forma abundante células mieloides, além de hiperplasia megacariocítica (detalhes e setas pretas), em relação ao grupo não-infectado (Figura 5.8.1 B). O mesmo padrão é observado 24 horas após o tratamento com a DHA, AAS ou DHA+AAS (Figura 5.8.1 C-E).

Quando observada em maior aumento, nota-se a presença de pigmento malárico intravascular e extravascular (detalhes), bem como de hemácias infectadas, difusamente, ao longo do corte histológico. Cabe salientar a predominância de pigmento malárico nos grupos *Pb*+DMSO, *Pb*+AAS e *Pb*+DHA+AAS, enquanto no grupo tratado somente com a DHA, tal evento ocorre de forma mais discreta (Figura 5.8.2 A-E).

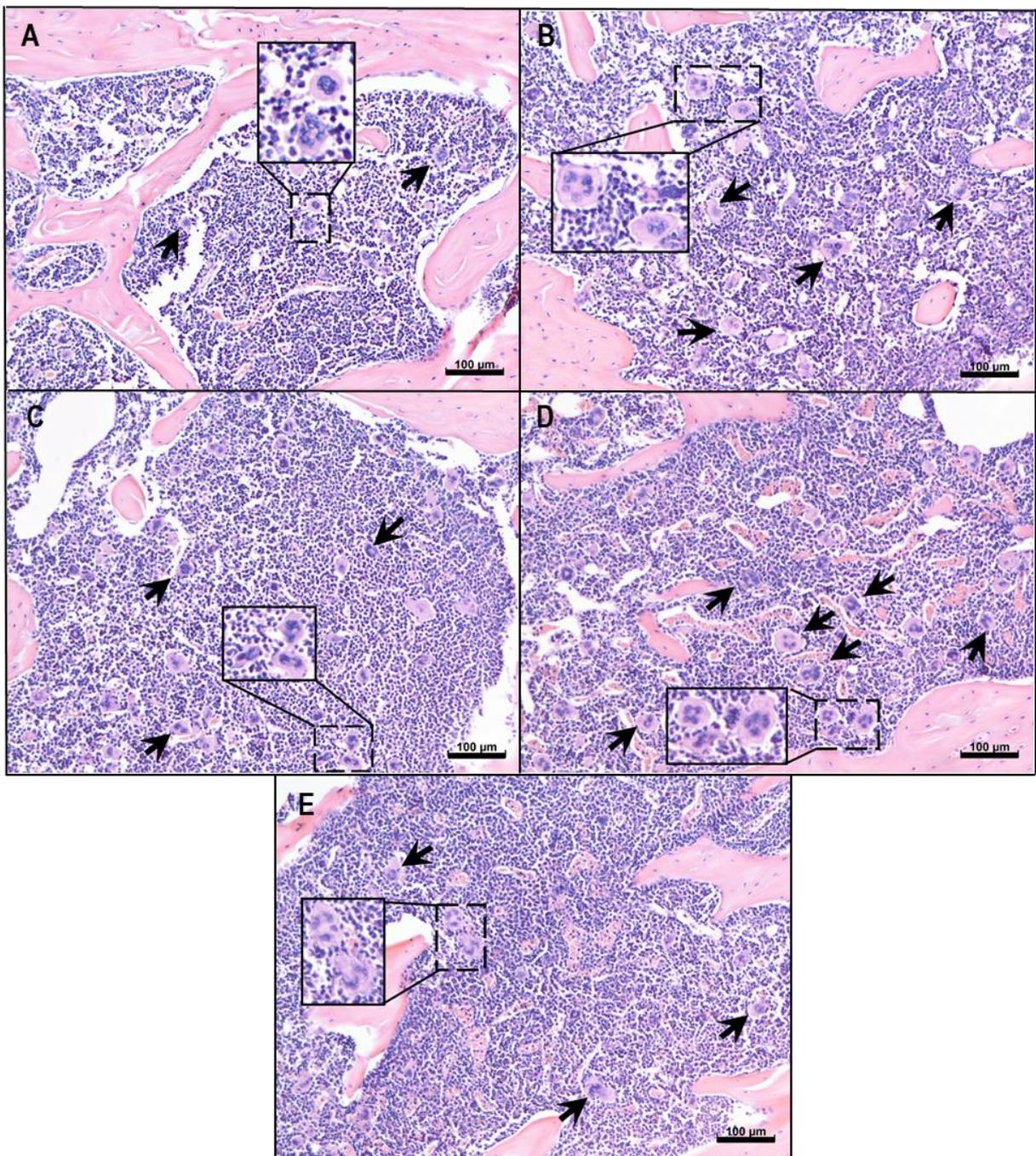


Figura 5.8.1 Alterações histológicas na medula óssea após infecção por *P. berghei* NK65.

Camundongos foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65, tratados com AAS, DHA, DHA+AAS ou veículo (DMSO) no 8º dpi e tiveram os órgãos coletados após realização da mecânica respiratória. Fotomicrografias representativas da medula coradas com hematoxilina-eosina dos grupos controle (A), *Pb*+DMSO (B), *Pb*+DHA (C), *Pb*+AAS (D) e *Pb*+DHA+AAS (E) no 9º dpi. Observa-se aumento do número de megacariócitos (detalhes e setas) nos grupos infectados. N= 4- 5 animais/grupo. Barras: 100µm.

Legenda: *Pb*= *Plasmodium berghei* NK65; C= controle+DMSO; DMSO= dimetilsulfóxido; AAS= Ácido acetilsalicílico DHA= dihidroartemisinina.

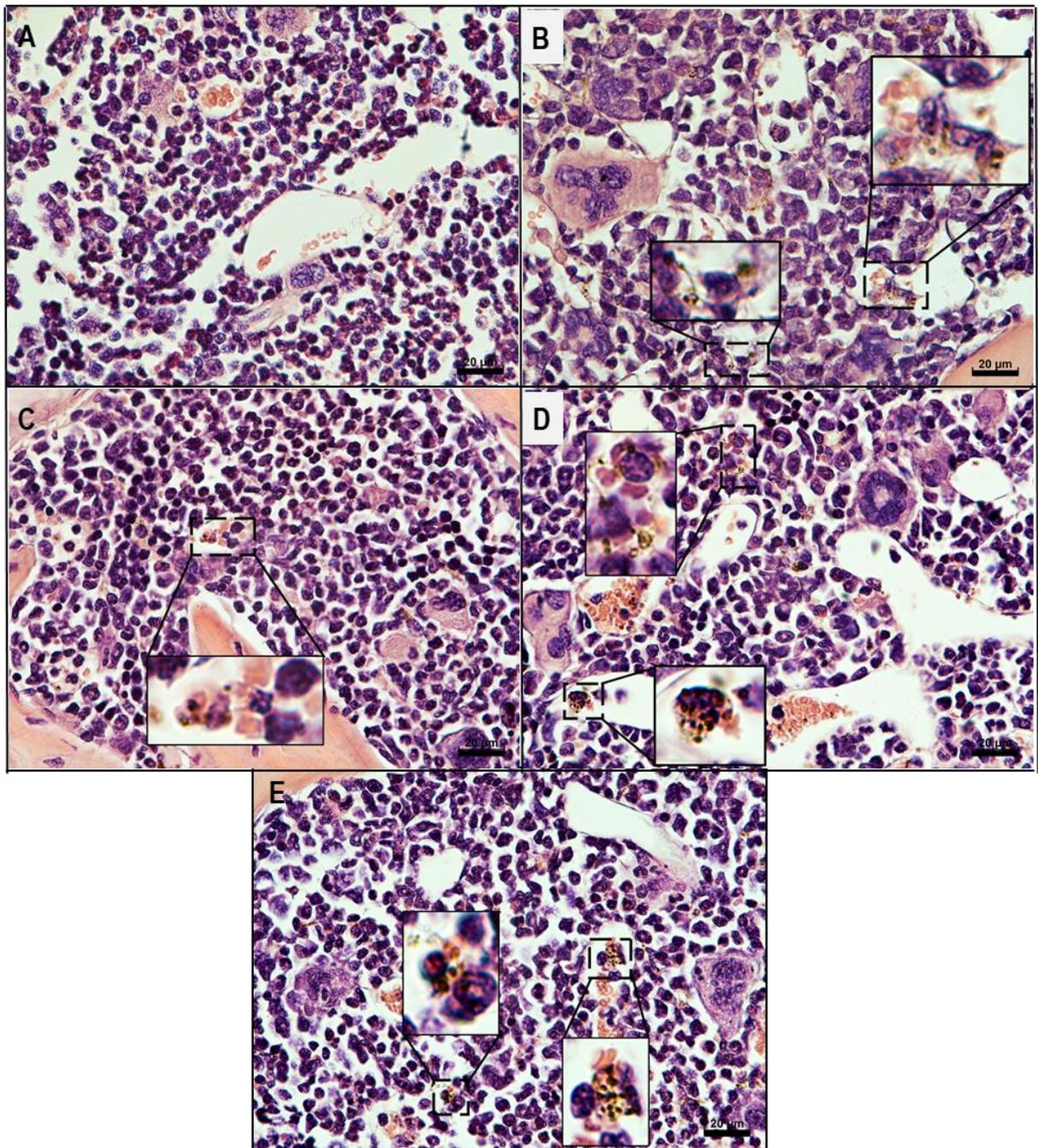


Figura 5.8.2 Infecção por *P. berghei* NK65 leva ao acúmulo de pigmento malárico na medula óssea.

Camundongos foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65, tratados com AAS, DHA, DHA+AAS ou veículo (DMSO) no 8º dpi e tiveram os órgãos coletados após realização da mecânica respiratória. Fotomicrografias representativas da medula coradas com hematoxilina-eosina dos grupos controle ((A), *Pb*+DMSO (B), *Pb*+DHA (C), *Pb*+AAS (D) e *Pb*+DHA+AAS (E) no 9º dpi. Observa-se presença majoritária de células mielóides, e presença de pigmento malárico intra e extravascular (detalhes) nos grupos infectados. N= 4- 5 animais/grupo. Barras: 20µm.

Legenda: *Pb*= *Plasmodium berghei* NK65; C= controle+DMSO; DMSO= dimetilsulfóxido; AAS= Ácido acetilsalicílico DHA= dihidroartemisinina.

5.9. Investigação das alterações hepáticas após tratamento com DHA e AAS

Além das alterações morfo-funcionais pulmonares, a infecção *P. berghei* NK65 leva a alterações macroscópicas no fígado, como hepatomegalia, mudança da coloração do órgão para uma tonalidade mais escurificada, algo esverdeada/acastanhada, e textura heterogênea.

A análise histológica evidencia que ao nono dia de infecção, formação de adensamentos celulares, formado majoritariamente por linfócitos, hiperplasia de células de Kupffer, que apresentam pigmento malárico fagocitado. Além disso, a infecção leva a um infiltrado inflamatório, com aumento de células circulantes nos sinusoides. Estas células por sua vez, também apresentam pigmento malárico e se encontram de maneira difusa ao longo do tecido (detalhes). De forma interessante, há presença de leucócitos margeando o endotélio das veias centrais, sem haver, no entanto, aumento de circulação ou adesão leucocitária em veia porta (Figura 5.9.1 B).

O tratamento com a DHA parece influenciar de maneira discreta nas alterações histológicas características do modelo. Nota-se redução de células circulantes nos sinusoides, bem como menor presença de pigmento malárico e de hiperplasia Kupfferiana. O lúmen de veias centrais também apresenta menor número de leucócitos circulantes (Figura 5.9.1 C).

Já a administração de AAS não minimizou as alterações histológicas observadas no grupo *Pb*+DMSO. Há presença abundante de células circulantes nos sinusoides, além de hiperplasia de células de Kupffer, e presença de pigmento malárico no tecido (Figura 5.9.1 D). No grupo que recebeu a terapia combinada de DHA+AAS os achados histológicos se assemelham ao grupo não tratado, havendo formação de adensamentos celulares, infiltrado de leucócitos e pigmento malárico difusamente (Figura 5.9.1 E).

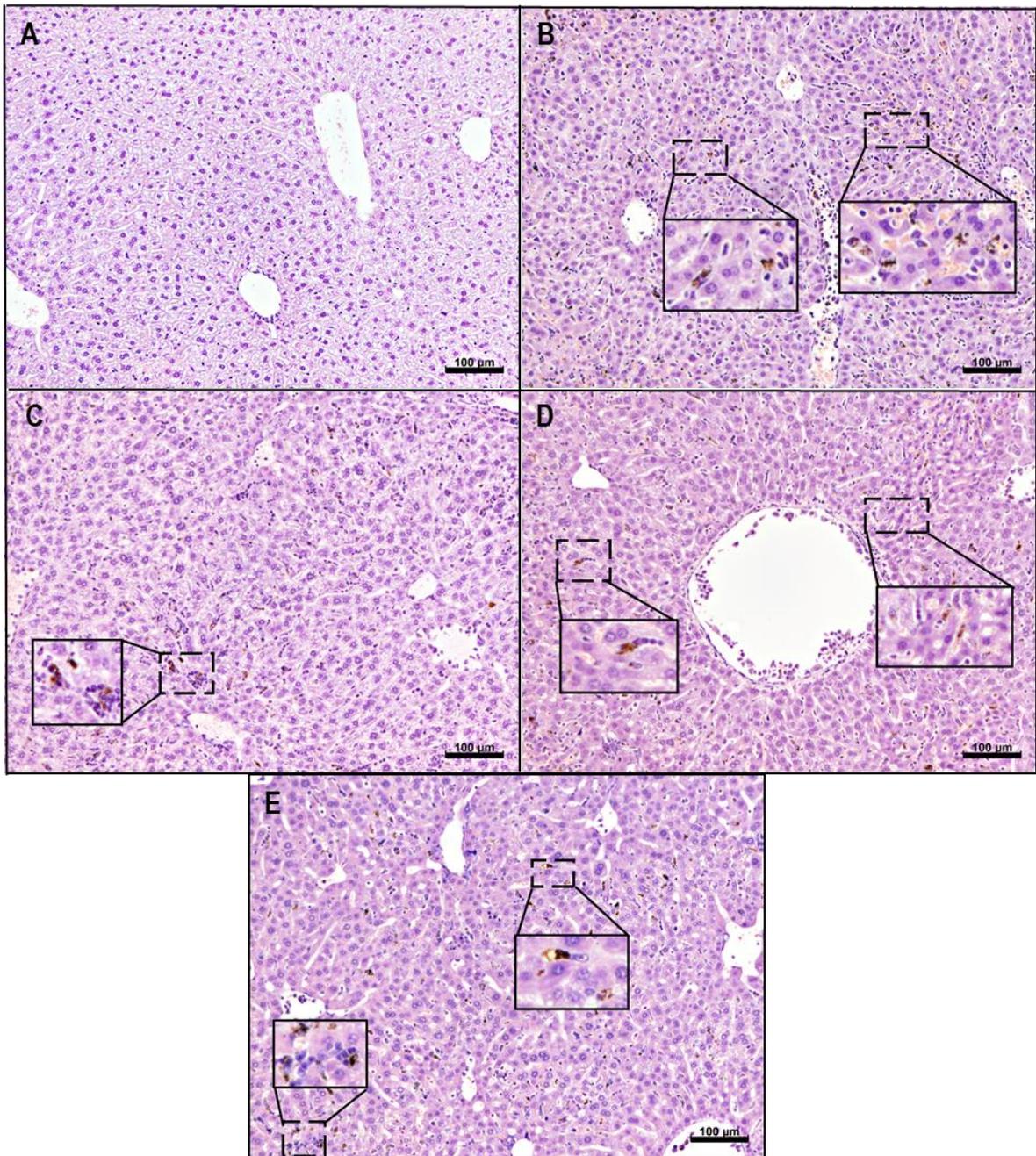


Figura 5.9.1 Alterações hepáticas após tratamento com DHA e AAS em modelo de SDRRA associada à malária.

Camundongos foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65, tratados com AAS, DHA, DHA+AAS ou veículo (DMSO) no 8º dpi e tiveram os órgãos coletados após realização da mecânica respiratória. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de fígado coradas com hematoxilina-eosina dos grupos controle (A), *Pb*+DMSO (B), *Pb*+DHA (C), *Pb*+AAS (D) e *Pb*+DHA+AAS (E) no 9º dpi. Note que os grupos infectados apresentam hiperplasia de células de Kupffer, presença abundante de pigmento malárico e a aumento do número de células circulantes nos sinusoides. N= 7- 10 animais/grupo. Barras: 100µm.

Legenda: *Pb*= *Plasmodium berghei* NK65; C= controle+DMSO; DMSO= dimetilsulfóxido; AAS= Ácido acetilsalicílico DHA= dihidroartemisinina.

Em maior aumento, percebe-se que, na luz das veias centrais, há com frequência a interação entre leucócitos, formando aglomerados entre si, e com hemácias infectadas e não infectadas no grupo *Pb*+DMSO. Nota-se também a interação principalmente de monócitos e de hemácias infectadas com o endotélio (detalhes), além da migração destes para os sinusoides (Figura 5.9.2 B).

O tratamento apenas com a DHA leva a uma menor atividade de células de Kupffer, que apresentam menos pigmento malárico fagocitado (setas). Além disso, a interação de leucócitos com o endotélio parece reduzido em comparação ao grupo não tratado. Não foram observadas formação de agregados leucocitários na luz de veia central (Figura 5.9.2 C).

No grupo *Pb*+AAS, a aglutinação leucocitária e a adesão destes ao endotélio parece acentuada, levando à uma possível obstrução ou suboclusão do vaso. Além disso, hemácias infectadas e não infectadas parecem interagir com leucócitos e com a luz do endotélio (Figura 5.9.2 D). Por último, o tratamento combinado de DHA+AAS parece levar a uma discreta redução dos aglomerados leucocitários. No entanto, a adesão de leucócitos ao endotélio parece estar mantida. O aumento de células circulantes nos sinusoides se assemelha ao observado no grupo *Pb*+DMSO (Figura 5.9.2 E).

Além das alterações histológicas, a infecção por *P. berghei* NK65 levou a redução dos níveis séricos de albumina e aumento dos níveis de aspartato aminotransferase (AST) em relação ao grupo controle. Entretanto, todos os grupos infectados apresentaram redução dos níveis de fosfatase alcalina, independentemente do tipo de tratamento. Não houve diferença significativa nos níveis de alanina aminotransferase (ALT). O tratamento com DHA, AAS ou DHA+AAS não levou a alterações nos parâmetros avaliados na função hepática em 24 horas (Figura 5.9.3 A-D).

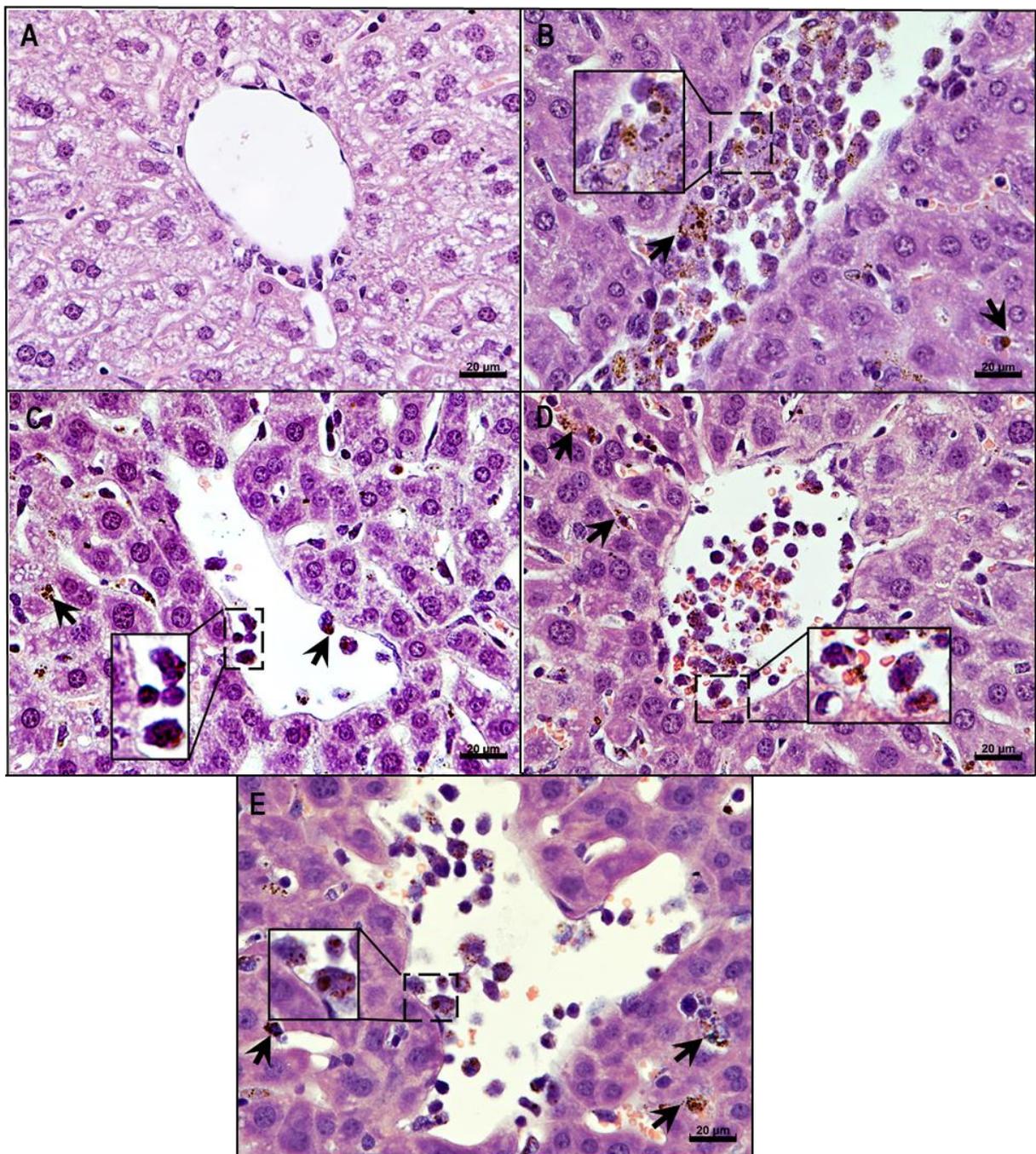


Figura 5.9.2 Interação de leucócitos com o endotélio de veia central hepática após infecção por *P. berghei* NK65 e tratamento com DHA e AAS.

Camundongos foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65, tratados com AAS, DHA, DHA+AAS ou veículo (DMSO) no 8º dpi e tiveram os órgãos coletados após realização da mecânica respiratória. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de fígado coradas com hematoxilina-eosina dos grupos controle ((A), *Pb*+DMSO (B), *Pb*+DHA (C), *Pb*+AAS (D) e *Pb*+DHA+AAS (E) no 9º dpi. Observa-se a interação de células mononucleares apresentando pigmento malárico fagocitado com o endotélio de veias centrais (setas), formação de aglomerados leucocitários no vaso e de agregados com hemácias grupos infectados. Note no grupo *Pb*+AAS a obstrução do vaso causada pelo aglomerado de leucócitos. N= 7- 10 animais/grupo. Barras: 20µm.

Legenda: *Pb*= *Plasmodium berghei* NK65; C= controle+DMSO; DMSO= dimetilsulfóxido; AAS= Ácido acetilsalicílico DHA= dihidroartemisinina.

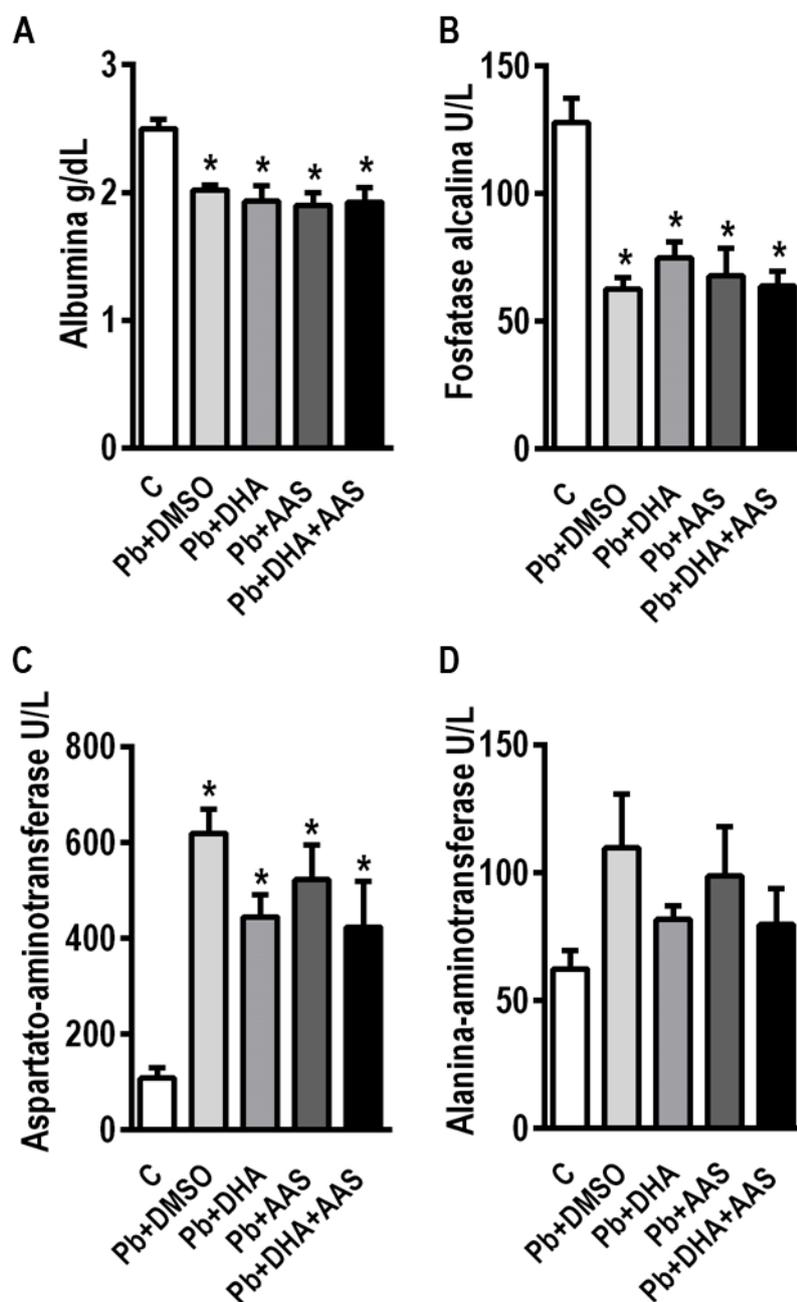


Figura 5.9.3 Análise da função hepática após infecção por *P. berghei* NK65 e tratamento com DHA e AAS.

Camundongos foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65 e tratados com AAS, DHA, DHA+AAS ou veículo (DMSO) no 8º dpi. A análise bioquímica do soro foi realizada no 9º dpi. Foram quantificados os níveis séricos de albumina (A), fosfatase alcalina (B), aspartato-aminotransferase (C) e alanina-aminotransferase (D). Valores correspondem à média \pm erro padrão da média. *Significativamente diferente de C ($p < 0,05$). N= 3- 5 animais/grupo.

Legenda: Pb= *Plasmodium berghei* NK65; C= controle+DMSO; DMSO= dimetilsulfóxido; AAS= Ácido acetilsalicílico DHA= dihidroartemisinina.

5.10. Infecção por *P. berghei* NK65 não interfere na função renal no 9º dpi

Considerando que a infecção por *P. berghei* NK65 leva a um processo inflamatório exacerbado, culminando em SDRA, hepatoesplenomegalia e disfunção hepática, investigamos se haveria alteração da função renal através da análise bioquímica dos níveis séricos de sódio, ureia e creatinina. Tal análise foi realizada 24 horas após o tratamento com AAS, DHA ou AAS+DHA, no 9º dpi.

Não houve alteração dos níveis de sódio, ureia e creatinina entre os grupos controle e infectado. Além disso, nenhum dos esquemas terapêuticos estudados interferiu nos parâmetros avaliados, indicando assim que o presente modelo não leva ao acometimento da função renal no 9º dpi (Figura 5.10.1 A-C).

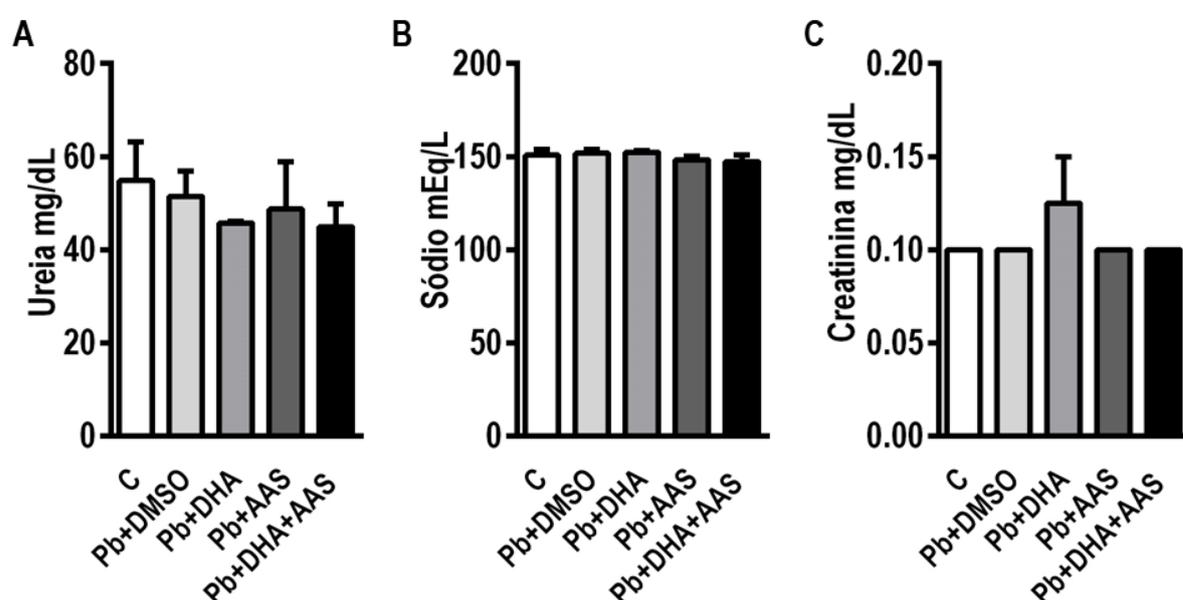


Figura 5.10.1 Análise da função renal após infecção por *P. berghei* NK65 e tratamento com DHA e AAS.

Camundongos foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65 e tratados com AAS, DHA, DHA+AAS ou veículo (DMSO) no 8º dpi. A análise bioquímica do soro foi realizada no 9º dpi. Foram quantificados os níveis séricos de sódio (A), ureia (B) e creatinina (C). Valores correspondem à média \pm erro padrão da média. N= 3- 5 animais/grupo.

Legenda: *Pb*= *Plasmodium berghei* NK65; C= controle+DMSO; DMSO= dimetilsulfóxido; AAS= Ácido acetilsalicílico DHA= dihidroartemisinina.

5.11. Análise da permeabilidade da barreira hematoencefálica na infecção por *P. berghei* NK65

A permeabilidade vascular no cérebro foi analisada pela coloração de Azul de Evans, descrita em estudos clássicos como um método eficaz para a investigação da integridade da barreira hematoencefálica na malária cerebral [136]. Uma hora após a injeção com o corante, o cérebro foi removido após eutanásia e imagens representativas dos grupos experimentais foram fotografadas.

O presente modelo experimental não levou ao aumento estatisticamente significativo da quantificação de Azul de Evans no cérebro, em comparação aos animais não infectados, sugerindo, portanto, que a infecção por *P. berghei* NK65 não altera a integridade da barreira hematoencefálica do tempo estudado (Figura 5.11.1 A). As fotos representativas mostram que todos os grupos apresentam retenção semelhante do corante ao tecido, havendo apenas uma discreta mudança visual entre o grupo controle e os infectados (Figura 5.11.1 B).

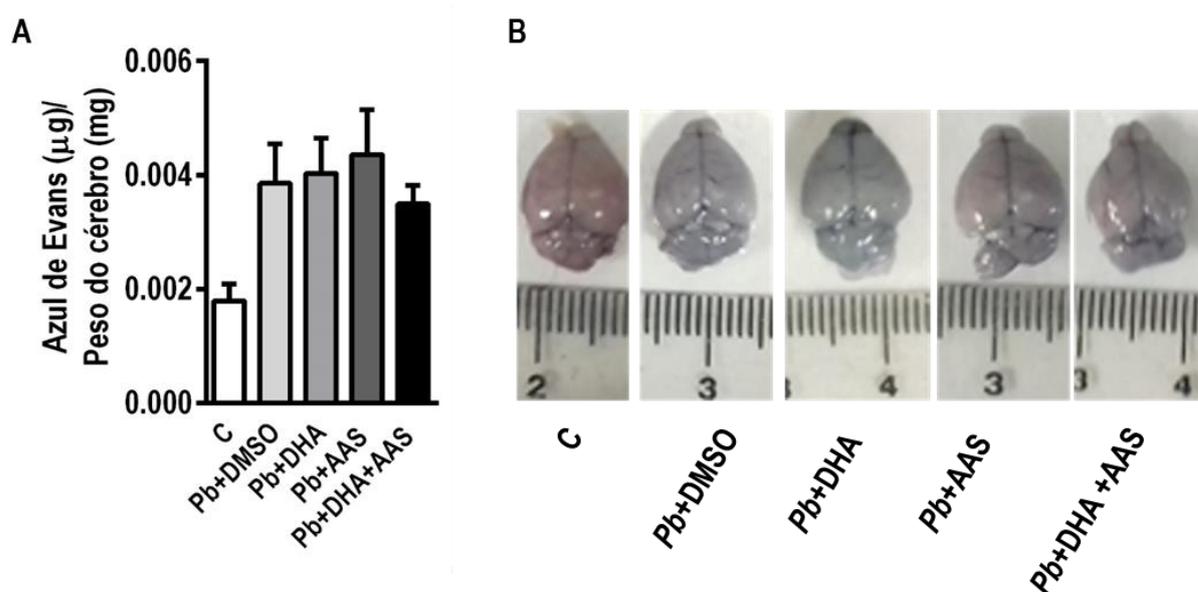


Figura 5.11.1 Integridade da barreira hematoencefálica após infecção por *P. berghei* NK65 e tratamento com DHA e AAS. Camundongos foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65 e tratados com AAS, DHA, DHA+AAS ou veículo (DMSO) no 8º dpi. A injeção de azul de evans foi realizada no 9º dpi. Quantificação de Azul de Evans pelo peso do cérebro (A). Fotos representativas do cérebro dos diferentes grupos experimentais (B). Valores correspondem à média \pm erro padrão da média. N= 6- 16 animais/grupo.

Legenda: *Pb*= *Plasmodium berghei* NK65; C= controle+DMSO; DMSO= dimetilsulfóxido; AAS= Ácido acetilsalicílico; DHA= dihidroartemisinina.

5.12. Efeitos da DHA e AAS na sobrevida, parasitemia e parâmetros hematológicos no dia 15 pós-infecção

Considerando os efeitos do tratamento com AAS, DHA ou DHA+AAS no 9º dpi, a análise da sobrevida e parasitemia foi realizada até o 15º dia de protocolo experimental. Para tal, o tratamento com antimalárico foi estendido a partir do 8º dpi por 7 dias consecutivos. Tendo em vista que o AAS inibe de forma irreversível a COX, inibindo a agregação plaquetária de forma permanente, e que os efeitos deletérios observados com dose única foram agravados com o tratamento em múltiplas doses, os animais receberam apenas uma dose de AAS, no 9º dpi.

O tratamento com DHA levou a uma sobrevida de 100% no 15º dpi, assim como o observado no grupo controle. O tratamento combinado de DHA+AAS resultou em uma sobrevida de 85,15%. Houve redução significativa na sobrevida dos grupos *Pb*+DMSO e *Pb*+AAS (34,3 e 25,9%, respectivamente), em relação aos grupos C e *Pb*+DHA (Figura 5.12.1 A).

O grupo *Pb*+DMSO apresentou progressão da parasitemia ao longo do protocolo experimental. A estagnação deste aumento, observada entre os dias 12 e 15º dpi é justificada pela mortalidade dos animais que apresentavam maior parasitemia. O tratamento somente com AAS não foi capaz de alterar a parasitemia em relação ao grupo *Pb*+DMSO. Além disso, houve diferença significativa entre os grupos *Pb*+AAS e *Pb*+DHA entre os dias 10 e 12 pós-infecção. A utilização do antimalárico sozinho ou combinado com AAS reduziu a parasitemia em comparação aos animais não tratados nos dias 10 e 12 pós-infecção, havendo, no entanto, recuperação da parasitemia no dpi.15º dpi (Figura 5.12.1 B).

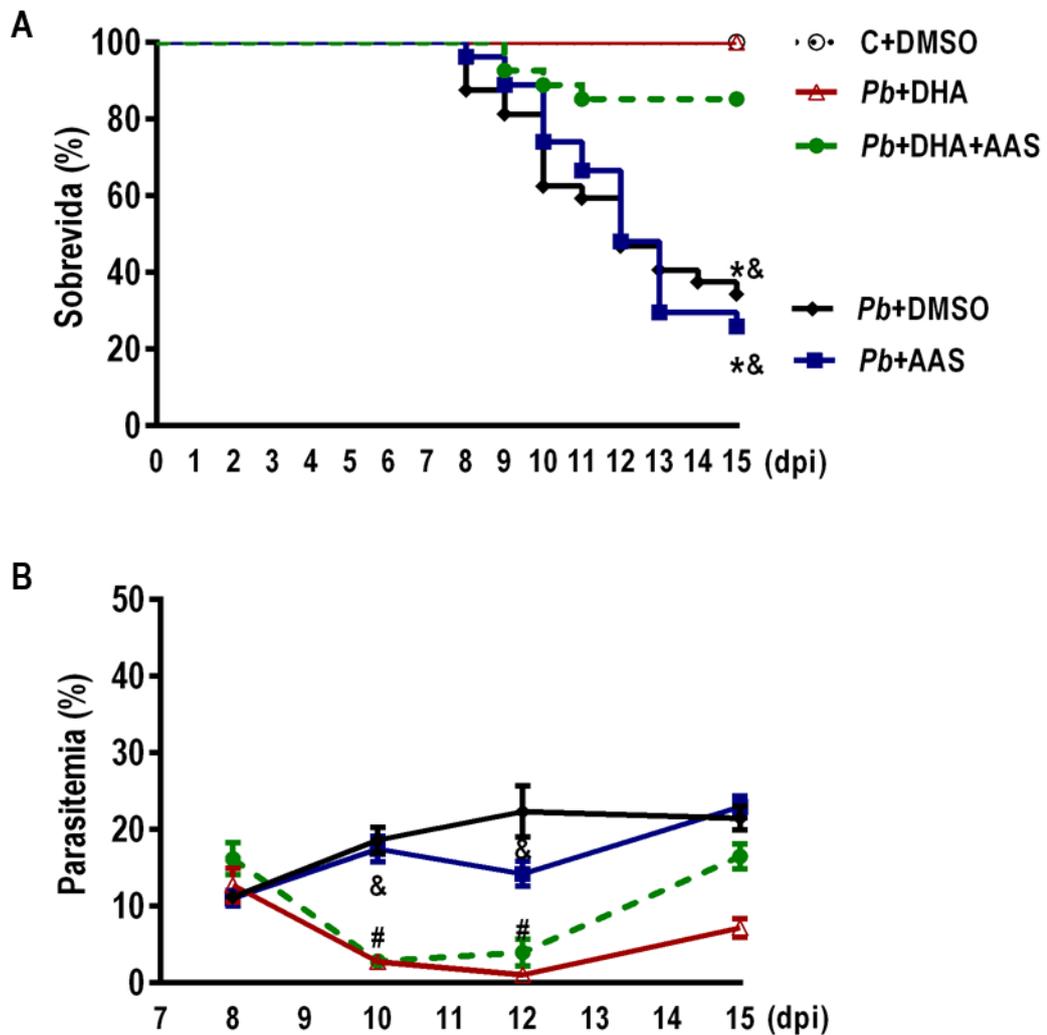


Figura 5.12.1 Sobrevida e parasitemia após o tratamento com DHA e AAS.

Camundongos foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65 e tratados com AAS, DHA, DHA+AAS ou veículo (DMSO) no 8º dpi. O tratamento com antimalárico foi realizado por sete dias consecutivos. A sobrevida (A) e a parasitemia (B) foram avaliadas diariamente, até o 15º dpi. *Significativamente diferente de C ($p < 0,007$ sobrevida e $p < 0,05$ parasitemia); #Significativamente diferente de Pb+DMSO ($p < 0,05$); &Significativamente diferente de Pb+DHA ($p < 0,007$ sobrevida e $p < 0,05$ parasitemia). N= 14-31 animais/grupo.

Legenda: Pb= *Plasmodium berghei* NK65; C= controle+DMSO; DMSO= dimetilsulfóxido; AAS= Ácido acetilsalicílico DHA= dihidroartemisinina.

No 15^o dpi, o sangue dos animais sobreviventes foi coletado por punção cardíaca para realização de hemograma. As amostras dos animais remanescentes do grupo *Pb*+AAS sofreram hemólise durante o processamento, e por isso, não obtivemos dados referentes a este grupo. O grupo *Pb*+DMSO manteve baixa contagem de hemácias, além da redução de hemoglobina (HGB), do hematócrito (HcT) e importante plaquetopenia, que já haviam sido observadas no 9^o dpi (Figura 5.12.2 A-D). Os grupos *Pb*+DHA e *Pb*+DHA apresentaram aumento da contagem de hemácias, de HGB e do HcT em relação ao grupo *Pb*+DMSO, apesar de ainda haver redução significativa em comparação aos animais não-infectados. Os grupos *Pb*+DHA e *Pb*+DHA mantiveram a plaquetopenia observada nos animais não-tratados (Figura 5.11.2 D).

Apesar de não haver diferença na contagem de leucócitos no grupo *Pb*+DMSO no 9^o dpi, os animais apresentam importante leucocitose no dia 15 pós-infecção. Tal aumento exacerbado de leucócitos no sangue foi prevenido com o tratamento com DHA ou DHA+AAS (Figura 5.12.2 E).

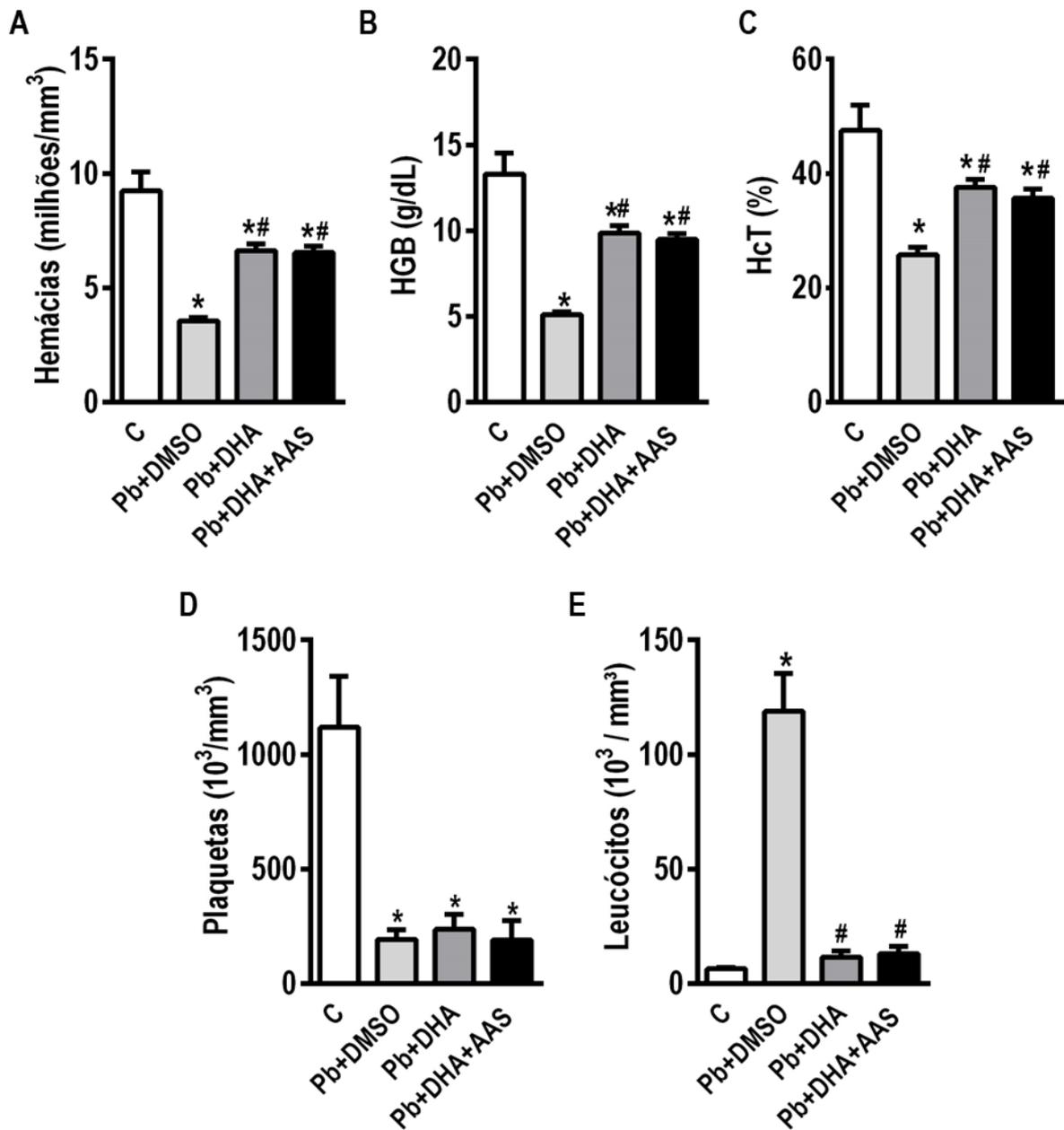


Figura 5.12.2 Tratamento com DHA sozinha ou associada ao AAS reduz anemia e leucocitose, mas não a plaquetopenia. Camundongos foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65 e tratados com AAS, DHA, DHA+AAS ou veículo (DMSO) no 8º dpi. O tratamento com antimalárico foi realizado por sete dias consecutivos. Contagem de hemácias (A), quantificação de hemoglobina (B), do hematócrito (C), contagem de plaquetas (D) e leucócitos no sangue (E) foram realizadas no dia 15 pós-infecção. Valores correspondem à média \pm erro padrão da média. *Significativamente diferente de C ($p < 0,05$). #Significativamente diferente de Pb+DMSO ($p < 0,05$). N= 3- 8 animais/grupo.

Legenda: Pb= *Plasmodium berghei* NK65; C= controle+DMSO; DMSO= dimetilsulfóxido; AAS= Ácido acetilsalicílico DHA= dihidroartemisinina; HGB= Hemoglobina; HcT= hematócrito.

5.13. Efeitos da DHA e AAS na celularidade total e diferencial e das alterações do tecido pulmonar no 15º dia pós-infecção

Considerando que a malária pulmonar é caracterizada pelo recrutamento exacerbado de células mononucleares para o tecido pulmonar e que os animais infectados apresentam leucocitose no 15º dpi, decidimos analisar a celularidade total e diferencial no tecido pulmonar.

O grupo *Pb*+DMSO obteve maior celularidade total no pulmão em comparação ao grupo controle, que pode ser justificada pelo aumento do número de células mononucleares. Novamente, a infecção por *P. berghei* NK65 não levou ao aumento do número de células polimorfonucleares no tecido pulmonar, que usualmente é observado em outras etiologias da SDRA. O tratamento com DHA ou DHA+AAS não levou a alterações da celularidade total e diferencial em relação aos grupos controle ou infectado (Figura 5.13.1 A-C).

De fato, as fotomicrografias obtidas do grupo *Pb*+DMSO, evidencia áreas com importante influxo de células mononucleares, havendo presença majoritária de macrófagos no espaço alveolar e septo alveolar (setas pretas), bem como de pigmento malárico (cabeça de setas brancas) (Figura 5.13.2 B). Cabe ressaltar que no grupo não tratado, por apresentar sobrevida de apenas 34,3%, os animais mais graves evoluíram a óbito. Um padrão semelhante é observado no grupo tratado com DHA, no qual se observa focos discretos de exsudato no espaço alveolar, além da interação íntima de células mononucleares com o endotélio de vasos (detalhes) (Figura 5.13.2 C).

Apesar de também possuir alta taxa de mortalidade, o tratamento com dose única de AAS levou a um importante aumento de exsudato no espaço alveolar, além de edema intersticial, que se intensificaram no 15º dpi. A presença de leucócitos contendo pigmento malárico é mais frequente e além de haver grande interação destes com o endotélio, são observadas áreas maciças no interior dos vasos contendo o pigmento e aglomerados de leucócitos (Figura 5.13.2 D). Tais eventos são pouco frequentes após tratamento com DHA+AAS, sugerindo que o uso apenas de AAS poderia desencadear efeito um pulmonar deletério. Além disso, notou-se no grupo *Pb*+DHA+AAS a presença de infiltrado subendotelial, também indicado em detalhe, que não foi detectado nos demais grupos experimentais (Figura 5.13.2 E).

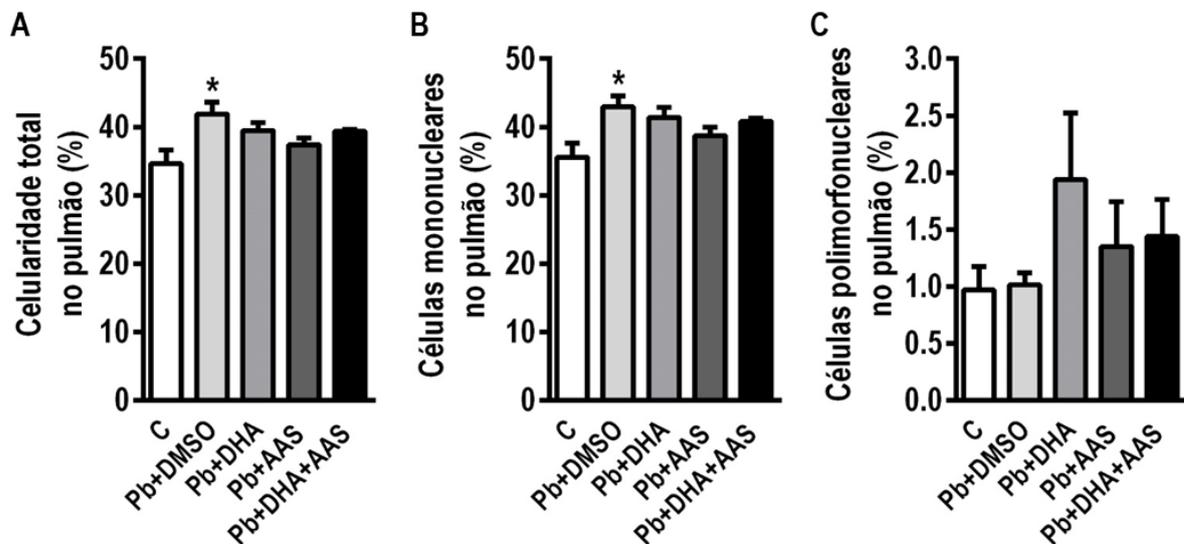


Figura 5.13.1 Celularidade total e diferencial no tecido pulmonar após tratamento com DHA e AAS no 15º dia de infecção.

Camundongos foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65 e tratados com AAS, DHA, DHA+AAS ou veículo (DMSO) no 8º dpi. O tratamento com antimalárico foi realizado por sete dias consecutivos. Contagem total de leucócitos **(A)**, porcentagem de células mononucleares **(B)** e polimorfonucleares **(C)** no tecido pulmonar foi realizada em 10 campos não coincidentes em microscópio de campo claro, sob aumento de 1000x, no 15º dpi. Valores correspondem à média \pm erro padrão da média. *Significativamente diferente de C ($p < 0,05$). N= 4- 5 animais/grupo.

Legenda: *Pb*= *Plasmodium berghei* NK65; C= controle+DMSO; DMSO= dimetilsulfóxido; AAS= Ácido acetilsalicílico DHA= dihidroartemisinina.

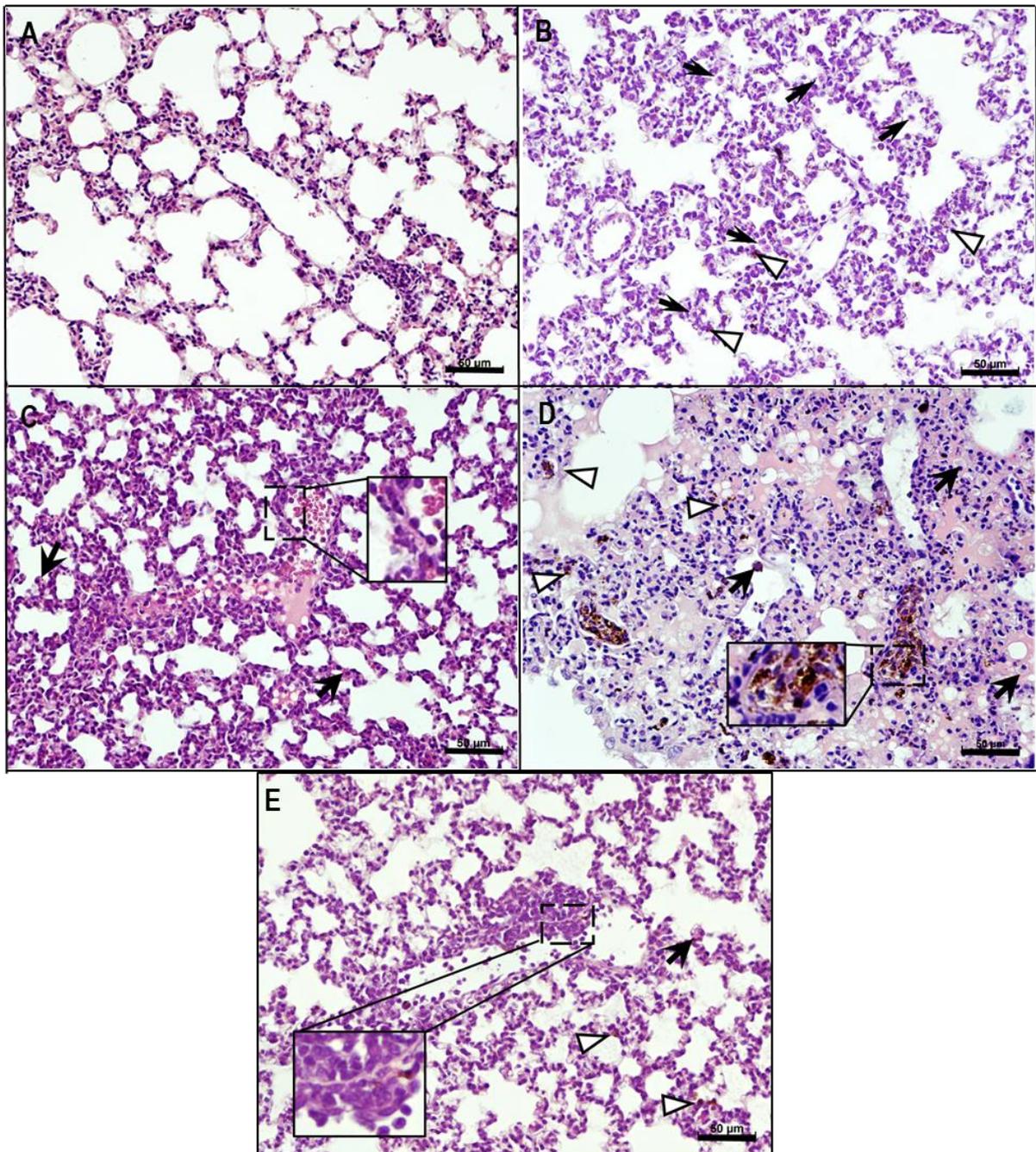


Figura 5.13.2. Interação de leucócitos com o endotélio do tecido pulmonar após indução da MA-SDRA e tratamento com DHA e AAS.

Camundongos foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65 e tratados com AAS, DHA, DHA+AAS ou veículo (DMSO) no 8º dpi. O tratamento com antimalárico foi realizado por sete dias consecutivos. Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar coradas com hematoxilina-eosina dos grupos controle (A), *Pb*+DMSO (B), *Pb*+DHA (C), *Pb*+AAS (D) e *Pb*+DHA+AAS (E). Note a presença de exsudato, a congestão de vasos principalmente no grupo *Pb*+AAS e a formação de aglomerado subendotelial de leucócitos no grupo *Pb*+DHA+AAS. Observa-se também a presença abundante de macrófagos no espaço alveolar e interstício (setas pretas), presença de pigmento malárico (cabeça de seta branca) e a interação de células mononucleares com o endotélio de vasos (detalhe). N= 4- 8 animais/grupo. Barras: 50µm.

Legenda: *Pb*= *Plasmodium berghei* NK65; C= controle+DMSO; DMSO= dimetilsulfóxido; AAS= Ácido acetilsalicílico DHA= dihidroartemisinina.

5.14. AAS mantém alterações hepáticas no 15º dia pós-infecção, que são minimizadas após tratamento DHA

A malária pulmonar é descrita como uma complicação associada a um processo inflamatório exacerbado, observada neste modelo através da importante leucocitose, migração de células inflamatórias ao tecido pulmonar, e de alterações histológicas e de enzimas hepáticas no 9º dpi. A fim de determinar se haveria progressão da doença após o esquema completo de tratamento com DHA, e se o efeito deletério do AAS ao tecido hepático, cortes histológicos de fígado também foram analisados ao término do experimento de sobrevivência, no 15º dpi.

A evolução das alterações hepáticas causadas pela infecção por *P. berghei* NK65 foram caracterizadas pelo maior acúmulo de pigmento malárico e hiperplasia de células de Kupffer, sem haver, no entanto, alterações significantes na morfologia dos hepatócitos. Além do infiltrado perivascular, o grupo *Pb*+DMSO apresentou aumento da aglomeração intravascular de leucócitos, bem como intensa interação destes com o endotélio de veia central. Há presença pouco significativa de células com pigmento malárico na veia porta. Houve maior presença de leucócitos no sinusóide, já observada no 9º dpi, bem como maior frequência de aglomerados heterogêneos de linfócitos (círculos pretos) distribuídos difusamente ao longo do material analisado (Figura 5.14.1 B).

Notou-se um padrão semelhante de acometimento do tecido hepático no grupo tratado com AAS, que também apresentou grande quantidade de células com pigmento malárico em veia central, aglomerados de linfócitos e hiperplasia Kupfferiana intensificada em comparação ao dia 9 (Figura 5.14.1 D).

Os animais tratados com DHA ou DHA+AAS apresentavam hiperplasia de células de Kupffer bem como presença de pigmento malárico mais discretas. Além disso, observou-se o aumento de células circulantes nos sinusóides, coincidindo com uma redução do número de aglomerados linfocitários (Figura 5.14.1 C e E).

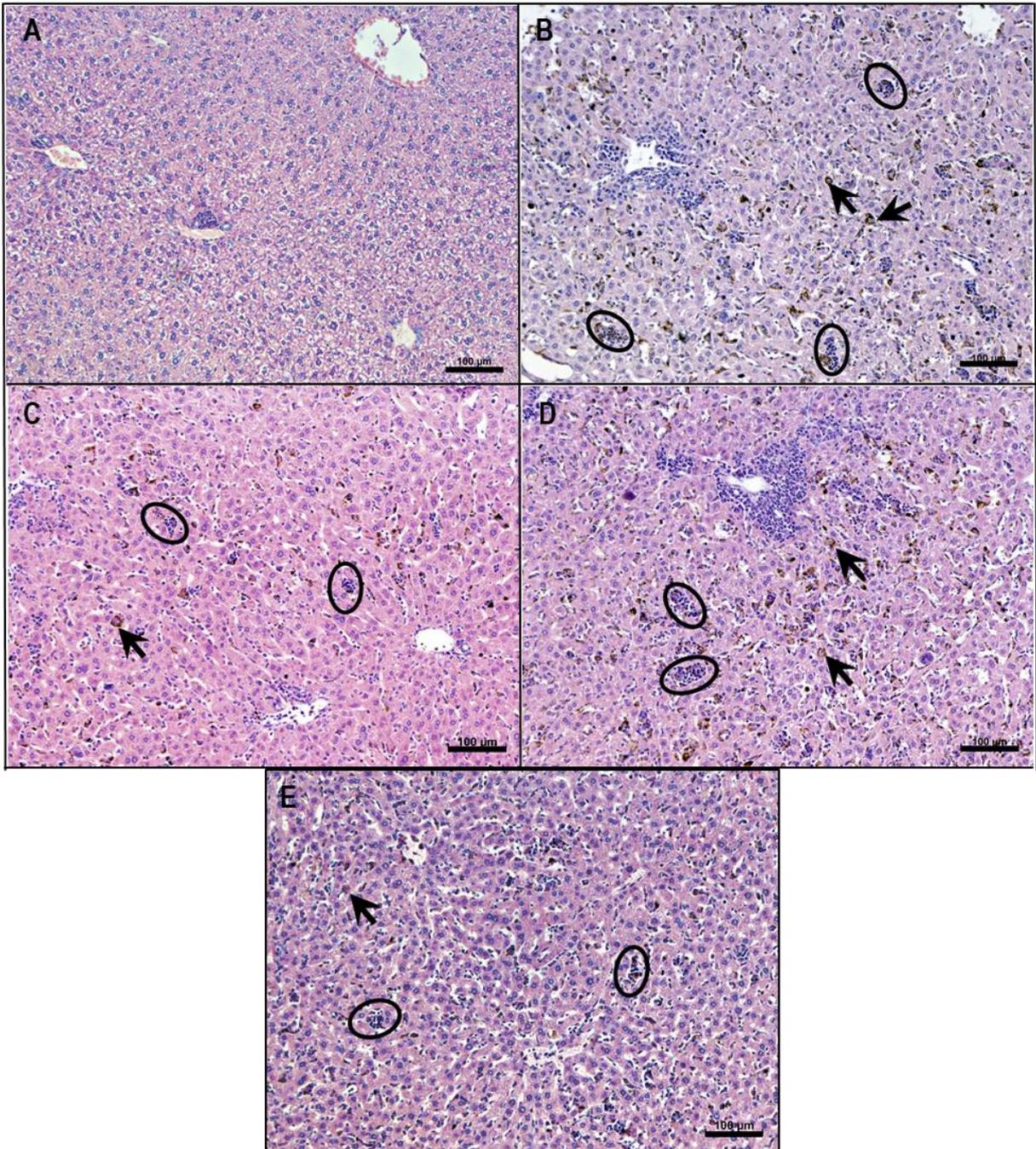


Figura 5.14.1 AAS mantém alterações hepáticas no 15º dia pós-infecção, que são minimizadas após tratamento DHA. Camundongos foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65 e tratados com AAS, DHA, DHA+AAS ou veículo (DMSO) no 8º dpi. O tratamento com antimalárico foi realizado por sete dias consecutivos. Fotomicrografias representativas do fígado coradas com hematoxilina-eosina dos grupos controle (A), *Pb*+DMSO (B), *Pb*+DHA (C), *Pb*+AAS (D) e *Pb*+DHA+AAS (E). Note que os grupos infectados apresentam hiperplasia de células de Kupffer, presença abundante de pigmento malárico (cabeça de seta) e a formação de aglomerados de linfócitos (setas), principalmente nos grupos *Pb*+DMSO e *Pb*+AAS. N= 4- 8 animais/grupo. Barras: 100µm. Legenda: *Pb*= *Plasmodium berghei* NK65; C= controle+DMSO; DMSO= dimetilsulfóxido; AAS= Ácido acetilsalicílico DHA= dihidroartemisinina.

Sob maior aumento, pode-se observar que outros tipos celulares, além das células de Kupffer também apresentam pigmento malárico no citoplasma. Notou-se que as áreas de adensamento apresentavam heterogeneidade de tipos celulares, havendo variabilidade entre os grupos experimentais. Nos grupos *Pb*+DHA e *Pb*+DHA+AAS foram encontradas células com características morfológicas compatíveis com progenitores eritroides (setas brancas) que, diferentemente de linfócitos, não apresentam nucléolo e possuem citoplasma de aspecto vítreo e coloração levemente mais arroxeada (Figura 5.14.2 B e D). Não foram observadas células progenitoras eritroides durante a análise qualitativa do material dos grupos *Pb*+DMSO e *Pb*+AAS (Figura 5.14.2 A e C).

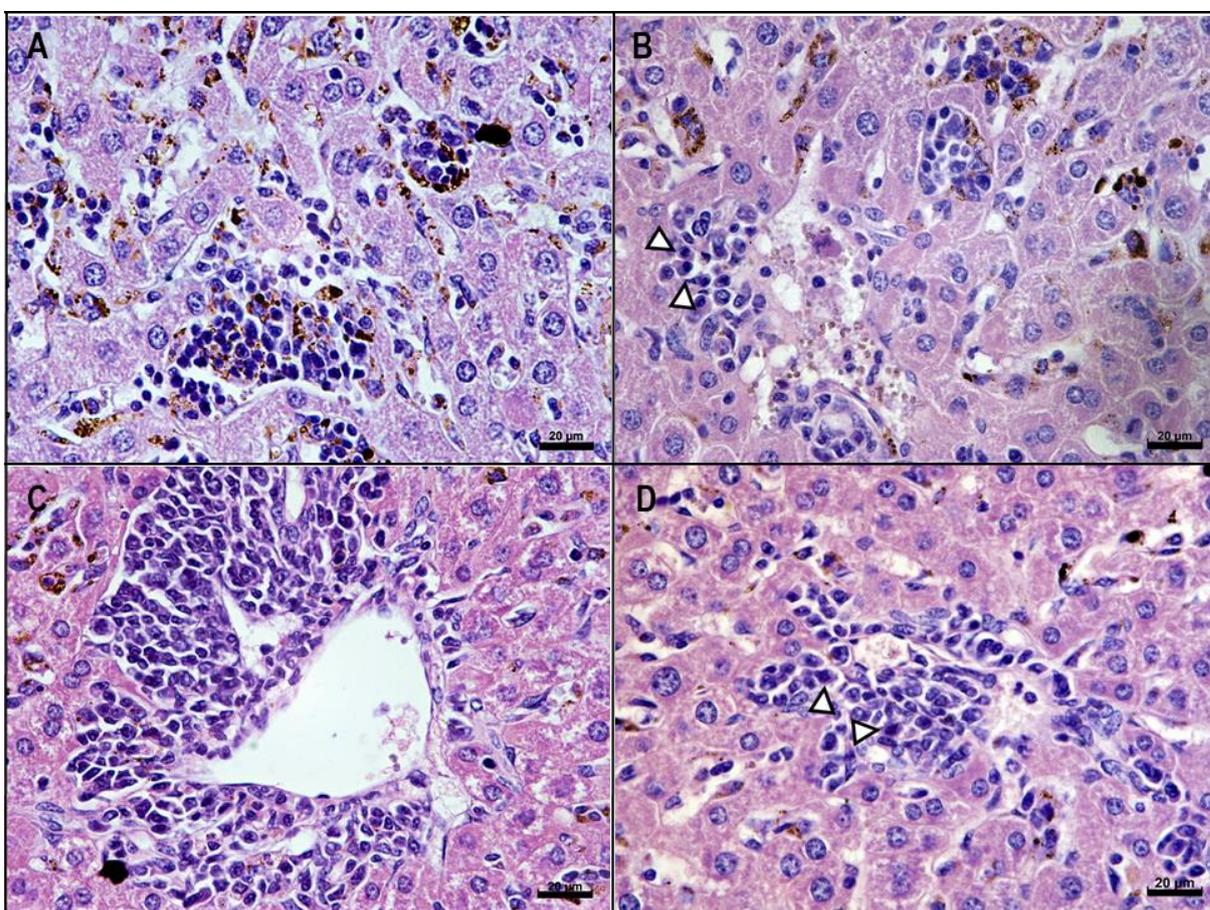


Figura 5.14.2 Presença de células progenitoras eritroides varia de acordo com tratamento 15 dias após infecção por *P. berghei* NK65.

Camundongos foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65 e tratados com AAS, DHA, DHA+AAS ou veículo (DMSO) no 8º dpi. O tratamento com antimalárico foi realizado por sete dias consecutivos. Fotomicrografias representativas do fígado coradas com hematoxilina-eosina dos grupos *Pb*+DMSO (A), *Pb*+DHA (B), *Pb*+AAS (C) e *Pb*+DHA+AAS (D). Detalhamento de aglomerados linfocitários evidencia a presença de células progenitoras eritroides (setas) nos grupos tratados com DHA. N= 4- 8 animais/grupo. Barras: 20µm.

Legenda: *Pb*= *Plasmodium berghei* NK65; C= controle+DMSO; DMSO= dimetilsulfóxido; AAS= Ácido acetilsalicílico DHA= dihidroartemisinina.

Além de células progenitoras eritroides, outra característica interessante do material analisado deve-se a hiperplasia megacariocítica, evento não observado no grupo não-infectado. A presença de megacariócitos foi relatada em todos os grupos infectados, independentemente do tipo de tratamento realizado (Figura 5.14.3 A-D). Eles foram caracterizados morfológicamente através do aspecto fosco de seu citoplasma, estrutura do núcleo que se apresenta de forma segmentada. No grupo *Pb*+AAS foi observada, em um dos cortes histológicos, o contato de membrana celular entre dois megacariócitos (seta dupla; Figura 5.14.3 C).

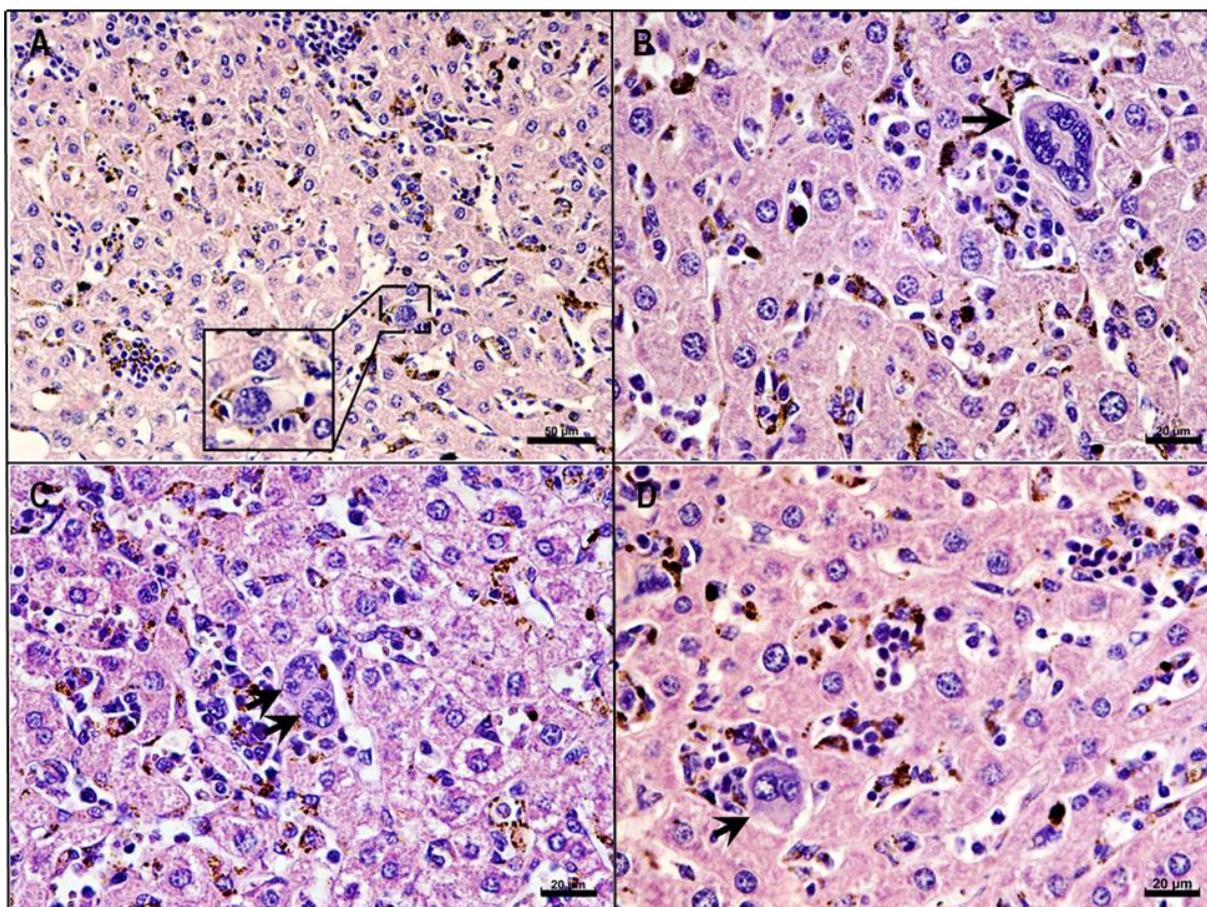


Figura 5.14.3 Presença de megacariócitos 15 dias após inoculação com *P. berghei* NK65.

Camundongos foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65 e tratados com AAS, DHA, DHA+AAS ou veículo (DMSO) no 8º dpi. O tratamento com antimalárico foi realizado por sete dias consecutivos. Fotomicrografias representativas do fígado coradas com hematoxilina-eosina dos grupos *Pb*+DMSO (A), *Pb*+DHA (B), *Pb*+AAS (C) e *Pb*+DHA+AAS (D) mostrando a presença de megacariócitos (detalhe em figura A e setas) em todos os grupos infectados. N= 4- 8 animais/grupo. Barras: 50µm e 20µm.

Legenda: *Pb*= *Plasmodium berghei* NK65; C= controle+DMSO; DMSO= dimetilsulfóxido; AAS= Ácido acetilsalicílico DHA= dihidroartemisinina.

Em comparação ao material obtido no 9º dpi, houve um aumento do número de células mononucleares circulantes na veia central, especialmente nos grupos não tratados com antimalárico (Figura 5.14.4 A e C). Neles, pode-se notar a formação de aglomerados leucocitários na luz do vaso, além de agregados entre leucócitos e hemácias, bem como a interação destes com o endotélio. Há presença mais discreta desta interação no grupo *Pb*+DHA+AAS e de forma rara no grupo *Pb*+DHA (Figura 5.14.4 B-D). Cabe ressaltar que análises qualitativas e quantitativas através de imunomarcagem serão necessárias para corroborar tais achados descritos no presente estudo.

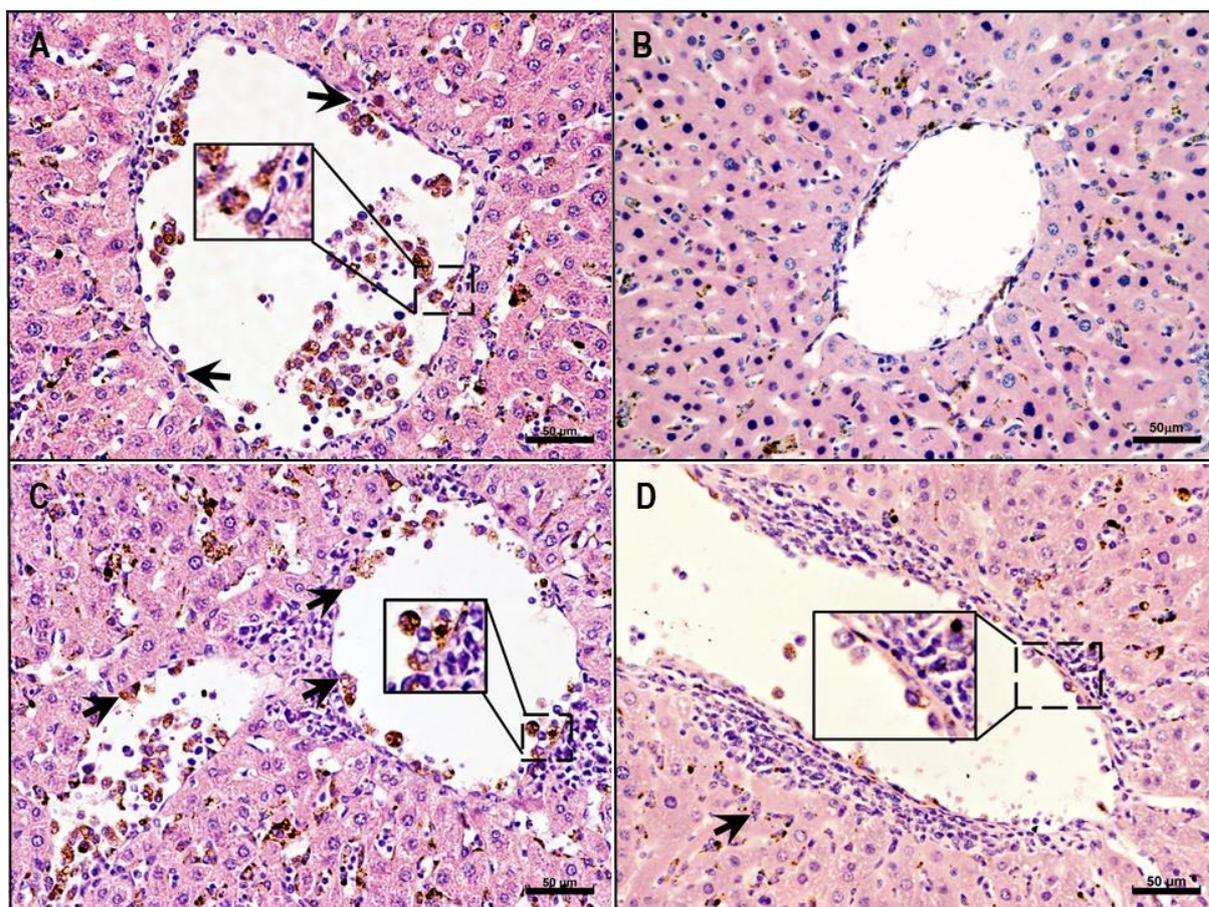


Figura 5.14.4 Aumento da interação de leucócitos com o endotélio de veia central 15 dias após infecção *P. berghei* NK65.

Camundongos foram inoculados com 10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* NK65 e tratados com AAS, DHA, DHA+AAS ou veículo (DMSO) no 8º dpi. O tratamento com antimalárico foi realizado por sete dias consecutivos. Fotomicrografias representativas do fígado coradas com hematoxilina-eosina dos grupos *Pb*+DMSO (A), *Pb*+DHA (B), *Pb*+AAS (C) e *Pb*+DHA+AAS (D). Detalhamento evidenciando comunicação de células mononucleares com o endotélio de veias centrais (detalhes), formação de aglomerados leucocitários no vaso e de agregados com hemácias grupos infectados. N= 4- 8 animais/grupo. Barras: 50µm. Legenda: *Pb*= *Plasmodium berghei* NK65; C= controle+DMSO; DMSO= dimetilsulfóxido; AAS= Ácido acetilsalicílico DHA= dihidroartemisinina

6. Discussão

A malária é uma doença parasitária prevalente em países de clima tropical e subtropical, com alta taxa de morbidade e mortalidade [119]. Dentre as complicações da doença, a SDRA associada à malária (MA-SDRA) ocorre principalmente em pacientes adultos e mulheres grávidas e se manifesta mesmo com a utilização do tratamento com antimalárico [21]. Os mecanismos que resultam nessa complicação não foram completamente elucidados e, nesse contexto, o uso de modelos experimentais que mimetizam a doença pode esclarecer essas lacunas na literatura. Além disso, atualmente não existe um tratamento específico para a MA-SDRA, o que reforça a necessidade de estudos voltados para novas estratégias terapêuticas, bem como para a prevenção desta complicação.

Diversos modelos experimentais de MA-SDRA mimetizam alguns mecanismos observados na MA-SDRA em humanos. No presente estudo, usamos a infecção por *Plasmodium berghei* NK65 em camundongos C57BL/6. Esse modelo foi previamente descrito por Van den Steen e colegas onde foi observada a formação de edema pulmonar, hipoalbuminemia, hemorragia no tecido pulmonar, e infiltrado inflamatório sem haver, no entanto, o desenvolvimento de sintomas associados à malária cerebral (CM) [73].

No presente estudo, a infecção com *P. berghei* NK65 foi capaz de causar um quadro de malária grave a partir do 8º dpi, devido a piora na mecânica respiratória, além alterações morfológicas no parênquima e formação de edema previamente descritos. Considerando pesquisas anteriores realizados com esse modelo, este é o primeiro trabalho no qual a progressão das alterações morfo-funcionais relacionadas à esta cepa de parasita são descritas.

O aumento da pressão viscoelástica pela infecção com *P. berghei* NK65 pode estar relacionada a formação de edema pulmonar, espessamento de septo alveolar e infiltrado inflamatório no tecido pulmonar, também observados na infecção por *P. berghei* ANKA [107]. Também foi observado um aumento na pressão resistiva e na elastância estática pulmonar, que podem indicar remodelamento tecidual, o que é observado em outras etiologias de SDRA [137, 138].

As alterações na mecânica respiratória foram acompanhadas pelo aumento da permeabilidade da barreira alvéolo capilar nos dias 8 e 9 pós-infecção, medidas através da relação entre o peso úmido e o peso seco pulmonar e confirmadas pela quantificação de proteínas no BALF, devido ao extravasamento de conteúdo plasmático ao tecido pulmonar observado no 9º dpi. Nesse contexto, o infiltrado

leucocitário e o edema pulmonar têm sido descritos na MA-SDRA induzida por *P. berghei* NK65 [111] e mimetizam as alterações histopatológicas observadas em análises post-mortem de casos fatais de malária pulmonar [80, 110].

As alterações na mecânica respiratória e formação de edema pulmonar no presente modelo nos levaram a investigar se o tratamento com dihidroartemisinina (DHA) poderia modular a disfunção pulmonar e a lesão tecidual na malária pulmonar. A DHA é um derivado semissintético da artemisinina amplamente estudado devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antitumorais e imunomodulatórias [86, 113-115]. A DHA solubilizada em salina foi previamente estudada em um modelo de malária cerebral (CM), no qual ela foi capaz de prolongar a sobrevivência e, em associação a artovastatina, foi capaz de mitigar a migração de leucócitos através da redução dos níveis de Eotaxina/CCL11, IL-13, MIP-1 β e CCL-4 no plasma [118]. Neste estudo, a DHA solubilizada em salina reduziu a pressão viscoelástica, mas não foi capaz de reduzir a elastância e pressão resistiva pulmonares. Além disso, mesmo após o tratamento com a DHA, a infecção por *P. berghei* NK65 levou ao aumento da inflamação, do edema intersticial e alveolar e de áreas de atelectasia. Entretanto, a presença de hemorragia foi mais proeminente no grupo não-tratado. Esses achados são similares ao observado em humanos, onde a malária pulmonar é caracterizada também pela congestão de capilares alveolares, espessamento de septo alveolar, hemorragia intra-alveolar e formação de membrana hialina [139].

Considerando que a DHA solubilizada em salina (Sal) não foi capaz de prolongar a sobrevivência no presente modelo e que estudos anteriores não possuem consistência em relação ao tipo de veículo usado para o tratamento com a DHA [118,133,134,139], nós decidimos investigar se outras formas de solubilização da DHA poderiam melhorar a eficácia do tratamento. Surpreendentemente, nossos dados demonstraram que a DHA é capaz de aumentar a sobrevivência e retardar o aumento da parasitemia de forma diferente, de acordo com o veículo utilizado. Nesse contexto, a instabilidade da DHA em soluções aquosas devido à sua complexidade estrutural foi descrita anteriormente [140, 141] e pode justificar a maior mortalidade e parasitemia observadas no grupo tratado com DHA (Sal).

O DMSO sozinho ou combinado com o polissorbato 80 (PS) tem sido usado como veículo em estudos relacionados à farmacocinética, farmacodinâmica e efeitos terapêuticos da DHA [131,139,142]. A similaridade na sobrevivência e parasitemia entre os grupos DHA (DMSO) e DHA (DMSO: PS) sugere que estas formas de

solubilização possuem uma eficácia superior em comparação ao DHA (Sal). Tal efeito pode ser atribuído às características químicas do co-solvente DMSO. O DMSO é uma molécula anfipática que contém um domínio polar e dois grupos apolares, o que a torna capaz de dissolver componentes polares e hidrofóbicos [143]. Além disso, o DMSO é comumente usado para solubilizar compostos orgânicos em soluções aquosas e pode influenciar no formato e tamanho das micelas do surfactante polissorbato 80, de acordo com a proporção da mistura [144].

Outro aspecto que deve ser considerado na escolha do veículo mais adequado a um determinado composto são seus efeitos fisiológicos e toxicológicos. Nesse contexto, a administração intraperitoneal do polissorbato 80 foi capaz de aumentar os níveis de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), glutamato desidrogenase (GLDH), lactato desidrogenase (LDH) e bilirrubina total, o que indica um possível efeito deletério, quando administrado por via intraperitoneal [145].

Com o intuito de determinar se a DHA poderia modular a migração de leucócitos aos pulmões, a celularidade total e diferencial, bem como o perfil de mediadores inflamatórios no BALF foram analisados. No presente estudo, a cloroquina foi usada como um controle positivo do “clearance” do parasita. O grupo infectado não-tratado apresentou um aumento na contagem de células polimorfonucleares, o que sugere que a infecção por *P. berghei* NK65 pode causar leucocitose. Nossos resultados indicam que em modelo experimental de malária pulmonar, além de eliminar a parasitemia, a cloroquina também mantém a integridade da barreira alvéolo-capilar, além de prevenir o recrutamento de leucócitos aos pulmões, o que limita seu uso para o estudo de tratamentos adjuvantes ao antimalárico. O aumento da contagem de leucócitos no sangue observada no grupo Pb+CQ deve-se, provavelmente, a um aumento na fração de células mononucleares. Nesse contexto, a cloroquina é capaz de eliminar a parasitemia sem, no entanto, mitigar os sintomas da malária cerebral [105]. Entretanto, nossos resultados sugerem que na malária pulmonar induzida por *P. berghei* NK65, a cloroquina minimiza a lesão pulmonar, o que limita seu uso para estudos com terapias adjuvantes neste modelo.

Nossos resultados indicam que a infecção por *P. berghei* NK65 leva a um aumento da concentração de proteínas no BALF, conforme previamente descrito [111], e que também ocorre na infecção por *P. berghei* ANKA [108], além do aumento do influxo de células mononucleares e níveis aumentados de MCP-1 no

BALF. Além disso, não foram observadas diferenças nos níveis de KC ou na contagem de células polimorfonucleares no BALF, indicando que o recrutamento de neutrófilos não é essencial na MA-SDRA induzida por *P. berghei* NK65. Classicamente, a SDRA é caracterizada por um rápido início de lesão pulmonar, edema difuso, hipoxemia, medida pela relação PaO₂ / FiO₂ [76], além de uma inflamação pulmonar exacerbada com grande influxo de neutrófilos ao parênquima pulmonar e espaço alveolar [146, 147]. Diferentemente de outras etiologias, a MA-SDRA é caracterizada por um infiltrado inflamatório pulmonar composto majoritariamente por células mononucleares [110, 148, 149]. Também são observados o aumento da permeabilidade da barreira alvéolo capilar, com consequente edema pulmonar e formação de membrana hialina [70].

Embora o grupo Pb+DHA (DMSO) não tenha apresentado aumento significativo na concentração da proteína no BALF, um perfil proteico similar entre o BALF e o plasma foi observado em todos os grupos tratados com a DHA. Ademais, observamos que o tratamento com a DHA foi capaz de aumentar os níveis de MCP-1 no BALF, embora o número de células mononucleares no BALF não tenha sido estatisticamente diferente do controle. O MCP-1 é uma quimiocina associada ao recrutamento de monócitos e sua expressão é dependente da ativação do NF-κB [150, 151]. Estudos sugerem que o DHA inibe a via do NF-κB tanto *in vitro* [113, 152] quanto *in vivo* [153], mas esse efeito foi dose-dependente e obtido após múltiplas doses. Buscando aproximar o estudo ao tratamento em humanos, nós escolhemos uma dose similar àquela dada aos pacientes [84, 153], que é muito mais baixa que a dose associada à inibição do NF-κB [150].

O modelo usado neste estudo reproduz algumas características observadas na SDRA em humanos, tais como inflamação pulmonar, edema e infiltrado de monócitos / macrófagos. Embora nossos resultados não tenham mostrado diferenças nos níveis de IL-1β no BALF após a infecção por *P. berghei* NK65, o aumento da expressão de mRNA para IL-1β no tecido pulmonar foi observado anteriormente na infecção pela mesma cepa parasitária no 10^o dpi [111]. Além disso, a expressão aumentada de mRNA dessas citocinas no tecido pulmonar ocorre em resposta a estímulos com hemozoína de forma aguda e de maneira dose-dependente [154]. Assim, sugerimos que níveis inalterados de IL-1β no BALF aqui observados podem ser atribuídos à sua cinética durante a infecção por *P. berghei* NK65. Essa hipótese é sustentada pela análise da cinética de outros mediadores inflamatórios como o IL-6, TNF-α, MIP-2 e IL-10, em modelo de infecção por *P.*

berghei ANKA onde foi observado que o pico de concentração destas citocinas e quimiocinas varia de acordo com o dia de infecção. Além disso, o estudo mostrou uma maior concentração desses mediadores no plasma e homogenato pulmonar, não havendo mudanças significativas no BALF [149].

A partir do estabelecimento do início das alterações na mecânica respiratória, formação de edema, bem como da forma mais adequada de tratamento com a DHA, avaliamos se o AAS poderia modular o processo inflamatório, bem como as alterações morfo-funcionais da MA-SDRA induzida por *P. berghei* NK65.

Inicialmente, avaliamos os parâmetros hematológicos a fim de verificar se o tratamento com AAS ou DHA poderia influenciar na anemia decorrente da infecção por *Plasmodium*. A infecção pelo *P. berghei* NK65 levou à redução da contagem de hemácias, concentração de hemoglobina e de hematócrito de forma similar ao observado na infecção por outros tipos de plasmódio. Isso pode ser atribuído ao aumento da parasitemia observado a partir do terceiro dia de infecção, devido à ruptura de hemácias durante o ciclo eritrocítico. Não foram observadas mudanças no quadro de anemia 24 horas após o tratamento com AAS, DHA ou AAS+DHA, possivelmente devido ao curto período de tempo para a produção de hemácias pelo organismo. A infecção por malária envolve a adesão de hemácias infectadas aos capilares e vênulas e a ruptura e remoção de hemácias infectadas por macrófagos presentes no baço, levando à anemia [72]. A anemia é um sinal comum nas infecções por *P. falciparum* e *P. vivax* e está relacionada à hemólise e eritropoiese ineficaz. Durante a infecção pelo plasmódio, produtos liberados pelo parasita, em especial a hemozoína, são capazes de inibir a proliferação de precursores eritroides, conforme observado em modelos de infecção por *P. chabaudi*, *P. yoelli* e *P. berghei* ANKA [155].

Além da anemia, os animais infectados também apresentaram plaquetopenia. O tratamento com AAS, DHA ou AAS+DHA não foi capaz de alterar a contagem de plaquetas nos dias 9 e 15 em relação ao grupo não tratado. A plaquetopenia ocorre em 60 a 80% dos pacientes infectados por *P. falciparum* e *P. vivax* e é resultante da diminuição da produção de plaquetas e do sequestro destas no baço. Além disso, ocorre ativação plaquetária, com aumento da adesão às hemácias infectadas e ao endotélio, podendo causar obstrução de pequenos vasos [156]. As plaquetas são importantes na manutenção da homeostase endotelial e sua depleção está relacionada à sangramento local. Sob condições basais, as plaquetas expressam e / ou liberam fatores estabilizantes que interagem com receptores de células

endoteliais dos capilares alveolares, como por exemplo a esfingosina-1-fosfato. Estes receptores estão ligados a vias de sinalização intracelular que regulam interações citoesqueléticas, junção de aderências e propriedades basais da barreira endotelial. Em modelos experimentais que levam à plaquetopenia, ocorre perda da integridade do endotélio dos capilares alveolares, com consequente extravasamento de fluido e hemácias para o espaço alveolar [157].

A MA-SDRA é caracterizada pela presença abundante de leucócitos, principalmente monócitos, macrófagos e linfócitos, havendo apenas uma quantidade limitada de neutrófilos presentes [73]. Nesse contexto, os animais infectados não-tratados apresentaram infiltrado de células mononucleares no tecido pulmonar e BALF, além de possuírem níveis aumentados da quimiocina MCP-1 no BALF em relação ao grupo controle. A quimiocina MCP-1 possui um papel importante para o extravasamento de monócitos através do endotélio. Esse processo é complexo e pode ser deflagrado por mais de uma via de sinalização a partir do estímulo com MCP-1. A transmigração de monócitos depende de sua interação com a E-selectina, seguida pelo estabelecimento de uma firme adesão entre monócito e endotélio através das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 [158]. Estudos realizados em condições que mimetizam o fluxo sanguíneo mostraram que o estímulo com MCP-1 induz a adesão celular a partir da ativação das beta integrinas $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$ expressas em monócitos [159] com moléculas de adesão como a E-selectina [60], expressas na superfície endotelial. O estímulo de monócitos com hemozoína resulta na produção aumentada de alguns produtos de peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados, como por exemplo, os ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETEs) [160], que por sua vez induzem a produção de mediadores inflamatórios por estas células. Nesse contexto, a 15-HETE é capaz de mimetizar os efeitos do estímulo com hemozoína, levando ao aumento dos níveis de IL-1 β , TNF- α , e da metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) mas não de MCP-1. Em contrapartida, a hemozoína pode atuar diretamente nos monócitos, levando ao aumento da expressão do gene que codifica MCP-1 [62]. Outro estudo corrobora tal hipótese, indicando que a expressão de mRNA para MCP-1 está aumentada em animais com maior quantidade de hemozoína no tecido pulmonar, além de estar fortemente correlacionada com o aumento de proteína no BALF em diferentes modelos de malária pulmonar [154].

Essa modulação da resposta inflamatória também ocorre em modelos experimentais usando hemozoína sintética, onde foi observado o aumento de MCP-

1, IL-1 β , IL-6, MIP-1 α e MIP-1 β após o estímulo [161]. Além disso, análises post-mortem do pulmão de pacientes com malária pulmonar mostram grandes quantidades de hemozoína nos pulmões e uma correlação positiva entre a sua presença e a gravidade da SDRA [80], além de presença abundante de macrófagos nos capilares alveolares e espaço alveolar [110].

O tratamento com AAS levou ao aumento de células mononucleares no sangue e no BALF. Entretanto, a quantificação no tecido pulmonar foi significativamente menor em relação ao grupo não-tratado. Houve também redução dos níveis de MCP-1 no BALF após a administração de AAS sozinho ou associado a DHA. Considerando o grupo tratado apenas com o antimalárico mantém níveis aumentados de MCP-1, a redução observada no tratamento combinado pode ser atribuída ao AAS. Nesse ponto, é importante ressaltar que a contagem de células mononucleares compreendeu não apenas macrófagos e monócitos, mas também linfócitos. Para solucionar tal limitação técnica, propomos a análise dessas populações por citometria de fluxo. Apesar disso, a análise do tecido pulmonar nos permite afirmar que há presença majoritária de macrófagos intersticiais e no espaço alveolar em detrimento da população de linfócitos, devido a morfologia destas células. Um estudo recente analisou subpopulações de monócitos presentes no infiltrado inflamatório após a infecção por *P. berghei* ANKA, dentre as quais destacou-se a presença majoritária de uma subpopulação Ly6C^{low} no cérebro e pulmões. Percebeu-se que a população de macrófagos residentes (CD206⁺) permaneceu inalterada enquanto a de macrófagos intersticiais (CCR2⁺ CD11b⁺) aumentou 14 vezes e a de monócitos (Ly6C^{low} CD11b⁺) 18 vezes em relação ao animal não infectado e que estas populações são originárias de monócitos Ly6C^{high} da medula óssea [162]. Assim, a análise mais detalhada sobre qual população de macrófagos, bem como seu perfil de ativação, se faz necessária.

No presente estudo, a infecção por *P. berghei* NK65, bem como o tratamento com AAS ou DHA não levaram ao aumento do número de células polimorfonucleares no tecido pulmonar e BALF, além de não terem aumentado os níveis da quimiocina KC, envolvida na migração de neutrófilos, conforme já discutido acima.

Outra característica importante na SDRA está relacionada ao importante edema intersticial e alveolar. O aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar leva ao extravasamento de fluido rico em proteína para o espaço alveolar e, conseqüentemente, ao aumento do conteúdo de proteína no BALF, agravando a

lesão pulmonar. Estudos realizados em modelo de lesão pulmonar aguda induzida pelo *P. berghei* ANKA mostram que a infecção leva a um aumento de proteínas totais no BALF, havendo um aumento em especial da imunoglobulina IgM. Os autores observaram uma correlação entre positiva entre a parasitemia e níveis de IgM no BALF, indicando que o maior número de parasitas circulantes resulta no agravamento da lesão pulmonar [149]. O aumento de proteínas no BALF foi observado no grupo *Pb*+DMSO. Além disso, nossos dados mostram uma correlação forte entre a parasitemia no dia 8 de infecção e maior quantificação de proteínas no BALF no dia 9. Desta forma, o aumento do número de hemácias infectadas circulantes no 8º dpi pode ser considerado um fator preditivo de lesão pulmonar.

O efeito do AAS na ativação plaquetária ocorre através da acetilação do resíduo serina (SER 530) da cicloxigenase 1 (COX-1), que efetivamente inibe o acesso do ácido araquidônico ao seu local de ligação de forma permanente [163]. Trabalhos anteriores mostram que a ativação plaquetária leva à formação de agregados plaqueta-monócito e plaqueta-neutrófilo, além da liberação de mediadores inflamatórios que atuam nas células no endotélio pulmonar, o que amplificaria o processo inflamatório e levaria a disfunção da barreira alvéolo-capilar em modelos experimentais de SDRA [157]. Em contrapartida, um recente estudo realizado em humanos infectados por diferentes espécies de plasmódio indicou que as plaquetas teriam um efeito protetor na malária, através de sua ligação com hemácias infectadas, culminando na morte do parasita. Além disso, foi demonstrado que esse efeito de eliminação do parasita varia de acordo com a espécie do plasmódio e pode chegar a 60% em casos de infecção pelo *P. vivax* [67]. Nossos resultados indicam que os animais tratados apenas com AAS ou associado ao antimalárico apresentaram aumento na concentração de proteínas no BALF, sendo um indicativo de perda da integridade da barreira alvéolo capilar. Tal efeito deletério reforça a hipótese de que as plaquetas poderiam ter um efeito protetor na malária observada por Kho e colegas em humanos e descrita previamente em estudos em camundongos e usando cultura de *P. falciparum* [67].

O aumento da elastância pulmonar está relacionado à presença de heterogeneidade no tecido causada por alterações morfológicas como a presença de edema e colapso alveolar [120, 164]. A análise histológica dos pulmões que foram submetidos à mecânica respiratória evidencia um importante influxo de fluido para o interstício e espaço alveolar nos grupos *Pb*+DMSO, AAS, e com o tratamento associado à DHA. Tal achado é corroborada pela maior concentração de proteínas e

de células mononucleares no BALF após o tratamento com AAS e pode justificar a manutenção do aumento da pressão resistiva pulmonar causada pela infecção, bem como o aumento da elastância estática pulmonar em relação ao grupo tratado apenas com a DHA.

No presente estudo, a infecção por *P. berghei* NK65 causou alterações histológicas no fígado, dentre as quais, notou-se intensa presença de pigmento malárico, bem como hiperplasia de células de Kupffer, além do aumento de aspartato-aminotransferase (AST), fosfatase alcalina e redução dos níveis de albumina sérica. Esses achados estão de acordo com o observado em outros modelos murinos de malária, como os de anemia grave induzida por *P. berghei* ANKA ou *P. chabaudi chabaudi* AS. Nesses modelos, foi observado um aumento do peso do fígado e baço, além da eritrofagocitose aumentada, observada através da coloração de Dylight 633 NHS ester, que se liga a hemácias [165], o que é compatível com a presença de pigmento malárico observada em nosso modelo de infecção. A presença de alterações hepática é relatada em até 45% dos casos de malária e em 87% dos pacientes que apresentam icterícia. Em humanos, as alterações histológicas são semelhantes às observadas no presente estudo, havendo infiltrado de monócitos, hiperplasia Kupfferiana e acúmulo de pigmento malárico e costumam ser atenuadas após o uso dos ACTs [166]. Considerando que o aumento de alanina-aminotransferase (ALT) em humanos ocorre de forma aguda, na lesão hepática [167] a manutenção dos níveis de ALT semelhantes ao controle pode ter relação com o estágio da infecção no nosso modelo. Ademais, alterações da função hepática têm sido relatadas também na infecção por *P. berghei* NK65. As alterações são caracterizadas por estresse oxidativo, através do aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD) e de MDA, que indica perda de estrutura e integridade da membrana celular, além de um aumento de AST e da razão entre AST/ALT. Além disso, os autores especulam que o aumento de AST, mas não de ALT seria um indicativo de aumento de hemólise, além de um estágio inicial de fibrose [75].

A eritrofagocitose é um processo comum em indivíduos hígidos e ocorre em especial por macrófagos presentes no baço, que reconhecem hemácias senescentes e as fagocitam, como mecanismo de recaptção de ferro. Estas hemácias senescentes expressam receptores de superfície específicos como receptores de fosfatidilserina e o CD47, além de outros como a proteína alfa reguladora de sinal (SIRP α), o receptor scavenger tipo A membro I (SR-AI) e o

CD36 [168]. Na malária, a eritrofagocitose aumentada é explicada não apenas pela captação de hemácias infectadas, a fim de realizar o clearance do parasita. Este evento parece estar relacionado também a produção de auto-anticorpos que reconhecem também hemácias não infectadas, e as opsonizam, levando à fagocitose por macrófagos. Isso foi comprovado em um estudo com pacientes infectados por *P. vivax*, cuja infecção não costuma levar à alta parasitemia, onde estes apresentavam aumento de imunoglobulina G (IgG). A ligação desses auto-anticorpos pode modificar a conformação molecular das proteínas da membrana, perturbando as interações entre o citoesqueleto e a bicamada lipídica e reduzindo a deformabilidade de das hemácias, o que também aumentaria a chance de remoção por fagocitose [169]. Assim, podemos sugerir que a atividade das células de Kupffer, pela fagocitose de pigmento malárico e da própria eritrofagocitose seria um mecanismo de controle da infecção mediada por *P. berghei* NK65 e que pode estar relacionada a anemia observada no modelo.

As alterações na medula foram discretas, havendo a presença aumentada de megacariócitos nos animais infectados em relação ao grupo controle. Apesar de haver poucos relatos na literatura, um estudo realizado na década de 1960 com amostras de pacientes infectados por *P. falciparum* e *P. vivax* indicou que a malária leva a um aumento das formas imaturas nas séries granulocítica e linfocítica, além de um aumento relativo de megacariócitos imaturos ou maduros, que voltaram aos níveis normais após o tratamento com antimalárico [170]. Já em modelos experimentais, a inoculação de *P. yoelii* 17X em camundongos BALB/c e C57/BL6, foram observadas células F4/80 de morfologia estrelada associadas a ilhas de hematopoiese após a infecção, além da maior presença de monócitos F4/80+ arredondados nos espaços sinusais nos animais doentes em comparação aos controles não infectados [171].

Considerando que alguns modelos experimentais de malária levam a alterações renais, decidimos avaliar a função renal através de exames bioquímicos para creatinina, sódio e ureia. O modelo de infecção pelo *P. yoelii* 17XNL com depleção de fagócitos mostrou-se capaz de causar malária grave, além de falência renal, caracterizada pelo aumento de ureia e creatinina, além de VCAM-1, P-selectina, fator de von Willebran e ICAM-1 [172]. Nesse contexto, a infecção *P. berghei* NK65 não levou a mudanças nos níveis basais dos parâmetros avaliados, indicando que possivelmente a lesão renal seja dependente da espécie de parasita responsável pela infecção.

A fim de investigar se a infecção *P. berghei* NK65 poderia levar a alterações sugestivas de malária cerebral (CM), foram realizados três experimentos isolados para avaliar a integridade da barreira hematoencefálica, pelo método de azul de evans. O azul de evans se liga à albumina sérica, conseguindo dessa forma percorrer toda corrente sanguínea [173]. Desta forma, perda da integridade da barreira hematoencefálica presente no quadro de malária cerebral pode ser observada através da presença de pigmento azulado, que indica extravasamento de conteúdo plasmático, no tecido cerebral. Não houve diferença na quantidade de azul de evans detectada no cérebro de nenhum dos grupos infectados com *P. berghei* NK65 em relação ao grupo controle, o que indica que os animais infectados não apresentam aumento da barreira hematoencefálica, conforme já descrito anteriormente [111].

Considerando os efeitos do tratamento com DHA ou AAS no recrutamento de leucócitos para o tecido pulmonar, bem como as alterações de função pulmonar, experimentos subsequentes foram realizados a fim de determinar a influência desses tratamentos na sobrevivência e nas alterações pulmonares e hepáticas. Os animais não tratados ou que receberam DHA apresentaram sobrevivência e parasitemia semelhantes às observadas na primeira etapa do estudo, o que reforça o efeito da DHA no prolongamento da sobrevivência e retardo do aumento da parasitemia entre os dias 10 e 12. De fato, o tratamento com a DHA sozinha ou combinada com atorvastatina foi capaz de prorrogar o aumento da parasitemia na infecção por *P. berghei* ANKA [118]. A sobrevivência significativamente menor após o tratamento com AAS pode ser justificada pelas alterações morfo-funcionais do tecido pulmonar observadas no 9º dpi, tendo em vista a elastância aumentada, bem como extensa área de edema e hemorragia apresentada por este grupo. Já a manutenção da sobrevivência semelhante ao grupo não infectado observada pelo tratamento combinado pode ser relacionada ao efeito do tratamento antimalárico tanto ao nível de alteração pulmonar, como sobre a anemia e alteração hepática.

Os animais infectados mantiveram importante anemia no dia 15 pós-infecção e o tratamento com antimalárico foi capaz de aumentar a contagem de hemácias, bem como o hematócrito e a concentração de hemoglobina. A anemia pode estar relacionada ao “clearance” de parasitas e também a eritrofagocitose de hemácias não infectadas, o que também é observado em humanos. A anemia é uma das complicações mais graves causadas pelo *P. falciparum*, levando a óbito principalmente crianças. No entanto, apesar da eritrofagocitose mediada por auto-

anticorpos ser uma possibilidade mostrada em alguns estudos e já discutida aqui, ainda existe certa inconsistência ao afirmar esse processo como o principal mecanismo de eliminação de hemácias. Outro mecanismo descrito é a fagocitose mediada pela ativação do sistema complemento. Em situações normais, as hemácias são protegidas da ativação do complemento pela ação de proteínas de superfície reguladoras do complemento, como o receptor de complemento 1 (CR1) e fator de aceleração de decaimento (CD55). No entanto, um estudo realizado com amostras de crianças africanas internadas por anemia grave causada por *P. falciparum* mostrou um aumento de IgG e redução da expressão de CR1 e de CD55 [174]. Essa modulação sugere que as proteínas reguladoras do complemento podem desempenhar um papel importante na proteção de hemácias não-infectadas contra a destruição durante a infecção por malária. A redução da anemia após a utilização da DHA pode ser atribuída à redução da parasitemia nos primeiros dias após o início do tratamento, que levaria, portanto, à redução da ruptura de hemácias por parasitas e redução do “clearance” de hemácias pelo baço.

O processo inflamatório exacerbado causado pela infecção por *Plasmodium* está relacionado ao agravamento da doença e mortalidade. O grupo Pb+DMSO apresentou uma importante leucocitose no 15^o dpi, que foi prevenida nos grupos tratados com DHA ou DHA+AAS. Como consequência do aumento exacerbado de leucócitos circulantes, os animais infectados mantiveram aumento da celularidade total e diferencial no tecido pulmonar. Além disso, notou-se também grande quantidade de pigmento malárico nos animais não tratados com DHA, além da interação de leucócitos com o endotélio pulmonar.

Tais observações foram previamente descritas na infecção com *P. berghei* NK65, onde a presença de hemozoína em diferentes modelos experimentais de malária foi positivamente correlacionada com maior expressão de mRNA para TNF- α , IL-10 e MCP-1 no BALF e no homogenato pulmonar [154]. Assim, podemos inferir que o aumento da mortalidade observadas nos animais não-tratados ou tratados com AAS pode ser atribuída à piora da lesão pulmonar. Nesse contexto, é importante ressaltar que os animais tratados com AAS apresentavam hemorragia mais pronunciada no tecido pulmonar, além de áreas de obstrução da microvasculatura por leucócitos contendo hemozoína e hemácias infectadas. Uma hipótese que pode ser atribuída a piora após o tratamento com AAS se refere aos seus efeitos associados à inibição plaquetária e a relação da atividade das plaquetas com a eliminação do parasita no organismo, proposta por McMorran e colegas [65].

O desenvolvimento da infecção levou a uma piora das alterações histológicas no fígado no 15º dpi. Um estudo clássico realizado com *P. yoleii* 17X indica a heterogeneidade de tamanho do fígado em relação aos animais controle, além de um número maior células circulantes com marcação positiva para F4/80 nos sinusoides, que se encontravam dilatados, presença aumentada de aglomerados celulares. Também se notou a presença perinuclear de pigmento malárico e debris de fagocitose, e hemácias aderidas nos espaços sinusoidais [171]. Outro achado neste estudo foi a presença reduzida de infiltrados periportais e escassez de células F4/80⁺ nesses espaços. Novamente, as alterações hepáticas causadas pela infecção por *P. berghei* NK65 foram marcadas pela presença de leucócitos aderidos em veias centrais e nos espaços sinusoidais, havendo pouca ou nenhuma interação destes com o endotélio da veia porta. Além disso, a presença de pigmento malárico se tornou mais pronunciada em relação ao dia 9 de infecção, em especial nos grupos não-tratado e no tratado apenas com AAS, indicando que a DHA poderia estar atenuando a lesão hepática decorrente da infecção. De fato, as alterações decorrentes da infecção por *Plasmodium* em humanos são revertidas após o tratamento com antimalárico [166], o que corrobora os achados observados no grupo tratado com DHA sozinho ou associado ao AAS.

Os aglomerados celulares observados nos animais infectados eram compostos majoritariamente por linfócitos maduros. Entretanto, nos animais tratados com DHA sozinho ou associado ao AAS, estes focos possuíam maior heterogeneidade celular e, apesar de se apresentarem de forma mais rara que em animais não-tratados, foram observadas células progenitoras eritroides nesses nichos. O fígado fetal conhecidamente relacionado à eritropoiese, que cessa ao nascimento. Apesar do fígado adulto não possui essa propriedade, tal fenômeno foi reportado em modelo experimental de malária por *P. yoleii* 17XL [175]. Nesse modelo foram observadas o aumento de eritropoietina no plasma, além da presença de células TER119⁺, marcador de eritoide, no fígado a partir do 14º dpi [176]. A eritropoiese é um processo essencial e altamente regulado que mantém a produção diária de hemácias de forma a manter a homeostase na entrega de oxigênio aos tecidos. Em condições de estresse como a anemia / hipóxia, a eritropoiese pode ser desencadeada em órgãos além da medula. Em camundongos, a eritropoiese extramedular em resposta à anemia ocorre principalmente no baço, mas também é relatada no fígado [177]. Assim, os progenitores eritroides encontrados nos animais

infectados poderiam estar relacionados a uma resposta compensatória do organismo à anemia ocasionada pela malária.

Os resultados obtidos até então demonstram que: 1) a infecção por *P. berghei* NK65 é capaz de causar edema pulmonar e piora na função respiratória, evidenciada pelo aumento da EsT,L, Δ P2 a partir do 8º dpi em camundongos C57BL/6; 2) A infecção por *P. berghei* NK65 causa: alterações na função hepática e acúmulo de células mononucleares nos sinusoides, formação de agregados linfocitários no parênquima hepático, acúmulo de pigmento malárico em medula óssea, mas não interfere na função renal ou permeabilidade da BHE; 3) O tratamento com DHA melhora a sobrevida, reduz EsT,L, Δ P2 em D9, atenua lesões hepáticas, a anemia e leucocitose em D15; 4) O tratamento com AAS modula a migração de células mononucleares para o tecido pulmonar e BALF, possivelmente devido à redução dos níveis de MCP-1 no BALF, apesar de manter as alterações da mecânica respiratória e a permeabilidade da barreira alvéolo-capilar e aumentar a mortalidade no presente modelo.

7. Conclusões

A infecção por *P. berghei* NK65 leva a um comprometimento funcional pulmonar a partir do 8º dpi, que pode ser atribuído ao espessamento de septo alveolar, edema alveolar e infiltrado inflamatório, também observado em pacientes com complicações pulmonares. Os animais infectados também apresentam alterações hepáticas, havendo importante interação de leucócitos com o endotélio de veia central, além de hiperplasia de células de Kupffer, presença abundante de pigmento malárico, além de aumento de aspartato-aminotransferase. O tratamento com DHA solubilizada em DMSO possui melhor eficácia em relação às outras formas de solubilização descritas na literatura. Nesse contexto, a DHA aumenta a sobrevivência, reduz a elastância pulmonar, a pressão viscoelástica e a contagem de células mononucleares no tecido pulmonar, apesar dos níveis de MCP-1 no BALF não reduzirem em D9.

Adicionalmente, apesar de não haver mudanças contundentes no fígado e nos níveis de aspartato-aminotransferase em D9, o tratamento com a DHA parece atenuar a lesão hepática no 15º dpi, além de levar a presença eventual de células progenitoras eritroides no fígado. Somada a presença mais discreta de pigmento malárico na medula óssea 24h após o tratamento com a DHA, sugere-se que a DHA possua um efeito imunomodulatório no modelo usado. Tais dados são qualitativos e necessitam de confirmação através de análises quantitativas por imunomarcação e técnicas de biologia molecular.

Em relação ao tratamento com AAS, nossos resultados sugerem uma modulação do processo inflamatório pulmonar pela redução dos níveis de MCP-1 e de infiltrado de células mononucleares no tecido pulmonar nas primeiras 24 horas de tratamento. No entanto, o AAS não impede a perda da integridade da barreira alvéolo capilar, e leva a um aumento da elastância pulmonar em relação ao grupo tratado com a DHA. Ademais, os animais sobreviventes apresentam importantes focos de hemorragia no tecido pulmonar, e obstrução vascular por leucócitos, além de piora da lesão hepática, indicando que os efeitos inicialmente observados com o AAS são transientes.

Assim, os resultados obtidos nos permitem sugerir que o AAS possui efeito deletério na malária pulmonar. Desta forma, a utilização de AAS deve ser contraindicado em casos confirmados de malária.

A fim de elucidar os mecanismos relacionados ao efeito deletério do AAS na malária pulmonar, temos como perspectivas:

- Analisar os níveis de MCP-1 e MIP-1 α e IL-1 β no homogenato pulmonar e plasma;
- Analisar os níveis de tromboxano b2 no plasma;
- Investigar as subpopulações de macrófagos no tecido pulmonar por citometria de fluxo;
- Investigar o efeito do AAS na inibição da ativação plaquetária por imunohistoquímica para CD62p e fator de von Willebrand.

8. Referências

1. Caminade C, Kovats S, Rocklov J, Tompkins AM, Morse AP, Cólón-González FJ, et al. Impact of climate change on global malaria distribution. PNAS. 2014;111(9):3286–91.
2. Feachem RGA, Phillips AA, Hwang J, Cotter C, Wielgosz B, Greenwood B M, et al. Shrinking the malaria map: progress and prospects. The Lancet. 2010;376(9752):1566–1578.
3. Rossati A, Bargiacchi O, Kroumova V, Zaramella M, Caputo A, Garavelli PL. Climate, environment and transmission of malaria. Le Infezioni in Medicina. 2016;(2):93-104.
4. Dasgupta S. Burden of climate change on malaria mortality. International Journal of Hygiene and Environmental Health. 2018;221(5):782–791.
5. Sachs J, Malaney P. The economic and social burden of malaria. Nature. 2002;415(6872):680–685.
6. Tanner M, Savigni D, Malaria eradication back on the table. Bulletin of the World Health Organization. 2008 feb;86(2):82-3.
7. Holmes KK, Bertozzi S, Bloom B, Jha P. Major Infectious Diseases. Disease Control Priorities, third edition, volume 6. 2017. Washington, DC: World Bank. doi:10.1596/978-1-4648-0524-0. License: Creative Commons Attribution CC BY 3.0 IGO
8. World Malaria Report 2016. Geneva: World Health Organization; 2016. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
9. World Malaria Report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
10. Yanow SK, Gavina K, Gnidehou S, Maestre A. Impact of Malaria in Pregnancy as Latin America Approaches Elimination. Trends in Parasitology. 2016;32(5), 416–427.
11. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Actualización Epidemiológica: Aumento de malaria en las Américas. Washington, D.C. OPS/OMS. 2018 enero 30.
12. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da malária. Ministério da Saúde. 2018 ago 30. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/agosto/30/3.%20c%20-%20malaria CIT 30 ago 2018 cassiopeterka.pdf>
13. Sistema de Informações Hospitalares do SUS. Disponível em: <http://datasus.saude.gov.br/>
14. Sistema de Informações Sobre Mortalidade. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sim/cnv/obt10uf.def>
15. A framework for malaria elimination. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
16. Rubert A, Guillon-Grammatico L, Chandénier J, Dimier-Poisson I, Desoubeaux G. Résistance aux insecticides chez le moustique anophèle: des obstacles en plus dans la lutte antipaludique. Med Sante Trop. 2016;26:423-431.

17. Carlos BC, Rona LDP, Christophides GK, Souza-Neto J. A comprehensive analysis of malaria transmission in Brazil. *Pathogens and Global health*. 2019;113(1):1-13.
18. Sougoufara S, Doucouré S, Sembéne PMB, Harry M, Sohkna C. Challenges for malaria vector control in sub-Saharan Africa: Resistance and behavioral adaptations in *Anopheles* populations. *J Vector Borne Dis*. 2017 mar; 54:4–15.
19. Marinho-e-Silva M, Sallum MAM, Rosa-Freitas MG, Lourenço-de-Oliveira R, Silva-do-Nascimento TF. Anophelines species and the receptivity and vulnerability to malaria transmission in the Pantanal wetlands, Central Brazil, Mem Inst Oswaldo Cruz. 2018 feb; 113(2): 87-95.
20. Githeko, A. Malaria, Climate Change and Possible Impacts on Populations in Africa. In *International Studies in Population. HIV Resurgent Infections and Population Change in Africa*. (M. Carael, and J. R. Glynn, Eds.) New York, NY: Springer. 2008.
21. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolo OA, Dondorp AM. Malaria. *Lancet*. 2014 fev.; 383(9918):723–35.
22. Singh B, Sung LK, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *The Lancet*. 2014;363(9414):1017–1024
23. Brasil P, Zalis MG, Pina-Costa A, Siqueira AM, Bianco Júnior C, Silva S, et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: A molecular epidemiological investigation. *The Lancet Global Health*, v.5, n. 10, e1038–e1046, out. 2017.
24. Antinori S, Galimberti L, Milazzo L, Corbellino M. Biology of Human Malaria Plasmodia Including *Plasmodium Knowlesi*. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2012;4(1):e2012013.
25. Gueirard P, Tavares J, Thiberge S, Bernex F, Ishino T, Milon G, Franke–Fayard B, Janse CJ, Ménard R, Amino R. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *PNAS* 2010;107(43):18640–18645.
26. Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. Malaria: Biology and Disease. *Cell*. 2016;167(3):610–624.
27. Gilles HM. Bruce-Chwatt's Essential Malariology. (Gilles, H.M. and Warrell, D.A., eds) pp. 12–34, Edward Arnold. 1993.
28. Garnham PCC. Malaria: Principles and Practice of Malariology. (Wernsdorfer, W.H. and McGregor, I., eds) pp. 61–96, Churchill Livingstone. 1988.
29. Gaur D, Chitnis CE. Molecular interactions and signaling mechanisms during erythrocyte invasion by malaria parasites. *Current Opinion in Microbiology*. 2011,14:422–428
30. Nganou-Makamdop K, Sauerwein RW. Liver or blood-stage arrest during malaria sporozoite immunization: the later the better? *Trends in parasitology*, 2013 jun; 29(6)304–10.
31. Tatem AJ, Smith DL, Gething PW, Kabaria CW, Snow RW, Hay SI. Ranking of elimination feasibility between malaria-endemic countries. *The Lancet*. 2010;376(9752):1579–1591.

32. Beeson JG, Drew DR, Boyle MJ, Feng G, Fowkes FJI, Richards JS. Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. *FEMS Microbiology Reviews* 2016; 40(3):343-72.
33. Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nature Reviews Immunology*. 2005 set; 5:722-735.
34. Grau GER, Craig AG. Cerebral malaria pathogenesis: revisiting parasite and host contributions. *Future Microbiology*. 2012;7(2):291–302.
35. Crompton PD, Moebius J, Portugal S, Waisberg M, Hart G, Garver LS, et al. Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:157–187.
36. Ashley EA, Phyto AP, Woodrow CJ. Malaria. *Lancet*. 2018 april; 391:1608–21.
37. Moreno-Pérez DA, Ruíz JA, Patarroyo MA. Reticulocytes: *Plasmodium vivax* target cells. *Biology of the Cell*. 2013;105(6):251–260.
38. Chitnis CE, Sharma A. Targeting the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein. *Trends in Parasitology*. 2008;24(1), 29–34.
39. Moreno-Perez DA, Baquero LA, Chitiva-Ardila DM, Patarroyo MA. Characterising PvRBSA: an exclusive protein from *Plasmodium* species infecting reticulocytes. *Parasites & Vectors*. 2017;10:243.
40. Rowe JA, Moulds JM, Newbold CI, Miller LH. *P. falciparum* rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. *Nature*. 1997;388(6639):292–295.
41. Scholander C, Treutiger CJ, Hultenby K, Wahlgren M. Novel fibrillar structure confers adhesive property to malaria-infected erythrocytes. *Nat Med*. 1996 Feb;2(2):204-8.
42. Vigan-Womas I, Guillotte M, Juillerat A, Hessel A, Raynal B, England P, et al. Structural Basis for the ABO Blood-Group Dependence of *Plasmodium falciparum* Rosetting. *PLoS Pathog*. 2012;8(7):e1002781.
43. Cserti-Gazdewich CM, Mayr WR, Dzik WH. *Plasmodium falciparum* malaria and the immunogenetics of ABO, HLA, and CD36 (platelet glycoprotein IV). *Vox Sanguinis*. 2011;100:99–111.
44. Wassmer SC, Lepolard C, Traore B, Pouvelle B, Gysin J, Grau GE. Platelets reorient *Plasmodium falciparum*- infected erythrocyte cytoadhesion to activated endothelial cells. *J Infect Dis*. 2004;189:180–189.
45. Bridges DJ, Bunn J, van Mourik JA, Grau G, Preston RJS, Molyneux M, et al. Rapid activation of endothelial cells enables *Plasmodium falciparum* adhesion to platelet-decorated von Willebrand factor strings. *Blood*. 2010;115:1472–1474.
46. Arrighi RBG, Faye I. *Plasmodium falciparum* GPI toxin: A common foe for man and mosquito. *Acta Tropica*. 2010;114(3):162–165.
47. Soni R, Sharma D, Rai P, Sharma B, Bhatt TK. Signaling Strategies of Malaria Parasite for Its Survival, Proliferation, and Infection during Erythrocytic Stage. *Front. Immunol*. 2017;8:349.
48. Gowda DC. TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs. *Trends in Parasitology*. 2007;23(12):596–604.

49. Coban C, Ishii KJ, Horii T, Akira S. Manipulation of host innate immune responses by the malaria parasite. *Trends in Microbiology*. 2007;15(6):271–278.
50. Egan TJ. Haemozoin formation. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2008;157(2):127–136.
51. Banerjee R, Liu J, Beatty W, Pelosof L, Klemba M, Goldberg DE. Four plasmepsins are active in the *Plasmodium falciparum* food vacuole, including a protease with an active-site histidine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:990–5.
52. Rosenthal P, Sijwali P, Singh A, Shenai B. Cysteine Proteases of Malaria Parasites: Targets for Chemotherapy. *Current Pharmaceutical Design*. 2002; 8(18):1659–1672.
53. Krugliak M, Zhang J, Ginsburg H. Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* utilizes only a fraction of the amino acids derived from the digestion of host cell cytosol for the biosynthesis of its proteins. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2002;119(2):249–256.
54. Vincent SH, Grady RW, Shaklai N, Snider JM, Muller-Eberhard U. The influence of heme-binding proteins in heme-catalyzed oxidations. *Arch Biochem Biophys*. 1988;265(2):539–550.
55. Ryter SW, Tyrrell RM. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000;28(2):289–309.
56. Dutra FF, Bozza MT. Heme on innate immunity and inflammation. *Frontiers in pharmacology*. 2014 may;5(115).
57. Monteiro APT, Pinheiro CS, Luna-Gomes T, Alves LR, Maya-Monteiro CM, Porto BN, et al. Leukotriene B4 Mediates Neutrophil Migration Induced by Heme. *J Immunol*. 2011 June; 186(11):6562–6567.
58. Chua CLL, Brown G, Hamilton JA, Rogerson S, Boeuf P. Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology? *Trends in Parasitology*. 2013;29(1):26–34.
59. Aitman TJ, Cooper LD, Norsworthy PJ, Wahid FN, Gray JK, Curtis BR, et al. Malaria susceptibility and CD36 mutation. *Nature*. 2000;405(6790):1015–1016.
60. Silver KL, Higgins SJ, McDonald CR, Kain KC. Complement driven innate immune response to malaria: fuelling severe malarial disease. *Cellular Microbiology*. 2010;12(8):1036–1045.
61. Patel SN, Berghout J, Lovegrove FE, Ayi K, Conroy A, Serghides L, et al. C5 deficiency and C5a or C5aR blockade protects against cerebral malaria. *J Exp Med*. 2008;205:1133–1143.
62. Giribaldi G, Prato M, Ulliers D, Gallo V, Schwarzer E, Akide-Ndunge OB, et al. Involvement of inflammatory chemokines in survival of human monocytes fed with malarial pigment. *Infect. Immun*. 2010;78, 4912–4921.
63. Bujila I, Schwarzer E, Skorokhod O, Weidner JM, Troye-Blomberg M, Farrants AKÖ. Malaria-derived hemozoin exerts early modulatory effects on the phenotype and maturation of human dendritic cells. *Cellular Microbiology*. 2016;18(3):413–423.
64. Grau GE, Mackenzie CD, Carr RA, Redard M, Pizzolato G, Allasia C, et al. Platelet Accumulation in Brain Microvessels in Fatal Pediatric Cerebral Malaria. *The Journal of Infectious Diseases*. 2003;187(3):461–466.

65. McMorran BJ, Marshall VM, Graaf C, Drysdale KE, Shabbar M, Smyth GK. Platelets Kill Intraerythrocytic Malarial Parasites and Mediate Survival to Infection. *Science*. 2009 Feb;323:797–800.
66. O'Sullivan JM, O'Donnell JS. Platelets in malaria pathogenesis. *Blood*. 2018;132(12):1222-1224.
67. Kho S, Barber BE, Johar E, Andries B, Poespoprodjo JR, Kenangalem E, et al. Platelets kill circulating parasites of all major Plasmodium species in human malaria. *Blood*. 2018;05–849307.
68. Morrell CN. Understanding platelets in malaria infection. *Curr Opin Hematol*. 2014;21(5):445-449.
69. Fletcher TE, Beeching NJ. Malaria. *Journal of the Royal Army Medical Corps*. 2013 set; 59(3):158–66.
70. Taylor WRJ, Hanson J, Turner GDH, White NJ, Dondorp AM. Respiratory Manifestations of Malaria. *Chest*. 2012; 142(2):492–505.
71. Phillips MA, Burrows JN, Manyando C, van Huijsduijnen RH, Van Voorhis WC, Wells TNC. Malaria. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017 aug; 3(17050).
72. Gazzinelli RT, Kalantari P, Fitzgerald K, Golenbock DT. Innate sensing of malaria parasites. *Nature Reviews Immunology*. 2014 Nov;14(11):744-57.
73. Van Den Steen PE, Deroost K, Deckers J, Van Herck E, Struyf S, Opdenakker G. Pathogenesis of malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *Trends in parasitology*. 2013 jul;29(7):346–58.
74. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. Second edition. World Health Organization; 2010.
75. Scaccabarozzi D, et al. Differential induction of malaria liver pathology in mice infected with Plasmodium chabaudi AS or Plasmodium berghei NK65. *Malar J* 2018; 17(1):18.
76. The ARDS Definition Task Force. Acute Respiratory Distress Syndrome: The Berlin Definition. *JAMA*. 2012;307(23):2526-2533.
77. Pierrakos C, Karanikolas M, Scolletta S, Karamouzou V, Velissaris D. Acute respiratory distress syndrome: pathophysiology and therapeutic options. *Journal of clinical medicine research*. 2011;4(1):7-16.
78. Aschner Y, Zemans RL, Yamashita CM, Downey GPI. Matrix metalloproteinases and protein tyrosine kinases: potential novel targets in acute lung injury and ARDS. *Chest*. 2014;146(4):1081–1091.
79. Aitken EH, Negri EM, Barbosa R, Lima MRI, Álvarez JM, Marinho CRF, et al. Ultrastructure of the lung in a murine model of malaria-associated acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Malaria journal*. 2014 jan;13(230).
80. 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. *PloS ONE*. 2017; 12(7): e0181674
81. Fanelli V, Ranieri VM. Mechanisms and clinical consequences of acute lung injury. *Ann Am Thorac Soc*. 2015; 12 Suppl 1:S3-8. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico nº 12. Descrição do processo de monitoramento dos testes de diagnóstico rápido de malária, Brasil, 2014 a 2016. 2019 mar;50(12).

82. Organização Mundial da Saúde. Estratégia técnica mundial para o paludismo 2016 - 2030. Disponível em:
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/176712/9789248564994_por.pdf;jsessionid=D8668A82476E91B4665CD5325A3B0E0F?sequence=6
83. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. Third edition 2015. WHO Press, Geneva
84. Mohan A, Sharma SK, Bollineni S. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in malaria. *J Vector Borne Dis.* 2008 Sep; 45:179–193.
85. Ho WE, Yong H, Khee T, Wong WSF. Pharmacology & Therapeutics Artemisinins: Pharmacological actions beyond anti-malarial. *Pharmacology and Therapeutics.* 2014;142:126–139.
86. Ding XC, Beck HP, Raso G. *Plasmodium* sensitivity to artemisinins: magic bullets hit elusive targets. *Trends in Parasitology.* 2011;27(2):73–81.
87. Mbengue A, Bhattacharjee S, Pandharkar T, Liu H, Estiu G, Stahelin RV, et al. A molecular mechanism of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature.* 2015 April 30; 520(7549): 683–687.
88. Warner TD, Mitchell JA. Cyclooxygenase-3 (COX-3): Filling in the gaps toward a COX continuum? *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2002;99(21):13371–13373.
89. Sweeny JM, Gorog DA, Fuster V. Antiplatelet drug “resistance”. Part 1: Mechanisms and clinical measurements. *Nature Reviews Cardiology.* 2009;(4):273–282.
90. Awtry EH, Loscalzo J. Aspirin. *Circulation* 2000; 101: 1206–18.
91. Benedek IH, Joshi AS, Pieniaszek HJ, King SY, Kornhauser DM. Variability in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of low dose aspirin in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol* 1995; 35: 1181–86.
92. Hussain M, Javeed A, Ashraf M, Zhao Y, Mukhtar MM, Rehman MU. Aspirin and immune system. *International immunopharmacology.* 2012 jan;12(1)10–20.
93. Greenbaum DC, Fitzgerald GA. Platelets, Pyrexia, and Plasmodia. *The new England journal of medicine.* 2009;361(5):526-8.
94. Srivastava K, Cockburn IA, Swaim AM, Thompson LE, Tripathi A, Fletcher CA, et al. Platelet Factor 4 Mediates Inflammation in Cerebral Malaria. *Cell Host Microbe.* 2008 Aug;4(2):179–187.
95. Ibanez B, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2018 Jan;39(2):119-177.
96. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Manual de rotinas para atenção ao AVC / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2013. 50 p.: il.
97. World Health Organization. 20th Essential Medicines List (2017). Disponível em:
https://www.who.int/medicines/news/2017/20th_essential_med-list/en/

98. Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nature Reviews Immunology*. 2004;4:169-80.
99. Fortin A, Stevenson MM, Gros P. Susceptibility to malaria as a complex trait: big pressure from a tiny creature. *Human Molecular Genetics*. 2002;11(20):2469–2478.
100. Rao A, Kumar MK, Joseph T, Bulusu G. Cerebral malaria: insights from host-parasite protein-protein interactions. *Malar J*. 2010 Jun ;9:155.
101. Shear HL, Marino MW, Wanidworanun C, Berman JW, Nagel RL. Correlation of increased expression of intercellular adhesion molecule-1, but not high levels of tumor necrosis factor-alpha, with lethality of *Plasmodium yoelii* 17XL, a rodent model of cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 1998 Dec;59(6):852-8.
102. Chandra R, Puri SK. Arteether resistance reversal by ketoconazole/fluconazole in rodent malaria parasite *Plasmodium vinckei*. *Parasitology Research*. 2015;114(3):1239–1243.
103. Hunt NH, Grau GE. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends in Immunology* 2003;24(9):491–499.
104. Reis PA, Estado V, Silva TI, Avila JC, Siqueira LD, Assis EF et al. Statins Decrease Neuroinflammation and Prevent Cognitive Impairment after Cerebral Malaria. *PLoS Pathog*. 2012;8(12): e1003099
105. Hall N, Karras M, Raine JD, Kooij TWA, Florens L, Janssen CS, et. Al. A Comprehensive Survey of the Plasmodium Life Cycle by Genomic, Berriman M, Transcriptomic, and Proteomic Analyses. *Science*. 2005;307(5706):82–86.
106. Pádua TA, Torres ND, Candéa ALP, Costa MFS, Silva JD, Silva-Filho JL, et al. Therapeutic effect of Lipoxin A4 in malaria-induced acute lung injury. *J Leukoc Biol*. 2018;1–14.
107. De Azevedo-Quintanilha IG, Abreu AV, Ferreira AC, Nascimento DO, Siqueira AM, Campbell RA, et al. Integrin α D β 2 (CD11d / CD18) mediates experimental malaria-associated acute respiratory distress syndrome (MA-ARDS). *Malaria Journal*. 2016; doi: 10.1186/s12936-016-1447-7
108. Epiphanyo S, Campos MG, Pamplona A, Carapau D, Pena AC, Ataíde R, et al. VEGF promotes malaria-associated acute lung injury in Mice. *PLoS Pathogens*. 2010;6:e1000916.
109. Valecha N, Pinto RGW, Turner GDH, Kumar A, Rodrigues S, Dubhashi NG, et al. Case Report: Histopathology of Fatal Respiratory Distress Caused by *Plasmodium vivax* Malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2009;81(5):758–762.
110. Van Den Steen PE, Geurts N, Deroost K, Van Aelst I, Verhenne S, Heremans H, et al. Immunopathology and dexamethasone therapy in a new model for malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2010; 181:957–968.
111. Jain A, Kaushik R, Kaushik RM. Malarial hepatopathy: clinical profile and association with other malarial complications. *Acta Trop*. 2016; 159:95–105
112. Jiang L, Meng D, Lee S, Liu S, Xu Q, Wang Y. Dihydroartemisinin inhibits catabolism in rat chondrocytes by activating autophagy via inhibition of the NF- κ B pathway. *Scientific Reports*. 2016; 6:38979

113. Xu H, He Y, Yang X, Liang L, Zhan Z, Ye Y, et al. Anti-malarial agent artesunate inhibits TNF- α -induced production of proinflammatory cytokines via inhibition of NF- κ B and PI3 kinase / Akt signal pathway in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology*. 2007;46:920–926
114. Cheng MP, Yansouni CP. Management of severe malaria in the intensive care unit. *Crit Care Clin*. 2013;29(4):865-85.
115. Charoenpan P, Indraprasit S, Kiatboonsri S, Suvachittanont O, Tanomsup S. Pulmonary edema in severe falciparum malaria. Hemodynamic study and clinicophysiological correlation. *Chest*. 1990;97(5):1190-7.
116. Maguire GP, Handojo T, Pain MC, Kenangalem E, Price RN, Tjitra E, Anstey NM. Lung injury in uncomplicated and severe falciparum malaria: a longitudinal study in papua, Indonesia. *J Infect Dis*. 2005;192(11):1966-74.
117. Dormoi J, Briolant S, Pascual A, Desgrouas C, Travaill e C, Pradines B. Improvement of the efficacy of dihydroartemisinin with atorvastatin in an experimental cerebral malaria murine model. *Malaria Journal*. 2013; doi: 10.1186/1475-2875-12-302
118. Aggrey AA, Srivastava K, Ture S, Field DJ, Morrell CN. Platelet Induction of the Acute-Phase Response Is Protective in Murine Experimental Cerebral Malaria. *J Immunol* 2013;190:4685-4691.
119. Saldiva PH, Zin WA, Santos RL, et al: Alveolar pressure measurement in open-chest rats. *J Appl Physiol*. 1992; doi: 10.1152/jappl.1992.72.1.302
120. Kochi T, Okubo S, Zin WA, Milic-Emili J. Chest wall and respiratory system mechanics in cats: effects of flow and volume. *J Appl Physiol*. 1988a; 64 (6): 2636-46.
121. Kochi T, Okubo S, Zin WA, Milic-Emili J. Flow and volume dependence of pulmonary mechanics in anesthetized cats. *J Appl Physiol*. 1988b; 64 (1): 441-50.
122. Mortola JP, Noworaj A. Two-sidearm tracheal cannula for respiratory airflow measurements in small animals. *J Appl Physiol*, 1983;55(1 Pt 1):250-3.
123. Chang HK, Mortola JP. Fluid dynamic factors in tracheal pressure measurement. *J Appl Physiol*, 1981;51(1):218-25.
124. Loring SH, Mead J. Action of the diaphragm on the rib cage inferred from a forcebalance analysis. *J Appl Physiol*, 1982;53(3):756-60.
125. Bates JH, Decramer M, Chartrand D, Zin WA, Boddener A, Milic-Emili J. Volume-time profile during relaxed expiration in the normal dog. *J Appl Physiol*, 1985a;59(3):732-7.
126. Bates JH, Rossi, Milic-Emili J. Analysis of the behavior of the respiratory system with constant inspiratory flow. *J Appl Physiol*, 1985b;58(6):1840-8.
127. Bates JH, Ludwig MS, Sly PD, Brown K, Martin JG, Fredberg JJ. Interrupter resistance elucidated by alveolar pressure measurement in open-chest normal dogs. *J Appl Physiol*, 1988;65(1):408-14.
128. Weibel ER. Morphometry: stereological theory and practical methods. In: Dekker GJNY, ed. *Models of Lung Disease-Microscopy and Structural Methods* 1990:199-247.
129. Peterson BT, Brooks JA, Zack AG: Use of microwave oven for determination of postmortem water volume of lungs. *J Appl Physiol* 1982, 52:1661-1663.

130. Gibbons PL, Batty KT, Barrett PHR, Davis TME, Ilett KF. Development of a pharmacodynamic model of murine malaria and antimalarial treatment with dihydroartemisinin. *International Journal for Parasitology*. 2007;37:1569–1576
131. Patel K, Batty KT, Moore BR, Gibbons PL, Bulitta JT, Kirkpatrick CM. Mechanism-based model of parasite growth and dihydroartemisinin pharmacodynamics in murine malaria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(1):508-16.
132. Jia L, Song Q, Zhou C, Li X, Pi L, Ma X, Li H. Dihydroartemisinin as a Putative STAT3 Inhibitor, Suppresses the Growth of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma by Targeting Jak2/STAT3 Signaling. *PLoS ONE*. 2016; 11(1): e0147157.
133. Zhou L, Liu Q, Yang M, Wang T, Yao J, et al. Dihydroartemisinin, an Anti-Malaria Drug, Suppresses Estrogen Deficiency-Induced Osteoporosis, Osteoclast Formation, and RANKL-Induced Signaling Pathways. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2016;31(5):964–974
134. Mullié C, Taudon N, Degrouas C, Jonet A, Agnamey P, Sonnet P. Enantiomerically pure amino-alcohol quinolines: in vitro anti-malarial activity in combination with dihydroartemisinin, cytotoxicity and in vivo efficacy in a *Plasmodium berghei* mouse model *Malar J*. 2014 Oct 16;13:407.
135. Thumwood CM, Hunt NH, Clark IA, Cowden WB. Breakdown of the blood-brain barrier in murine cerebral malaria. *Parasitology*. 1988; 96:579–89.
136. Silva JD, Lopes-Pacheco M, Paz AHR, Cruz FF, Melo EB, de Oliveira MV, et al. Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue, and Lung Tissue Differentially Mitigate Lung and Distal Organ Damage in Experimental Acute Respiratory Distress Syndrome. *Critical Care Medicine*. 2017;46(2):e132-e140
137. Maron-Gutierrez T, Silva JD, Asensi KD, Bakker-Abreu I, Shan Y, Diaz BL et al. Effects of Mesenchymal Stem Cell Therapy on the Time Course of Pulmonary Remodeling Depend on the Etiology of Lung Injury in Mice. *Critical Care Medicine*. 2013;(41)11319-333.
138. Moore BR, Jago JD, Batty KT. *Plasmodium berghei*: Parasite clearance after treatment with dihydroartemisinin in an asplenic murine malaria model. *Experimental Parasitology*. 2008; 118:458–467
139. Han F, Lee I. Microbial transformation of the antimalarial sesquiterpene endoperoxide dihydroartemisinin endoperoxide dihydroartemisinin. *Natural Product Research*. 2016; 31(8):883-889
140. Haynes RK, Chan H, Lung C, Ng N, Wong H, Shek Y, et al. Artesunate and Dihydroartemisinin (DHA): Unusual Decomposition Products Formed under Mild Conditions and Comments on the Fitness of DHA as an Antimalarial Drug. *Chem. Med. Chem*. 2007; 2:1448 – 1463
141. Batty KT, Gibbons PL, Davis TME, Ilett KF. Short Report: Pharmacokinetics of Dihydroartemisinin in a Murine Malaria Model. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2008; 78(4):641–642
142. Santos NC, Saldanha C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular and molecular aspects. *Biochemical Pharmacology*. 2003;65:1035–1041

143. Aizawa, H. Short communications: Morphology of polysorbate 80 (Tween 80) micelles in aqueous dimethyl sulfoxide solutions short communications. *J. Appl. Cryst.* 2010;43, 630–631
144. Pestel S, Martin H, Maier G, Guth B. Effect of commonly used vehicles on gastrointestinal, renal, and liver function in rats. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.* 2006;.54:200-214
145. Goodman RB, Strieter RM, Martin DP, Steinberg KP, Milberg JA, Maunder RJ, et al. Inflammatory Cytokines in Patients with Persistence of the Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996;154:202-211.
146. Narasaraju T, Yang E, Samy RP, Ng HH, Phoon MC, Rooijen NVan. Excessive Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps Contribute to Acute Lung Injury of Influenza Pneumonitis. *The American Journal of Pathology.* 2011; 179(1):199-210.
147. Lagassé HAD, Anidi, IU, Craig JM, Limjunyawong N, Poupore AK, Mitzner W, Scott AL. Recruited monocytes modulate malaria-induced lung injury through CD36-mediated clearance of sequestered infected erythrocytes. *J. Leukoc. Biol.* 2016; 99(5):659-71
148. Lovegrove FE, Gharib SA, Pen L, Hughes TR, et al. Parasite Burden and CD36-Mediated Sequestration Are Determinants of Acute Lung Injury in an Experimental Malaria Model. *PLoS Pathogens.* 2008; 16;4(5):e1000068.
149. De Oliveira-Marques V, Cyrne L, Marinho HS, Antunes F. A Quantitative Study of NF- κ B Activation by H₂O₂: Relevance in Inflammation and Synergy with TNF- α . *J Immunol.* 2007; 15;178(6):3893-902.
150. Röder-Stolinski C, Fischäder G, Oostingh GJ, Duschl A, Lehmann I, Carmen R, et al. Chlorobenzene Induces the NF- κ B and p38 MAP Kinase Pathways in Lung Epithelial Cells. *Inhalation Toxicology.* 2008; 20:813–820
151. Wang SJ, Cheng SZ., Yue HZ, Rui G, Chen H, Pan HJS, Bai DXX. (2011). Dihydroartemisinin inhibits angiogenesis in pancreatic cancer by targeting the NF-B pathway. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2011; 68:1421–1430
152. Newton PN, Barnes KI, Smith PJ, Evans AC, Chierakul W. The pharmacokinetics of intravenous artesunate in adults with severe falciparum malaria. *Eur J Clin Pharmacol.* 2006; 62:1003–1009
153. Deroost K, Tyberghein A, Lays N, Noppen S, Schwarzer E, Vanstreels E, et al. Hemozoin induces lung inflammation and correlates with malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* 2013; 11:166
154. Thawani N, Tam M, Bellemare MJ, Bohle DS, Olivier M, Souza JB et al. Plasmodium Products Contribute to Severe Malarial Anemia by Inhibiting Erythropoietin- Induced Proliferation of Erythroid Precursors. *The Journal of Infectious Diseases* 2014;209:140–9.
155. Angchaisuksiri P. Coagulopathy in malaria. *Thrombosis Research.* 2014;133:5–9.
156. Weyrich AS, Zimmerman GA Platelets in lung biology. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:569-91

157. Ashida N, Arai H, Yamasaki M, Kita T. Distinct signaling pathways for MCP-1-dependent integrin activation and chemotaxis. *J Biol Chem.* 2001 May 11;276(19):16555-60.
158. Weber C, Alon R, Moser B, Springer TA. Sequential regulation of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrin avidity by CC chemokines in monocytes: implications for transendothelial chemotaxis. *J Cell Biol.* 1996 Aug;134(4):1063-73.
159. Schwarzer, E, Kuhn H, Valente E, Arese P. Malaria-parasitized erythrocytes and hemozoin nonenzymatically generate large amounts of hydroxy fatty acids that inhibit monocyte functions. *Blood* 2003;101:722–728.
160. Jaramillo M, Plante I, Ouellet N, Vandal K, Tessier PA, Olivier M. Hemozoin-inducible proinflammatory events in vivo: potential role in malaria infection. *J. Immunol.* 2004;172, 3101–3110
161. Niewold P, Cohen A, van Vreden C, Getts DR, Grau GE, King NJC. Experimental severe malaria is resolved by targeting newly-identified monocyte subsets using immune-modifying particles combined with artesunate. *Communications Biology.*2018;1:227
162. Fuster N, Sweeny JM. Aspirin: A Historical and Contemporary Therapeutic Overview. *Circulation.* 2011;123:768-778.
163. Gregory TJ, Longmore WJ, Moxley MA, Whitsett JA, Reed CR, Fowler AA 3rd, Hudson LD, Maunder RJ, Crim C, Hyers TM. Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest,* 1991;88(6):1976-1981.
164. Harris JV, Bohr TM, Stracener C, Landmesser ME, Torres V, Mbugua A, et al. Sequential *Plasmodium chabaudi* and *Plasmodium berghei* infections provide a novel model of severe malarial anemia. *Infect Immun.* 2012 Sep;80(9):2997-3007.
165. Woodford J, Shanks GD, Griffin P, Chalon S, McCarthy JS. The Dynamics of Liver Function Test Abnormalities after Malaria Infection: A Retrospective Observational Study. *Am J Trop Med Hyg.* 2018 Apr;98(4):1113-1119.
166. Antoine DJ, Dear JW, Lewis PS, Platt V, Coyle J, Masson M, Thanacoody RH, Gray AJ, Webb DJ, Moggs JG, Bateman DN, Goldring CE, Park BK. Mechanistic biomarkers provide early and sensitive detection of acetaminophen-induced acute liver injury at first presentation to hospital. *Hepatology* 2013;58: 777–787.
167. Sukhbaatar N, Weichhart T. Iron Regulation: Macrophages in Control. *Pharmaceuticals* 2018; 14;11(4). pii: E137
168. Mourão LC, Roma PM, Sultane Aboobacar Jda S, Medeiros CM, de Almeida ZB, Fontes CJ, Agero U, de Mesquita ON, Bemquerer MP, Braga ÉM. Anti-erythrocyte antibodies may contribute to anaemia in *Plasmodium vivax* malaria by decreasing red blood cell deformability and increasing erythrophagocytosis. *Malar J.* 2016;15(1):397.
169. Srichaikul T, Panikbutr N, Jeumtrakul P. Bone-marrow changes in human malaria. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology.*1967;61(1), 40–51.
170. Lee SH, Crocker P, Gordon S. Macrophage plasma membrane and secretory properties in murine malaria. Effects of *Plasmodium yoelii* blood-stage infection on macrophages in liver, spleen, and blood. *J Exp Med.* 1986 Jan 1;163(1):54-74

171. Terkawi MA, Nishimura M, Furuoka H, Nishikawaa Y. Depletion of Phagocytic Cells during Nonlethal Plasmodium yoelii Infection Causes Severe Malaria Characterized by Acute Renal Failure in Mice. *Infect Immun* 84:845–855.
172. Radu M, Chernoff J. An in vivo assay to test blood vessel permeability. *J Vis Exp*. 2013 Mar 16;(73):e50062.
173. Waitumbi JN, Opollo MO, Muga RO, Misore AO, Stoute JA. Red cell surface changes and erythrophagocytosis in children with severe plasmodium falciparum anemia. *Blood*. 2000 Feb 15;95(4):1481-6.
174. Abo T, Sekikawa H. Extrathymic T cells in malaria protection, including evidence for the onset of erythropoiesis in the liver during infection. *Arch Histol Cytol*. 2002 Jun;65(2):127-32.
175. Halder RC, Abe T, Mannoor MK, Morshed SR, Ariyasinghe A, Watanabe H, Kawamura H, Sekikawa H, Hamada H, Nishiyama Y, Ishikawa H, Toba K, Abo T. Onset of hepatic erythropoiesis after malarial infection in mice. *Parasitol Int*. 2003 Dec;52(4):259-68.
176. Hom J, et al. The erythroblastic island as an emerging paradigm in the anemia of inflammation. *Immunol Res*. 2015; 63(0): 75–89.