

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



Manoella Santos de Borborema Fernandes

Estudo da evolução da malária (*Plasmodium berghei* ANKA) em ratas adultas grávidas e não grávidas: efeitos da infecção sobre o desenvolvimento pré-natal

Rio de Janeiro

2018

Manoella Santos de Borborema Fernandes

Estudo da evolução da malária (*Plasmodium berghei* ANKA) em ratas adultas grávidas e não grávidas: efeitos da infecção sobre o desenvolvimento pré-natal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública. Área de concentração: Abordagem Ecológica de Doenças Transmissíveis.

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgarten.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Ana Cecília Amado Xavier de Oliveira.

Rio de Janeiro

2018

Catálogo na fonte
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde
Biblioteca de Saúde Pública

F363e Fernandes, Manoella Santos de Borborema.
 Estudo da evolução da malária (*Plasmodium berghei* ANKA) em
 ratas adultas grávidas e não grávidas: efeitos da infecção sobre o
 desenvolvimento pré-natal / Manoella Santos de Borborema
 Fernandes. -- 2018.
 54 f. : il. color. ; graf. ; mapas ; tab.

 Orientador: Francisco José Roma Paumgarten.
 Coorientadora: Ana Cecília Amado Xavier de Oliveira.
 Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola
 Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2018.

 1. Malária. 2. Gravidez. 3. *Plasmodium Berghei*. 4. Ratos Wistar.
 5. Antimaláricos. 6. Parasitemia. 7. Primaquina. I. Título.

CDD – 23.ed. – 616.9362

Manoella Santos de Borborema Fernandes

Estudo da evolução da malária (*Plasmodium berghei* ANKA) em ratas adultas grávidas e não grávidas: efeitos da infecção sobre o desenvolvimento pré-natal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública. Área de concentração: Abordagem Ecológica de Doenças Transmissíveis.

Aprovada em: 29 de maio de 2018.

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Dalma Maria Banic
Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Davyson e Lima Moreira
Fundação Oswaldo Cruz – Farmanguinhos

Prof.^a Dr.^a Ana Cecilia Amado Xavier de Oliveira
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgarten (Orientador)
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Rio de Janeiro

2018

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me permitir essa oportunidade e por ter me sustentado e abençoado até aqui.

Agradeço também a minha família que sempre me apoiou em minhas decisões e pelo suporte e companhia nos finais de semana no laboratório.

Ao Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgarten, à Prof.^a Dr.^a Ana Cecília Amado Xavier de Oliveira e ao Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira pela orientação e pela confiança que me dedicaram.

À Hellen Leal e Rosângela Carvalho que foram meus braços direito e esquerdo durante os experimentos. A ajuda de vocês foi essencial para a conclusão desse estudo.

À minha amiga Danielle Carvalho pela ajuda com os cálculos, pelas palavras de incentivo e por seu ombro amigo.

Aos alunos de iniciação científica Iago e Gabriele pela ajuda nos experimentos.

E a toda equipe do laboratório de Toxicologia Ambiental pelos agradáveis momentos vividos.

RESUMO

A Malária é uma das mais devastadoras infecções parasitárias em regiões tropicais e subtropicais do planeta, onde ela causa centenas de milhares de mortes anualmente. No Brasil, a malária é endêmica na região Amazônica e Centro-Oeste, e é causada, predominantemente, por infecções com *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* transmitidas por mosquitos do gênero *Anopheles sp.* Crianças com menos de 5 anos, pessoas imunodeprimidas e gestantes que vivem em áreas endêmicas, são grupos da população que estão expostos a um alto risco de desenvolver um quadro clínico de malária de evolução grave e potencialmente letal. A malária durante a gravidez (ou malária placentária) também significa grande risco para o feto, e está associada a desfechos adversos da gravidez, como prematuridade, natimortos, baixo peso ao nascer e abortos. Modelos de malária durante a gravidez em roedores ou malária placentária são úteis para aprofundar a fisiopatologia desta forma clínica da doença, assim como para esclarecer como a infecção e a gravidez atuando conjuntamente alteram a cinética, o metabolismo e a distribuição de medicamentos antimaláricos. O objetivo deste estudo foi verificar se ratas grávidas são modelos experimentais úteis para estudar a malária placentária e investigar se e como a infecção e a gravidez alteram a cinética de fármacos antimaláricos. Ratos adultos (incluindo fêmeas não grávidas) são sabidamente resistentes à infecção com parasitas que causam malária em roedores. Espera-se, entretanto, que ratas grávidas sejam mais susceptíveis à infecção com *Plasmodium sp* que animais adultos machos e fêmeas não-grávidas. Se isto ocorrer, ratos poderiam constituir modelos experimentais em roedores muito convenientes para investigar os efeitos da malária e da gravidez sobre a cinética de fármacos. Nós comparamos o curso clínico da infecção com *P. berghei* ANKA em ratas Wistar grávidas (9-10 semanas de idade), jovens fêmeas (4 semanas de idade) e fêmeas adultas não grávidas (9-10 semanas de idade). Os resultados confirmaram que ratas adultas não grávidas são de fato resistentes à infecção com *P. berghei* ANKA enquanto as ratas grávidas e fêmeas jovens são susceptíveis. Os nossos resultados indicaram que ratas Wistar adultas grávidas infectadas com *P. berghei* (dia 7 de gestação) desenvolvem quadro de malária placentária semelhante ao notado em camundongos infectados, e constituem um modelo adequado para estudar os efeitos associados da infecção e gravidez sobre a farmacocinética de medicamentos antimaláricos.

Palavras-chave: Malária. Gravidez. *Plasmodium berghei* ANKA. Ratos Wistar. Antimaláricos.

ABSTRACT

Malaria is one of the most devastating parasitic infections in tropical and subtropical regions of the world where it causes hundreds of thousand deaths every year. In Brazil, malaria is endemic in the Amazon region and Western states where it is caused predominantly by *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* infections transmitted by *Anopheles sp* mosquitoes. Children under the age of 5 years, immunosuppressed people and pregnant women living in endemic areas are population groups at a high risk of having a severe and potentially life-threatening clinical evolution of malaria infection. Malaria in pregnancy (or placental malaria) also poses a great health risk to the unborn child, and is associated to poor pregnancy outcomes such as preterm births, stillbirth, low birth weight and abortion. Rodent models of malaria in pregnancy or placental malaria are useful to delve deep into the pathophysiology of this clinical form of the disease as well as to elucidate how infections and pregnancy acting together change the kinetics, metabolism and distribution of antimalarial drugs. The objective of this study was to verify whether pregnant rats are a useful rodent model of placental malaria to investigate if and how infection and pregnancy alter the kinetics of antimalarial drugs. Adult (non-pregnant) rats are known to be resistant to infection with rodent malaria parasites. Pregnant rats, however, are expected to be more susceptible than non-pregnant adult animals to infection with *Plasmodium* parasites. If so, rats would be a very suitable rodent model to investigate the effects of malaria and pregnancy on the drug kinetics. We compared the clinical course of infections with *P. berghei* ANKA in pregnant Wistar rats (9-10 week old), young female rats (4 week old) and adult non-pregnant females (9-10 week old). Results confirmed that adult non-pregnant female rats are indeed resistant to *P. berghei* ANKA infection, whereas pregnant and young female rats are susceptible. Our findings indicated that Wistar rats infected with *P. berghei* (on pregnancy day 7) develop a placental malaria similar to that noted in infected mice, and are a suitable model to study the combined effects of infection and pregnancy on the disposition of antimalarial drugs.

keyword: Malária. Pregnancy. *Plasmodium berghei* ANKA. Rats Wistar. Antimalarials.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição dos casos relatados de Malária pelo mundo no período do ano 2000 a 2016.....	12
Figura 2 -	Mapa de risco da Malária no Brasil.....	13
Figura 3 -	Ciclo de vida do <i>plasmodium</i> sp transmissor da Malária.....	15
Figura 4 -	Grupos experimentais do experimento III.....	23
Figura 5 -	Figura 5 - Experimento I: Evolução da taxa de parasitemia nas ratas jovens inoculadas (10^8 células parasitadas/rata, ip) com <i>P.berghei</i> ANKA.....	29
Figura 6 -	Figura 6 - Experimento II: Evolução da taxa de parasitemia das ratas que comprovadamente acasalaram (grávidas) e que foram inoculadas com <i>P. berguei</i> ANKA (10^8 células parasitadas/rata, ip) no dia 7 de gravidez (dia 7 após a comprovação da cópula).....	31
Figura 7 -	Filhote nascido da fêmea 3 (infectada com <i>P. berghei</i> ANKA) com sinais clínicos (palidez e pilo-ereção) de infecção e esfregaço sanguíneo, feito a partir de uma amostra de sangue do filhote.....	32
Figura 8 -	Figura 6 - Experimento II: Evolução da taxa de parasitemia das ratas que comprovadamente acasalaram (grávidas) e que foram inoculadas com <i>P. berguei</i> ANKA (10^8 células parasitadas/rata, ip) no dia 7 de gravidez (dia 7 após a comprovação da cópula).....	34
Figura 9 -	Figura 9 - Evolução da taxa de parasitemia (<i>P. berghei</i> ANKA) nas fêmeas grávidas (grupo GIV) que morreram antes do dia programado para eutanásia e naquelas que sobreviveram até o 21º dia de gestação.....	35
Figura 10 -	Comparação entre os pesos médio dos baços dos quatro grupos do experimento III.....	36
Figura 11 -	Peso dos baços das fêmeas do grupo IV (grávidas inoculadas com <i>P. berghei</i> no dia 7 de gestação) e que morreram antes do dia da eutanásia	36

	programada.....	
Figura 12 -	Comparação entre os tamanhos, cor e aspecto externo do baço e fígado normal, típico de ratas não infectadas, e o baço aumentado e fígado escurecido de uma rata grávida infectada com <i>P. berghei</i> ANKA por ocasião da eutanásia no dia 21 de gravidez.....	37
Figura 13 -	Comparação entre as médias (\pm DP) dos pesos dos fetos e das placentas das ratas gupos I (controle não inoculada) e IV (inoculadas com <i>P. berghei</i> ANKA no dia 7 de gravidez).....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Esquema dos experimentos preliminares (I e II) e principal (III).....	22
Tabela 2 -	Peso corporal e resultado do exame do sangue (% de hemácias parasitadas) no dia do desmame (dia 21 pós-natal) dos filhotes da fêmea 3 que havia sido infectada com <i>P.berghei</i> ANKA no dia 7 de gravidez.....	32
Tabela 3 -	Representação esquemática do desfecho da inoculação de <i>P. berghei</i> ANKA em ratas Wistar adultas não grávidas (grupo III) e grávidas (grupo IV).....	33
Tabela 4 -	Parâmetros registrados por ocasião da cesárea de ratas grávidas não inoculadas (GI) e infectadas com <i>P.berghei</i> ANKA (GIV) realizada no dia 21 de gestação. As cesáreas foram no dia da eutanásia programada ou logo após a morte das ratas em decorrência da infecção. Os valores são médias±DP.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector por arranjo de diodos, do inglês Diodo Array Detector
DCB	Departamento de ciências biológicas
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GI	Grupo I do experimento III (Grávidas não infectadas)
GII	Grupo II do experimento III (Não grávidas não infectadas)
GIII	Grupo III do experimento III (Não grávidas infectadas)
GIV	Grupo IV do experimento III (Grávidas infectadas)
<i>P. berghei</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. knowlesi</i>	<i>Plasmodium knowlesi</i>
<i>P. malarie</i>	<i>Plasmodium malarie</i>
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
PQ	Primaquina
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	JUSTIFICATIVA	19
3	OBJETIVOS	21
3.1	OBJETIVO GERAL.....	21
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4	METODOLOGIA	22
4.1	ANIMAIS.....	22
4.2	DESENHO EXPERIMENTAL.....	22
4.3	ACASALAMENTO E EVOLUÇÃO DA GRAVIDEZ.....	23
4.4	INFECCÃO.....	24
4.4.1	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	24
4.4.2	Animal de passagem.....	24
4.4.3	Inóculo.....	25
4.4.4	Taxa de parasitemia.....	25
4.5	CESÁREA POST-MORTEN.....	26
4.6	TRATAMENTO DOS ANIMAIS DO EXPERIMENTO III.....	27
4.6.1	Primaquina.....	27
4.6.2	Via de administração.....	27
4.6.3	Coleta do sangue.....	27
4.6.4	Análise (Determinação dos níveis plasmáticos de primaquina).....	28
5	RESULTADOS	29
5.1	CURSO CLÍNICO DA INFECCÃO COM <i>P. berghei</i> ANKA EM RATAS JOVENS (EXPERIMENTO I).....	29
5.2	CURSO CLÍNICO DA INFECCÃO COM <i>P. berghei</i> ANKA EM RATAS ADULTAS GRÁVIDAS E NÃO-GRÁVIDAS (EXPERIMENTO II).....	30
5.2.1	Gravidez e evolução clínica da infecção em ratas adultas.....	30
5.2.1	Evolução clínica dos filhotes das ratas infectadas no dia 7 de gravidez com <i>P.berghei</i> ANKA.....	31
5.3	EFEITOS DA INFECCÃO MATERNA COM <i>P. berghei</i> ANKA SOBRE O DESFECHO DA GRAVIDEZ E FARMACOCINÉTICA DA PRIMAQUINA EM RATOS (EXPERIMENTO III).....	33

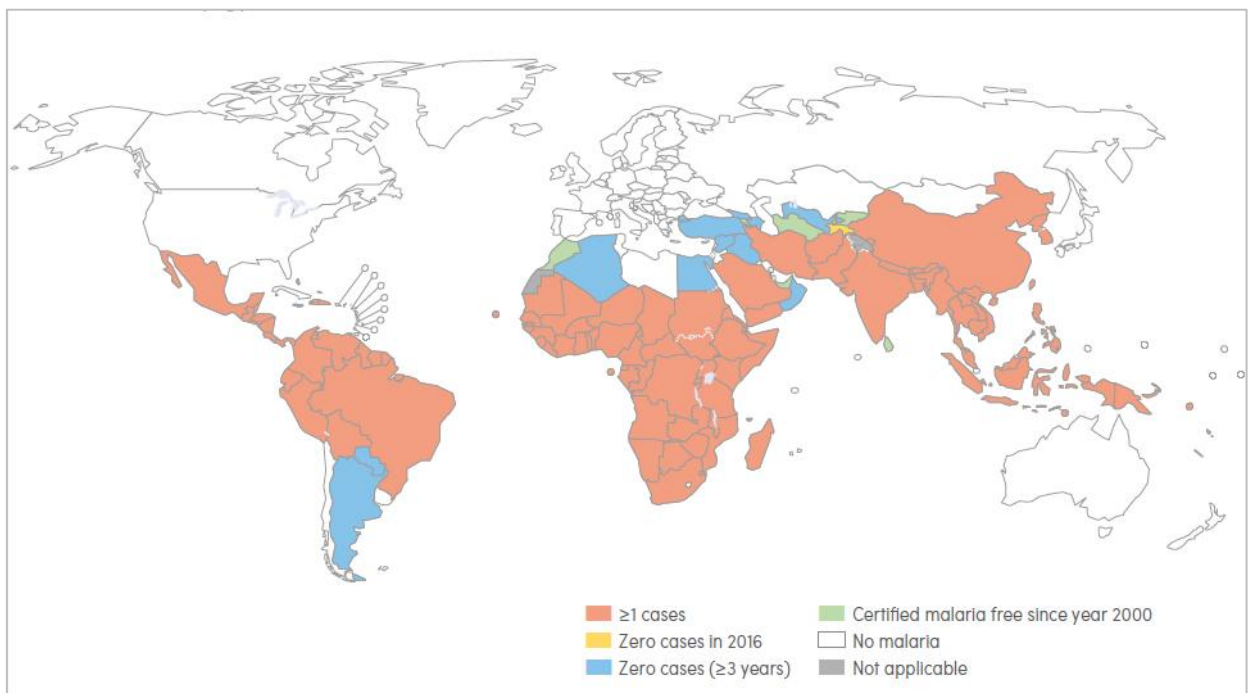
5.3.1	Evolução clínica dos filhotes das ratas infectadas no dia 7 de gravidez com <i>P. berghei</i> ANKA.....	33
5.3.2	Evolução clínica da infecção causada pelo <i>P. berghei</i> ANKA em ratas grávidas: sinais e sintomas.....	35
5.3.3	Desfecho da gravidez de ratas controles (não inoculadas, GI) e inoculadas com <i>P. berghei</i> ANKA no dia 7 de gestação (GIV).....	37
6	DISCUSSÃO	39
7	CONCLUSÃO	47
8	PESPECTIVAS	49
	REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

MALÁRIA

A malária é o principal problema de saúde pública em muitos países, principalmente em países tropicais e subtropicais em desenvolvimento, como mostra a figura 1 (CAMARGO 2003). Segundo dados do Ministério da Saúde (2006), estima-se que cerca de 300 a 500 milhões de pessoas são infectadas anualmente, ocorrendo mais de meio milhão de mortes por ano, sobretudo de crianças menores de 5 anos e gestantes. Apesar de ser uma doença que acarreta risco à metade da população mundial, sua incidência é maior na África, sendo responsável por 90% dos casos estimados (WHO 2015).

Figura 1 - Distribuição dos casos relatados de Malária pelo mundo no período do ano 2000 a 2016

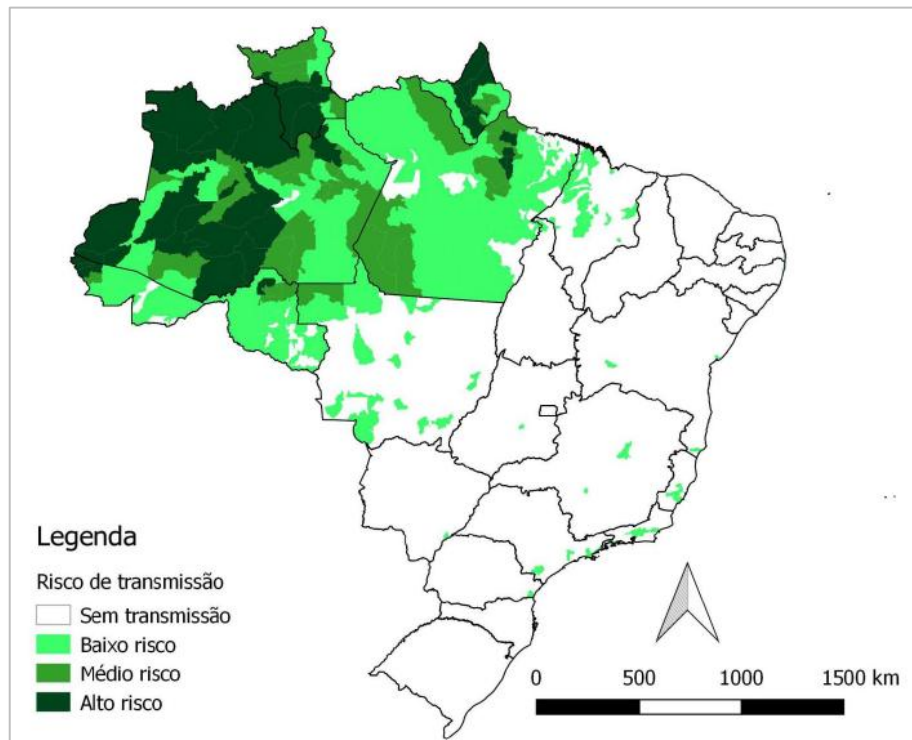


Fonte: OMS (2017).

Na região das Américas, o Brasil representa cerca de 50% dos registros de ocorrências dos casos de malária, sendo dividido em duas áreas: a região endêmica, constituída pelos Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins; e a região não endêmica, sendo constituída pelos demais estados, como mostra a

figura 2. Cerca de 99,5% dos casos no Brasil ocorrem na região Amazônica, onde as condições socioeconômicas e ambientais favorecem a proliferação do vetor e sua interação com o parasito. Determinantes epidemiológicos, como a forma de ocupação do solo e o desmatamento, aumentam o risco de transmissão da doença. Sendo assim, pode-se dizer que a Malária possui uma dinâmica de transmissão dependente de variáveis como fatores ambientais, socioculturais, econômicos e políticos (BRASIL 2006; SARAIVA et al 2009).

Figura 2 - Mapa de risco da Malária no Brasil



Fonte: BRASIL (2017).

No Brasil existem três espécies de *Plasmodium* causadores da malária: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae*. A malária é uma doença caracterizada, principalmente, por acessos de febre intermitente. Os primeiros sinais em um indivíduo não-imune, são febre, dor de cabeça, calafrios e vômito, que aparecem usualmente entre 10 e 15 dias após a infecção, podendo evoluir para as formas graves da doença (anemia grave, dificuldade para respirar e malária cerebral) e podendo levar à morte (WHO 2016).

A máalaria é uma doença infecciosa, produzida por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida naturalmente ao homem pela picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*. Seu agente etiológico, *Plasmodium*, possui ciclo de vida heteroxênico, ocorrendo no *Anopheles* (hospedeiro invertebrado) a fase de desenvolvimento sexual exógena ou

esporogônica e no homem (hospedeiro vertebrado) a fase assexual endógena ou esquizogônica. A fase esquizogônica ocorre em dois ciclos, o pré-eritrocitário (assintomático) e o eritrocitário (responsável pelo surgimento dos sintomas clínicos) (BRASIL 2006; VELÁSQUEZ 2014).

Atualmente são descritas 5 espécies de *Plasmodium* que infectam o homem: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*, as quais o *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, são as espécies de maior importância no Brasil (FRANÇA et al 2008; WHO, 2016).

As manifestações clínicas da malária ocorrem durante o ciclo eritrocítico do parasito, em função da grande perda de hemácias, devido à eclosão dos esquizontes sanguíneos e à liberação dos merozoítos. A fase sintomática inicial da infecção malárica é caracterizada por mal-estar, cefaleia, vômito, cansaço e mialgia, que evoluem para o ataque paroxístico agudo, ou acesso malárico, caracterizado por febre alta, calafrio e intensa sudorese. No caso da malária cerebral, provocada pelo *P. falciparum*, o parasito pode também comprometer progressivamente o sistema nervoso central (FRANÇA et al 2008; MACPHERSON et al 1985).

O gênero *Anopheles* é representado por cerca de 400 espécies, das quais no Brasil, apenas 5 são consideradas vetores de importância epidemiológica. São elas: *Anopheles darlingi*, *Anopheles aquasalis*, *Anopheles albitarsis*, *Anopheles cruzi* e *Anopheles bellator*, conhecidos também como carapanã, muriçoca, mosquito-prego, suvela e pernilongo (BRASIL 2006; MACPHERSON et al 1985; WHO 2016).

O homem é considerado como fonte de infecção para o mosquito, enquanto houver gametócitos infectantes circulando no sangue, e em número suficiente (BRASIL 2006).

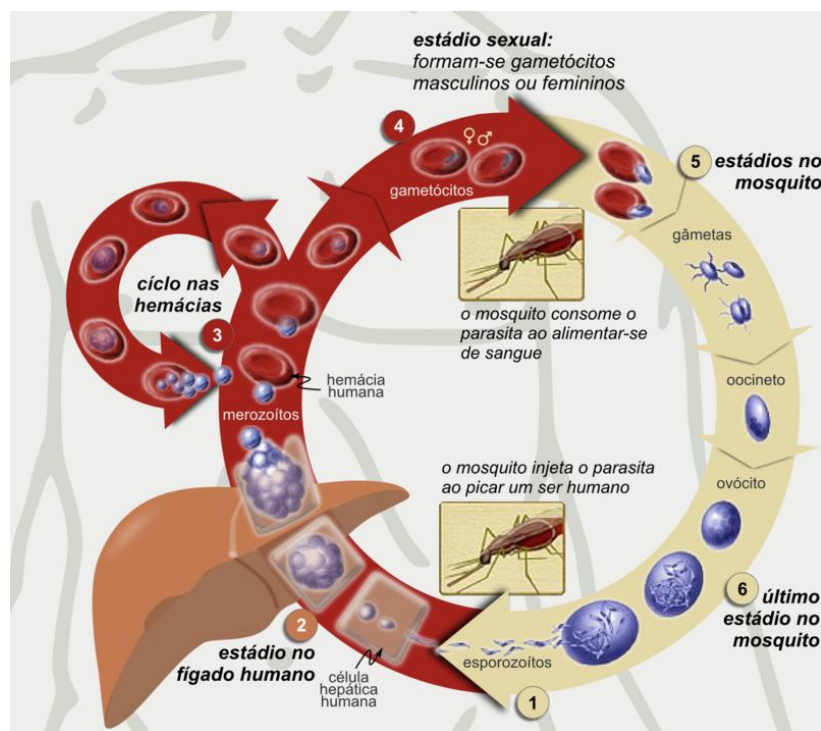
Após a fêmea do anofelino ingerir sangue de um hospedeiro contendo as formas sexuadas do parasita (gametócitos femininos e masculinos), inicia-se no interior do seu estômago a reprodução sexuada, dando origem ao oocineto, que atravessa a parede intestinal do mosquito e aloja-se na membrana basal onde desenvolve-se em oocisto. No interior do oocisto há a formação de esporozoítos (forma infectante ao homem), que posteriormente irão migrar para as glândulas salivares do mosquito (BRASIL 2014; BARILLAS-MURY et al 2005).

Ao picar o homem, a fêmea injeta uma pequena quantidade de saliva contendo o parasito em sua forma infectante. Cerca de 30 minutos após inoculação, inicia-se o ciclo pré-eritrocitário, quando os esporozoítos invadem os hepatócitos (células do fígado) e ocorrem as primeiras reproduções assexuadas, originando os esquizontes teciduais primários que

amadurecem e rompem o hepatócito, liberando merozoítos, que caem na corrente sanguínea e invadem as hemácias (YAMAUCHI 2007).

Após a liberação dos merozoítos, os que não são fagocitados parasitam os eritrócitos (hemácias), dando início ao ciclo eritrocitário. Na hemácia, amadurecem e transformam-se em trofozoítos. Estes multiplicam-se assexuadamente pelo processo de esquizogonia sanguínea, resultando nos equizontes sanguíneos, que posteriormente irão romper e liberar os merozoítos, que darão continuidade ao ciclo, parasitando outras hemácias. Algumas dessas formas deixam de multiplicar e sofrem alterações morfológicas e funcionais, dando origem aos gametócitos masculino e feminino (forma infectante ao vetor) que permanecem na corrente sanguínea até serem ingeridos eventualmente pela fêmea do Anofelino, dando continuidade ao ciclo (BRASIL 2014).

Figura 3 - Ciclo de vida do *plasmodium* sp transmissor da Malária



Fonte: Wikipédia, 2018

MALÁRIA NA GRAVIDEZ

Mulheres grávidas são particularmente vulneráveis à malária. Tal fato ocorre devido à alteração da imunidade provocada pela gravidez, tornando a mulher mais susceptível à

infecção malárica. A Malária associada à gestação é responsável por vários efeitos indesejáveis na gestante e no concepto. Na mãe, há um aumento do risco de formas complicadas da doença, como anemia grave, podendo resultar no óbito materno. Para o feto, envolve maior risco de aborto espontâneo, natimortalidade, prematuridade e baixo peso ao nascer, responsável por óbitos em crianças durante o primeiro ano de vida. Além da associação da susceptibilidade à malária com a deficiência imunológica da grávida, a placenta também é um fator importante, por se constituir um local propício para a multiplicação do parasito, tornando as grávidas mais susceptíveis à doença, com exacerbação dos sintomas e maior risco de complicações (CHAGAS et al 2009).

A malária congênita é uma condição clínica rara, ocorre como resultado da transmissão vertical de parasitas de mãe para filho, quando os parasitas da malária atravessam a placenta durante a gravidez, ou no momento do parto. Geralmente é identificada pela presença de formas assexuadas do parasito no sangue periférico (nos primeiros 7 dias de vida ou mais tarde), caso não haja possibilidade de infecção pós-parto pela picada do mosquito transmissor (LOKE 1982; LAOSOMBAT et al 1981; ODUOLA et al, 1986).

***Plasmodium berghei* ANKA**

A infecção de roedores com várias espécies e linhagens de plasmódios tem sido utilizada como modelo para estudos experimentais da fisiopatologia da malária. Em 1948, Vincke & Lips encontraram em um pequeno roedor (“*thicket rat*”) silvestre da África Central (Congo) uma nova espécie de plasmódio que foi por eles descrita e identificada como *Plasmodium berghei*. Posteriormente constatou-se que era possível infectar experimentalmente no laboratório outros roedores como camundongos, ratos e hamster com o *P. berghei*.

O *P. berghei* tem predileção por reticulócitos e pode desencadear uma infecção de evolução letal em camundongos. Embora ratos jovens sejam susceptíveis à infecção, ratos adultos são em geral mais resistentes à infecção com este parasito (Vincke & Lips 1948).

PRIMAQUINA

A primaquina (PQ) é um fármaco antimalárico pertencente à classe de alcaloides denominada quinolinas. Foi desenvolvida em 1925 e pertence ao grupo de antimaláricos do

tipo 8-aminoquinolina, que apresentam propriedades terapêuticas eficazes. Diferentemente de vários outros medicamentos utilizados para combater a malária, estudos revelam que esse fármaco age como esquizontecida tissular, atuando sobre as formas em desenvolvimento e latentes (hipnozoítas) presentes nos hepatócitos durante as infecções causadas por *P. vivax* ou *P. ovale* e como gametocida, ou seja, a PQ atua nos gametócitos maduros reduzindo a infectividade de todas as espécies de plasmódios, até mesmo sobre as cepas multirresistentes de *P. falciparum*. Seu uso é recomendado para promover a cura radical da malária causada por *P. vivax* ou *P. ovale*, terapia antirrecaída para pessoas extensivamente expostas a *P. vivax* ou *P. ovale*, assim como para a profilaxia primária contra todas as espécies de malária (VALE et al 2009).

Em contra partida, em indivíduos predispostos com deficiência genética de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), a PQ é um poderoso indutor de anemia hemolítica e metahemoglobinemia, doença causada pelo aumento dos níveis de metahemoglobina (forma oxidada da Hemoglobina, cujo Fe^{2+} da porção heme está oxidado ao estado férrico Fe^{3+} e, por isso, não consegue ligar-se ao oxigênio) no sangue. Indivíduos portadores dessa deficiência podem apresentar uma menor produção do cofator NADPH, resultando no prejuízo da atividade da NADPH metahemoglobina redutase e menor redução da metahemoglobina, cujos níveis tendem a aumentar (BOLCHOZ et al 2001).

A gravidade da anemia hemolítica está diretamente relacionada ao grau da deficiência de G6PD e à quantidade de PQ administrada (CLYDE 1981).

Em atenção ao risco de desencadear hemólise intravascular na mãe e no feto, a PQ e as 8-aminoquinolinas são antimaláricos contraindicados na gravidez. E seu uso está condicionado à investigação genética quanto a esta deficiência (NOSTEN et al 2006).

A PQ possui rápida absorção no trato gastrointestinal, com biodisponibilidade oral de 96%, rápida e extensiva distribuição nos tecidos e cinética linear, apresentando pico sérico em aproximadamente 3 horas após administração e meia-vida de eliminação de cerca de 5-7 horas. É rapidamente metabolizada no fígado, e somente uma pequena porção é excretada inalterada, indicando extensa reciclagem intra-hepática. É metabolizada principalmente por enzimas monoaminoxidases (MAOs) e, em menor extensão, por monooxigenases ou enzimas Citocromo P450, levando à formação da 5-hidroxiprimaquina, 5-hidroxi-dimetilprimaquina, N-acetilprimaquina e do seu principal metabólito, a carboxiprimaquina (CONSTANTINO et al 1999; BRASIL 2001; PRIMAQUINA® 2017).

Estudos propõem que o mecanismo de ação da PQ envolve a formação de espécies reativas de oxigênio que são tóxicos para os parasitos (VASQUEZ-VIVAR et al 1992; IDOWU 1995).

Ganesan e colaboradores (2009) apontam como responsáveis pelo efeito hemolítico deste fármaco, os metabólitos da PQ, gerados a partir da ação de enzimas Citocromo P450. Ensaio *in vitro* demonstraram que a PQ isoladamente não é hemotóxica, mas quando ela é incubada com hemácias normais, ou com hemácias deficientes de 6GPD, na presença de microssomos de fígado humano ou de camundongos, há grande aumento da formação de metahemoglobinas e de espécies reativas de oxigênio (ROS, reactive oxygen species). Entretanto, o estresse oxidativo é mais intensificado nas hemácias deficientes de G6PD.

Foi demonstrado que os metabólitos hidroxilados da primaquina são predominantemente gerados através do metabolismo pela CYP 2D6. Os metabólitos fenólicos da primaquina tem sido associados à anemia hemolítica observadas em indivíduos deficientes de G6PD (PYBUS et al, 2013).

2 JUSTIFICATIVA

Embora a incidência da malária entre as populações em situação de risco e a mortalidade devida à doença tenham diminuído entre 2000 e 2015, ela continua sendo uma ameaça à saúde de quase metade da população mundial, particularmente na África Subsaariana e em regiões tropicais das Américas e Ásia. Nas regiões em que a malária é endêmica, crianças menores de 5 anos, gestantes, indivíduos imunodeprimidos, migrantes não-imunes, populações móveis e viajantes são grupos particularmente vulneráveis à malária.

Entre os fármacos comumente usados para tratar a malária, a primaquina (PQ) e algumas outras 8-aminoquinolinas destacam-se por serem os únicos capazes de promover a cura radical nos casos de infecções pelo *P. vivax* e *P. ovale*. Além disso, a PQ atua também contra os gametócitos maduros de todas as espécies de *Plasmodium*, incluindo as cepas de *P. falciparum* multirresistentes. Entretanto, o emprego desse fármaco é em grande parte limitado pelo fato dela ser capaz de induzir a formação de metahemoglobinemia e, principalmente, causar anemia hemolítica em indivíduos portadores de deficiência genética de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD).

O uso da PQ é contraindicado na gravidez em virtude do risco de desencadear quadros graves de anemia hemolítica, se a mãe e ou concepto tiverem deficiência genética de G6PD.

A contraindicação de uso na gravidez tem desestimulado a investigação em profundidade de outros eventuais efeitos adversos deste fármaco (em indivíduos não deficientes em G6PD), assim como a farmacocinética desse fármaco na gravidez. Informações mais precisas sobre as condições que potencialmente alteram a farmacocinética de antimaláricos podem contribuir para a escolha de esquemas terapêuticos mais eficazes e que representem menor risco para o paciente. Nesse contexto, situa-se a pesquisa sobre as alterações da farmacocinética da PQ na malária associada à gravidez.

Normalmente, em estudos de malária experimental, são utilizados camundongos como animais de experimentação por serem mais suscetíveis à infecção, porém em estudos farmacocinéticos que requerem maior volume de sangue, a utilização de camundongos torna-se inviável, sendo o uso de ratos mais apropriado. Entretanto, quando se trata do estudo de antimaláricos na gravidez, por não existir um modelo apropriado de infecção em ratas grávidas, costuma-se utilizar camundongos.

Estudos recentes mostram que é possível desenvolver malária experimental em ratos jovens utilizando o *Plasmodium berghei*, porém o rato adulto adquire imunidade protetora e se cura naturalmente da infecção.

Embora o rato adulto seja resistente à Malária, é sabido que a gravidez altera o estado de imunidade, tornando a mãe mais suscetível à infecção malárica. Foram encontrados na literatura pouquíssimos estudos de malária experimental em ratas grávidas, sendo nenhum deles recente.

Espera-se, com o presente estudo, elucidar o desenvolvimento da infecção por *P. berghei* ANKA em ratas grávidas, assim como observar o desfecho da doença sobre a gravidez e os fetos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar se, e como, a infecção malárica (fase eritrocítica) evolui clinicamente em ratas grávidas e não grávidas inoculadas com *Plasmodium berghei* ANKA. O propósito desta investigação, inserida em linha de pesquisa em andamento no laboratório, é verificar se ratas adultas podem ser utilizadas como modelo experimental, para esclarecer se e como as variáveis gravidez e infecção, isoladamente e ou concomitantemente, são capazes de alterar a farmacocinética de medicamentos antimaláricos.

3.2 Objetivos específicos

- I. Comparar a evolução clínica da infecção pelo *P. berghei* ANKA em ratas jovens e adultas.
- II. Comparar a evolução clínica da infecção pelo *P. berghei* ANKA em ratas adultas grávidas e não grávidas.
- III. Verificar como a infecção pelo *P. berghei* ANKA evolui nas mães após parto espontâneo e se há indícios de transmissão vertical da infecção para a prole durante a gravidez.
- IV. Avaliar os efeitos da infecção materna pelo *P. berghei* ANKA durante a gravidez sobre a placenta e o desenvolvimento embrio-fetal da prole.
- V. Avaliar se o rato é um modelo conveniente para investigar os efeitos da gravidez e da infecção sobre a farmacocinética de medicamentos antimaláricos.

4 METODOLOGIA

Todos os experimentos descritos nesta dissertação foram realizados nas dependências do laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

4.1 ANIMAIS

Foram utilizadas para o presente estudo, ratas da linhagem Wistar, separadas em experimentos distintos, como mostra a tabela 1.

Os animais foram obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratórios (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz. O manuseio e utilização dos ratos ocorreram de acordo com o disposto na legislação brasileira de proteção e bem-estar dos animais, e seguiu as diretrizes para cuidados e uso de animais de laboratório em pesquisa e para fins didáticos (DBCA) publicadas pelo CNPq. Essas diretrizes nacionais estão alinhadas com o contido no Guia para Uso de Animais de Laboratório (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition, 2011*) publicada pelo Instituto Nacional de Saúde dos EUA (*US National Institutes of Health*).

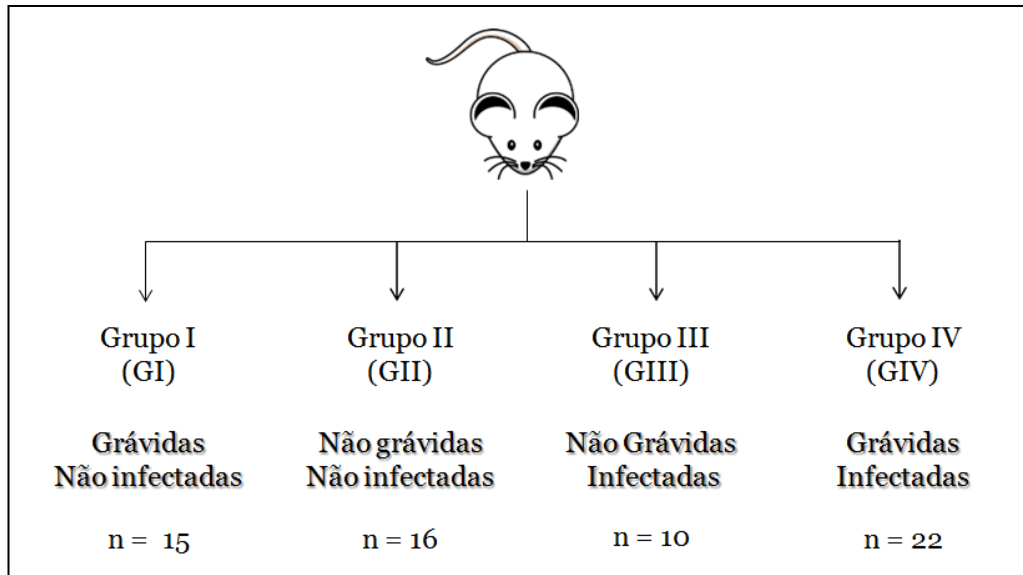
4.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Tabela 1 - Esquema dos experimentos preliminares (I e II) e principal (III)

EXPERIMENTO	I	II	III
Objetivo:	Avaliar o curso da infecção em ratas jovens	Estabelecer um modelo de infecção em ratas grávidas / Estudar como a infecção pelo <i>P. berghei</i> evolui nas mães após parto espontâneo e se há indícios de transmissão vertical	Estudar o desfecho da infecção sobre a gravidez / Estudar a farmacocinética da primaquina em ratas grávidas e infectadas por <i>P. berghei</i>
n (grupo de estudo):	4 (jovens infectadas)	3 (grávidas infectadas)	22 (grávidas infectadas)
Idade:	4 semanas de vida	9-10 semanas de vida	9-10 semanas de vida

Os experimentos I e II foram estudos prévios para a realização do experimento principal, o experimento III. Os animais do experimento III foram separados em 4 grupos experimentais, estes estão descritos na figura 4.

Figura 4 - Grupos experimentais do experimento III.



Fonte: A autora, 2018.

4.3 ACASALAMENTO E EVOLUÇÃO DA GRAVIDEZ

As ratas foram transferidas para a gaiola de machos sexualmente maduros e experientes, por duas horas, ao término da fase escura do fotoperíodo. Findo o período de coabitação, as fêmeas foram examinadas para a presença de tampão vaginal (plug) e pela presença de espermatozoides no lavado vaginal (confirmação da cópula). Nos casos em que foi notado o plug e/ou a presença de espermatozoides no lavado vaginal, as fêmeas foram consideradas grávidas (sendo o dia da confirmação da cópula definido como dia zero da gestação) e transferidas para gaiolas individuais.

Nos dias subsequentes, o procedimento foi repetido com as fêmeas que não copularam, até que fosse atingido o número pretendido de fêmeas grávidas para cada grupo experimental.

No experimento II, a gravidez evoluiu para o parto espontâneo, e as mães e seus filhotes foram acompanhados durante todo período de amamentação. Na ocasião do desmame, efetuado no dia 21 pós-nascimento, foi preparada lâmina da distensão sanguínea de gota de

sangue retirada da ponta da cauda de cada filhote para verificar se teria ocorrido transmissão vertical da infecção (infecção malárica congênita).

No experimento III, as fêmeas foram acompanhadas até o 21º dia de gravidez, dia em que foram tratadas com o fármaco antimalárico primaquina e submetidas à eutanásia seguida de cesariana. As fêmeas que não acasalaram (não grávidas) foram também transferidas para gaiolas individuais e, tal como as grávidas, acompanhadas por um período equivalente de 21 dias.

Os controles (não grávidas) foram acompanhados pelos dias correspondentes aos dias de gravidez das grávidas. No dia correspondente ao dia 21 de gravidez, foram submetidos ao tratamento com primaquina e/ou sacrifício.

4.4 INFECCÃO

4.4.1 *Plasmodium berghei* ANKA

Neste estudo, escolhemos a linhagem *Plasmodium berghei* ANKA que causa uma infecção grave e letal em camundongos de diferentes linhagens e que, de acordo com a literatura, é capaz de infectar ratos jovens.

Os parasitos (plasmódios) foram originalmente cedidos pelo Laboratório de Pesquisas em Malária (IOC/FIOCRUZ) e, desde então, tem sido mantidos (hemácias de camundongos parasitadas) no Laboratório de Toxicologia Ambiental (DCB/ENSP/FIOCRUZ) congelados em criotubos com solução de Alsever armazenados em botijões apropriados contendo Nitrogênio líquido (-196 °C).

4.4.2 **Animal de passagem**

Apesar dos cuidados durante os procedimentos de congelamento e criopreservação das hemácias parasitadas em nitrogênio líquido, a possibilidade de o congelamento comprometer a viabilidade dos parasitos não pode ser totalmente excluída. Por este motivo, optamos por não utilizar o material congelado para infectar diretamente os animais envolvidos no experimento, e sim inocular o sangue parasitado de um animal de passagem. Desta forma é possível também precisar o título do inóculo e padronizar melhor a carga de parasitos empregada para a infecção.

Assim, inoculamos as amostras criopreservadas em um animal (camundongo) de passagem e acompanhamos o desenvolvimento da infecção. Posteriormente, o sangue deste camundongo em que a infecção evoluiu foi inoculado nos animais do experimento. Este procedimento é conhecido como “procedimento de passagem” e os camundongos infectados dos quais se retirou o sangue para infectar os ratos dos grupos experimentais são denominados “doadores”.

Neste trabalho, os doadores foram camundongos da linhagem DBA-2. Os animais de passagem foram infectados com 0,2 mL da solução contendo sangue infectado com *P. berghei*, por via intraperitoneal. Para inocular os camundongos DBA-2 de passagem empregamos hemácias em solução salina, com a qual foi lavado o sangue parasitado mantido em solução de Alsever, que havia sido congelado e armazenado em nitrogênio líquido.

4.4.3 Inóculo

A partir da determinação da taxa de hemácias parasitadas (parasitemia) por volume de sangue calculamos o fator de diluição do sangue do doador para obter um inóculo com título almejado.

Neste estudo, o inóculo empregado para infectar as ratas foi fixado em 10^8 hemácias parasitadas (*P. berghei* ANKA) por animal, baseando-se nos achados de Pedroni e colaboradores (2006). A contagem das células foi feita na câmara de Neubauer, utilizando um microscópio óptico em objetiva de 20X.

Os camundongos doadores atingiram a taxa de parasitemia de aproximadamente 10% por volta de uma semana após a inoculação, época em que foi feita a coleta do sangue posteriormente inoculado nas ratas dos diferentes grupos experimentais. As ratas foram inoculadas por via intraperitoneal com 0,5 mL do sangue do doador infectado diluído em salina, volume este que continha 10^8 células parasitadas (*P. berghei* ANKA).

Todas as ratas grávidas dos experimentos II e III foram inoculadas com o parasito no 7º dia de gestação.

4.4.4 Taxa de parasitemia

A taxa de parasitemia, ou percentual de hemácias parasitadas, foi determinado calculando a proporção entre hemácias parasitadas, em lâmina da distensão de gota de sangue

coletada a partir de pequena incisão na ponta da cauda, e hemácias totais examinadas. O percentual de hemácias parasitadas é a razão entre o número de hemácias infectadas (numerador) e o número de células total de hemácias examinadas (denominador). Para o cálculo foi padronizado um total de 1000 células examinadas.

Após a secagem do sangue e fixação em metanol, a lâmina com a distensão sanguínea foi corada com o kit Panóptico.

A contagem das hemácias parasitadas foi feita com auxílio de microscópio óptico, com objetiva de 100X e óleo de imersão.

Nos experimentos I e II, tanto a taxa de parasitemia quanto o peso das ratas, foram determinados em diferentes dias pós-inoculação. No experimento principal (III) a taxa de parasitemia e a evolução ponderal foram acompanhadas diariamente.

As ratas jovens (experimento I) foram acompanhadas por 25 dias após a inoculação. No outro experimento preliminar (experimento II), a evolução da infecção foi acompanhada até a taxa de parasitemia atingir zero, o que ocorreu aproximadamente 5 dias após o parto espontâneo. No experimento principal (experimento III) a evolução da infecção das ratas grávidas foi monitorada até a gravidez a termo (21º dia de gestação), dia em que foi realizada a eutanásia programada e os fetos removidos por cesárea post-mortem.

4.5 CESÁREA POST-MORTEN

Após a eutanásia programada, das ratas do experimento III, por inalação forçada de CO₂ e constatação do óbito, foi feita incisão na parede abdominal para retirada do útero grávido e seu conteúdo (cesárea). Este procedimento ocorreu no 21º dia de gestação das grávidas, ou seja no dia que antecede aquele (22º dia) em que geralmente ocorre (moda da distribuição de duração da gravidez) o parto espontâneo.

O útero gravídico foi retirado e pesado com todo o seu conteúdo e, posteriormente, aberto com cuidado. Os fetos e suas respectivas placentas foram retirados, pesados, e posteriormente examinados, quanto ao aspecto externo e vitalidade. As posições relativas dos fetos no útero, bem como o número de reabsorções visíveis (precoce, intermediária e tardia), também foram registrados. Cada feto foi marcado com uma caneta, de modo que pudesse ser identificado nas fases subsequentes de processamento. Em seguida, toda a ninhada foi submetida à eutanásia, antes de ser fixada em formalina a 5% e armazenada para análise

posterior. As placentas foram fixadas em formalina em tampão Millonig e armazenadas para processamento histopatológico posterior.

Após os fetos terem sido removidos, foi feito o método descrito por Salewiski (1964) para coloração dos sítios de implantação no útero e contagem. Os ovários foram retirados, limpos do tecido adiposo adjacente, e o número de corpos lúteos gravídicos foi determinado.

Ainda, os fígados e baços das mães foram examinados macroscopicamente e pesados.

Após a inoculação do parasita, a evolução clínica da infecção foi acompanhada cuidadosamente, sendo registradas todas as alterações relevantes apresentadas pelo animal.

4.6 TRATAMENTO DOS ANIMAIS DO EXPERIMENTO III

4.6.1 Primaquina

No dia 21 de gravidez, antes da eutanásia, as ratas foram tratadas com solução salina do fármaco antimalárico difosfato de primaquina (PQ) fornecido pelo Instituto de Tecnologia em Fármacos da FIOCRUZ (Farmanguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

O difosfato de primaquina foi dissolvido em salina tamponada (PBS 1x), de modo a obter uma solução do fármaco com a concentração de 40 mg.mL^{-1} , em termos de primaquina base. As soluções foram preparadas no mesmo dia do tratamento e mantidas sob-refrigeração ($+4^{\circ}\text{C}$) e ao abrigo da luz até serem utilizadas.

4.6.2 Via de administração

O antimalárico (PQ) foi administrado por via oral por meio de cânula gástrica (gavagem). O volume administrado a cada animal foi ajustado de acordo com o peso corporal, de forma que todos receberam a dose de 40 mg de PQ (equivalentes à primaquina base) por kg do animal, ou seja, o volume de 1 mL por kg de peso corporal da solução de 40 mg (PQ base) $\times \text{mL}^{-1}$.

4.6.3 Coleta do sangue

Os intervalos de tempo após o tratamento selecionados para a coleta do sangue, e construção da curva das alterações de níveis plasmáticos ao longo do tempo (eliminação da

PQ), foram 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. Aproximadamente 500 µL de sangue foi coletado pela veia lateral da cauda do animal com auxílio de agulha heparinizada. Após a coleta em tubos tipo *Eppendorf* com capacidade de 1,5 mL, com o anticoagulante heparina, o sangue foi centrifugado para separação do plasma que foi imediatamente congelado (-20°C) e armazenado para ser analisado posteriormente.

4.6.4 Análise (Determinação dos níveis plasmáticos de primaquina)

As amostras de plasma serão posteriormente analisadas por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a detector de ultravioleta-visível em rede de diodos (DAD-UV-VIS) em aparelho Shimadzu Nexera XR no Laboratório de Toxicologia Ambiental da DCB/ENSP/FIOCRUZ.

O método de extração e as condições cromatográficas que serão utilizadas para determinação dos níveis plasmáticos de primaquina foram validadas, e estão descritas em detalhe na Dissertação de Mestrado de Ana Paula Barbosa do Carmo (2015) e em artigo publicado pelo grupo (Carmo et al 2017).

5 RESULTADOS

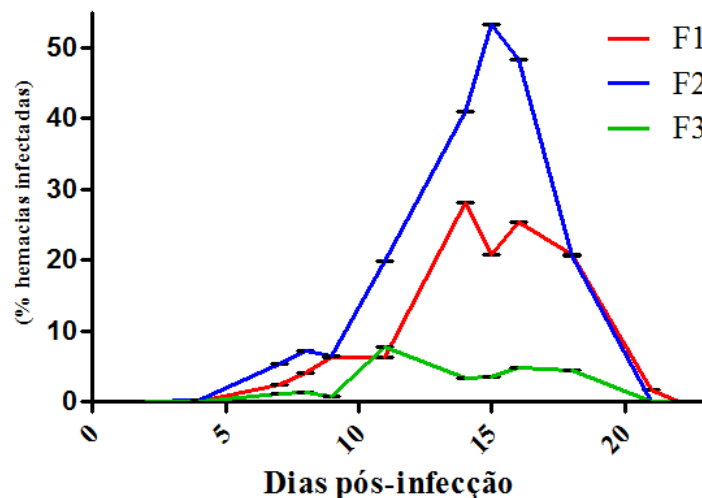
5.1 CURSO CLÍNICO DA INFECCÃO COM *P. berghei* ANKA EM RATAS JOVENS (EXPERIMENTO I)

Foi possível constatar que a infecção evoluiu clinicamente nas quatro ratas jovens que receberam o inóculo de *P. berghei* ANKA.

Uma das ratas (F4) no décimo primeiro dia pós-infecção, após ter apresentado níveis crescentes da taxa de parasitemia até atingir o máximo de 8%, apresentou quadro neurológico de instalação rápida caracterizado por sintomas como paralisia, ataxia, torpor, e incapacidade de abrir a boca, alimentar-se e beber água. Constatados estes sintomas compatíveis com quadro de malária cerebral, esta rata foi imediatamente submetida à eutanásia.

Nas outras três ratas (F1, F2, F3) infectadas a evolução da taxa de parasitemia, entretanto, diferiu acentuadamente, exibindo picos que variaram de 50% a 30%, e pouco menos de 10%, como pode ser visualizado na Figura 4. Em todas as ratas inoculadas, após atingir o valor máximo entre 10 e 15 dias após a inoculação, taxa de parasitemia decresceu progressivamente para alcançar uma aparente cura (0%), após o 20º dia e antes do 25º dia pós-infecção (Figura 5).

Figura 5 - Experimento I: Evolução da taxa de parasitemia nas ratas jovens inoculadas (10^8 células parasitadas/rata, ip) com *P.berghei* ANKA



Fonte: A autora, 2018.

Nota: Com exceção da rata que foi sacrificada (F4).

5.2 CURSO CLÍNICO DA INFECÇÃO COM *P. berghei* ANKA EM RATAS ADULTAS GRÁVIDAS E NÃO-GRÁVIDAS (EXPERIMENTO II)

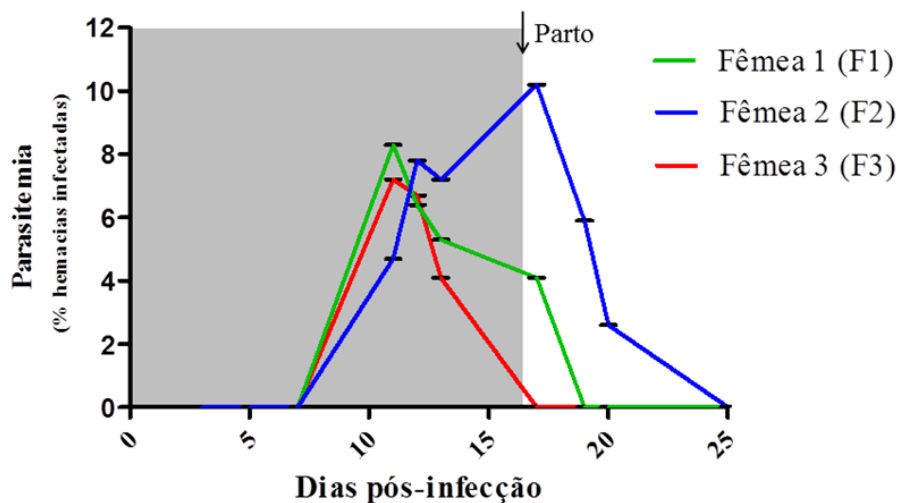
5.2.1 Gravidez e evolução clínica da infecção em ratas adultas

Três ratas adultas não grávidas foram inoculadas sob as mesmas condições das ratas grávidas. Não foram detectadas hemácias parasitadas nas lâminas com distensão sanguínea do sangue dessas três ratas coletado nos dias subsequentes (até o dia 25) pós-inoculação, ou seja, o inóculo não infectou essas ratas adultas. Por outro lado, três ratas adultas que comprovadamente acasalaram receberam o inóculo no dia 7 de gravidez (dia em que copularam = dia 0). Duas destas ratas apresentaram elevações consistentes e progressivas das taxas de parasitemia que atingiram os valores máximos de 7% a 10% entre os dias 10 e 16 pós inoculação (dias 17 e 23 de gravidez, respectivamente) (Figura 5). Uma das duas ratas (F1) teve um ganho de peso discreto durante a gravidez e pariu apenas um filhote morto (natimorto) no dia 22 de gestação. Após a eutanásia, o exame do útero desta fêmea com o emprego da técnica de Salewisk (1964) revelou onze sítios de implantação, indicando elevado número de perdas gestacionais pós-implantação. Após o parto, o percentual de hemácias parasitadas diminuiu ainda mais e chegou a zero (Figura 6). A gravidez da F2 evoluiu para o parto espontâneo com o nascimento de ninhada com onze filhotes vivos. Da mesma forma que havia ocorrido com a fêmea 1, a taxa de parasitemia da F2 aumentou ligeiramente, em seguida, após o parto, diminuiu abruptamente, a ponto de não serem mais encontradas células parasitadas no exame de distensão sanguínea (% de hemácias parasitadas = 0).

A outra rata que havia acasalado (cópula comprovada pela presença de espermatozoides no lavado vaginal), a F3, nos dias subsequentes a inoculação (dia 7 de gravidez ou pós-acasalamento) apresentou elevação transitória e de pequena magnitude da taxa de parasitemia que retornou a zero. Esta rata não deu à luz a filhotes e, após a eutanásia, o exame do útero (método de Salewski 1964) constatou a ausência de sítios de implantação. Neste caso não é possível saber ao certo se a cópula não resultou em fecundação, ou se houve fertilização dos óvulos seguida de perdas gestacionais pré-implantação, durante a implantação ou no período imediatamente posterior (época da inoculação do parasita), porque o método de Salewski (1964) só revela pontos em que

ocorreram implantações após estas terem se estabelecido e o processo de placentação ter evoluído durante algum tempo.

Figura 6 - Experimento II: Evolução da taxa de parasitemia das ratas que comprovadamente acasalaram (grávidas) e que foram inoculadas com *P. berguei* ANKA (10^8 células parasitadas/rata, ip) no dia 7 de gravidez (dia 7 após a comprovação da cópula)



Fonte: A autora, 2018.

Nota: A % de hemácias parasitadas foi determinada em diferentes dias até 25 dias após a inoculação ou 32 dias após o acasalamento. A parte sombreada na figura representa o período que antecedeu o parto espontâneo. Os partos espontâneos das fêmeas 2 e 3 ocorreram os dias 15 e 16 pós inoculação ou 22 e 23 de gravidez. A fêmea 1 não pariu filhotes vivos ou mortos e não apresentou sítios de implantação no útero quando este foi examinado (método de Salewski) após a eutanásia.

5.2.2 Evolução clínica dos filhotes das ratas infectadas no dia 7 de gravidez com *P. berghei* ANKA.

O exame clínico dos filhotes e a análise das lâminas com a distensão do sangue dos filhotes, mostrou que um dos filhos da fêmea 3 estava infectado. Este filhote, ao longo do período de amamentação, passou a apresentar peso corporal claramente inferior ao dos demais membros da ninhada (Tabela 2 e Figura 7), além de acentuada palidez e pilo-ereção.

Três dias após o desmame, este filhote apresentou 83% de hemácias parasitadas, o percentual mais elevado registrado neste estudo, com poucas hemácias maduras e

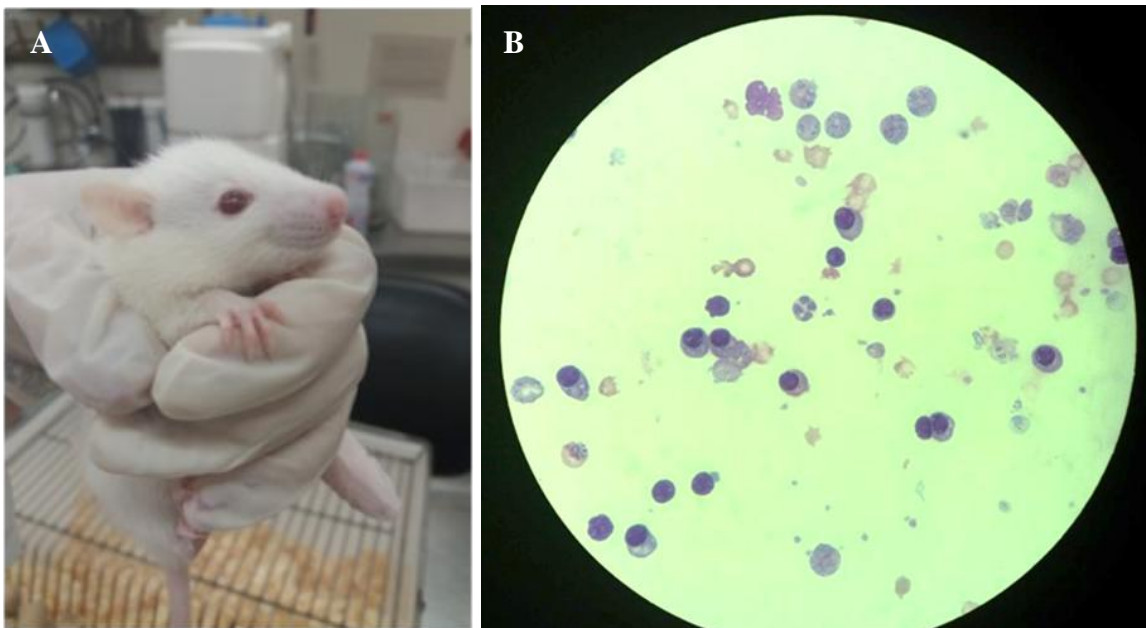
preponderância de reticulócitos infectados nas lâminas com a distensão do sangue periférico. Dias após o este registro o filhote morreu.

Tabela 2 - Peso corporal e resultado do exame do sangue (% de hemácias parasitadas) no dia do desmame (dia 21 pós-natal) dos filhotes da fêmea 3 que havia sido infectada com *P.berghei* ANKA no dia 7 de gravidez

Filhote	FL1	FL2	FL3	FL4	FL5	FL6	FL7	FL8	FL9	FL10	FL11
Sexo	M	F	F	F	F	F	F	F	F	F	M
Peso (g)	43	41,48	46,24	45,9	45,04	45,99	46,33	48,84	48,51	49,79	48,34
% de células infectadas	0%	48%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Legenda: FL – filhote; M – macho; F – fêmea

Figura 7 - Filhote nascido da fêmea 3 (infectada com *P. berghei* ANKA) com sinais clínicos (palidez e pilo-ereção) de infecção e esfregaço sanguíneo, feito a partir de uma amostra de sangue do filhote



Fonte: A autora, 2018.

Legenda: A - Filhote nascido da fêmea 3 infectada com *P. berghei* ANKA com sinais clínicos (palidez e pilo-ereção) de infecção B - Esfregaço sanguíneo, feito a partir de uma amostra de sangue do filhote, corado com kit para coloração Panótico Rápido, observado em objetiva 100X com óleo de imersão. Observa-se a presença de trofozoítos e esquizontes sanguíneos.

5.3 EFEITOS DA INFECÇÃO MATERNA COM *P. berghei* ANKA SOBRE O DESFECHO DA GRAVIDEZ E FARMACOCINÉTICA DA PRIMAQUINA EM RATOS (EXPERIMENTO III)

5.3.1 Evolução clínica de ratas grávidas e não-grávidas infectadas com *P. berghei* ANKA

Como indicado no diagrama (Tabela 3), 22 das 27 ratas inoculadas com *P. berghei* no dia 7 de gravidez desenvolveram a infecção que, em 6 destas ratas, evoluiu para o óbito antes que fosse feita a eutanásia e cesárea programadas para o dia 21 de gravidez. No caso das demais 16 ratas infectadas, a infecção e a gravidez evoluíram até o 21º dia de gestação quando foi realizada a eutanásia e cesárea post-mortem. Das 10 ratas não grávidas (grupo controle; GIII) que foram inoculadas, 5 apresentaram um aumento transitório da taxa de parasitemia que após atingir um valor máximo de pequena magnitude regrediu a níveis em que nenhuma hemácia parasitada foi encontrada (% de hemácias parasitadas = zero) antes do 14º pós-inoculação. No caso do grupo de ratas grávidas infectadas, o dia 14 pós-inoculação corresponde ao 21º dia de gravidez .

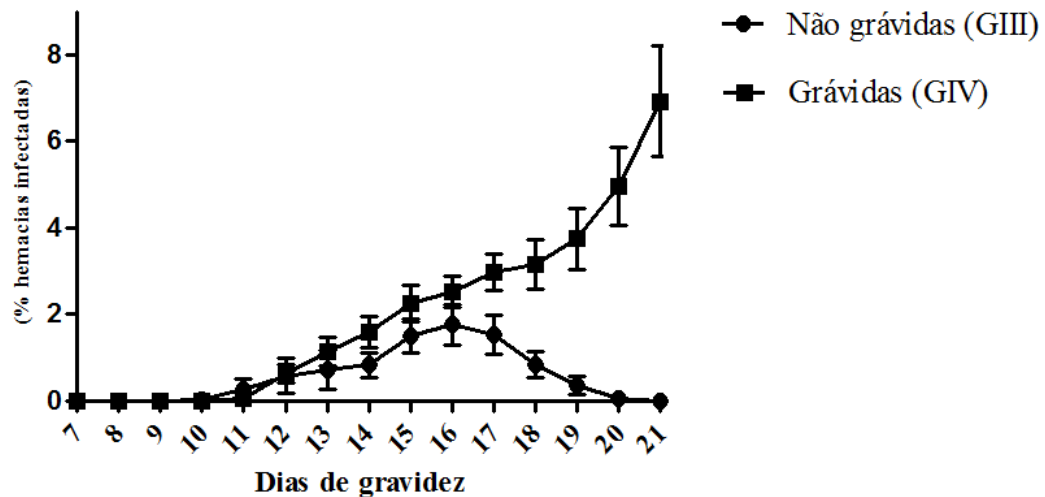
Tabela 3 - Representação esquemática do desfecho da inoculação de *P. berghei* ANKA em ratas Wistar adultas não grávidas (grupo III) e grávidas (grupo IV)

Grupo	GIII Não gávidas Infectadas	GIV Grávidas Infectadas
Total de ratas inoculadas	10	27
Parasitadas que sobreviveram até o 21º dia de gravidez/14º dia pós-infecção	5	16
Parasitadas morreram antes do 21º dia de gravidez/14º dia pós-infecção	0	6
Não parasitadas	5	5

A taxa de parasitemia nos animais inoculados e infectados só foi possível ser calculado a partir do 3º dia pós-infecção (9º dia de gravidez), quando a presença de hemácias parasitadas começou a ser observada. Entre as grávidas, a taxa de parasitemia aumentou gradualmente até o dia 21 de gravidez, quando as ratas foram eutanasiadas e os fetos

removidos (cesárea). As não grávidas que desenvolveram a infecção evoluíram para a cura antes do dia programado para a eutanásia (14 dias após a inoculação), como mostra a figura 8.

Figura 8 - Evolução da taxa de parasitemia das ratas grávidas (GIV) e não grávidas (GIII) inoculadas com *P. berghei* ANKA

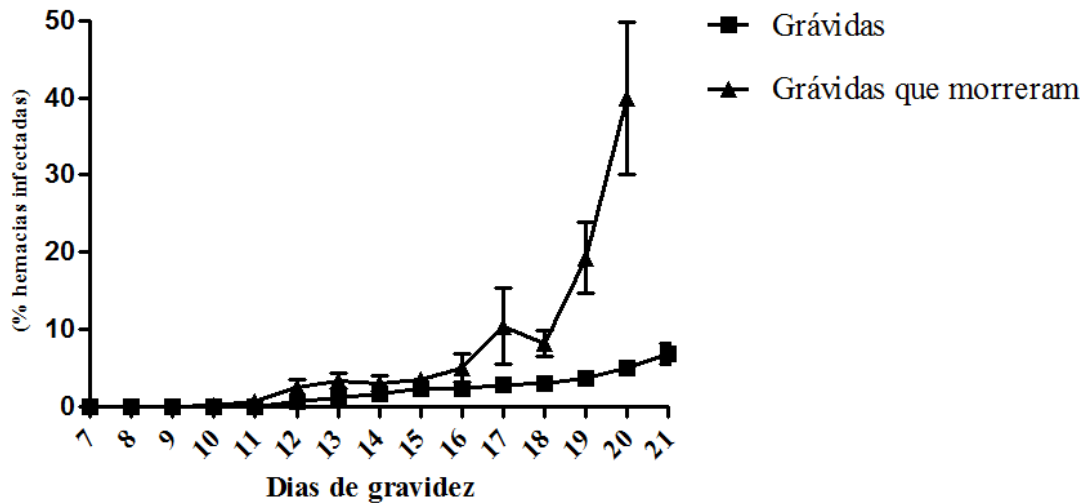


Fonte: A autora, 2018.

Nota: Todas as fêmeas grávidas foram inoculadas no dia 7 de gestação. O inóculo (padronizado) foi administrado por via intraperitoneal e correspondeu a 10^8 hemácias parasitadas (*P. berghei* ANKA) por animal.

As 6 fêmeas grávidas do grupo IV que morreram antes do dia programado para a eutanásia (dia 21 de gravidez) apresentaram percentual máximo de hemácias parasitadas consideravelmente superior àquela alcançada pelas que sobreviveram até o final da gravidez (21º dia de gestação) (Figura 9). As ratas grávidas inoculadas morreram no 19º, 20º e 21º dia de gestação. Ainda, foi verificado que todas essas fêmeas haviam entrado em trabalho de parto, porém não chegaram a expulsar os filhotes, exceto uma que morreu no 20º dia de gravidez e chegou a expulsar dois filhotes, um deles foi encontrado limpo e fora do saco amniótico, o outro ainda estava no saco amniótico.

Figura 9 - Evolução da taxa de parasitemia (*P. berghei* ANKA) nas fêmeas grávidas (grupo GIV) que morreram antes do dia programado para eutanásia e naquelas que sobreviveram até o 21º dia de gestação



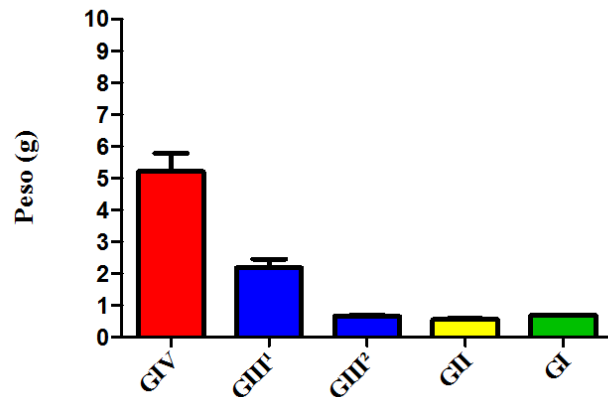
Fonte: A autora, 2018.

5.3.2 Evolução clínica da infecção causada pelo *P. berghei* ANKA em ratas grávidas: sinais e sintomas

A evolução da infecção com *P. berghei* ANKA resultou em considerável aumento e enegrecimento do baço e também escurecimento do fígado constatados por ocasião da necropsia. As alterações mais marcantes, notadas em todas as ratas infectadas, ocorreram nos baços, com aumento significativo de tamanho e peso, o maior dos quais pesou 10,36g. Durante a gravidez o fígado das ratas aumenta de tamanho em relação ao tamanho do órgão antes da gravidez o que pode ser inferido pela comparação dos pesos do fígado de ratas (de mesma idade) grávidas e não grávidas não infectadas. Esse aumento fisiológico do órgão não foi alterado pela infecção das ratas grávidas. O efeito hepático mais notável da infecção foi a alteração de cor. Como pode ser visto nas figuras, a infecção não alterou o tamanho dos fígados no presente estudo (Figuras 10, 11 e 12).

As ratas adultas infectadas apresentaram outros sinais e sintomas clínicos típicos da malária em roedores, tais como palidez, pilo-ereção e prostração. Algumas ratas infectadas não exibiram o comportamento típico de preparar o ninho quando a gravidez (á termo) se aproximou da data do parto. De um modo geral, a intensidade dos sinais clínicos observados foi proporcional ao percentual máximo de hemácias parasitadas registrado após a inoculação.

Figura 10 - Comparação entre os pesos médio dos baços dos quatro grupos do experimento III

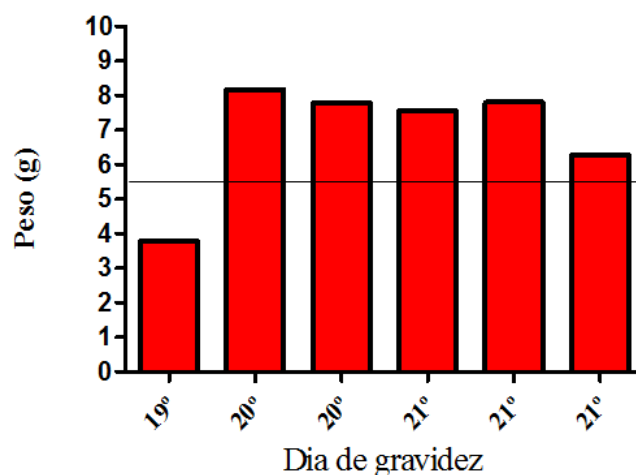


Fonte: A autora, 2018.

Nota: Os pesos dos baços foram registrados por ocasião da necropsia no dia da eutanásia das ratas (após o tratamento com PQ). A eutanásia foi feita no 21º dia de gestação das ratas dos grupos I e IV. As fêmeas dos grupos II e III, de mesma idade e procedência, foram acompanhadas por 14 dias pós-inoculação e também eutanasiadas.

Legenda: GI – Grávidas não infectadas; GII – Não grávidas não infectadas; GIII – Não grávida não infectada; GIV – Grávida infectada. ¹Ratas do grupo III (GIII) que apresentaram hemácias parasitadas. ²Ratas do grupo III (GIII) que não apresentaram hemácias parasitadas.

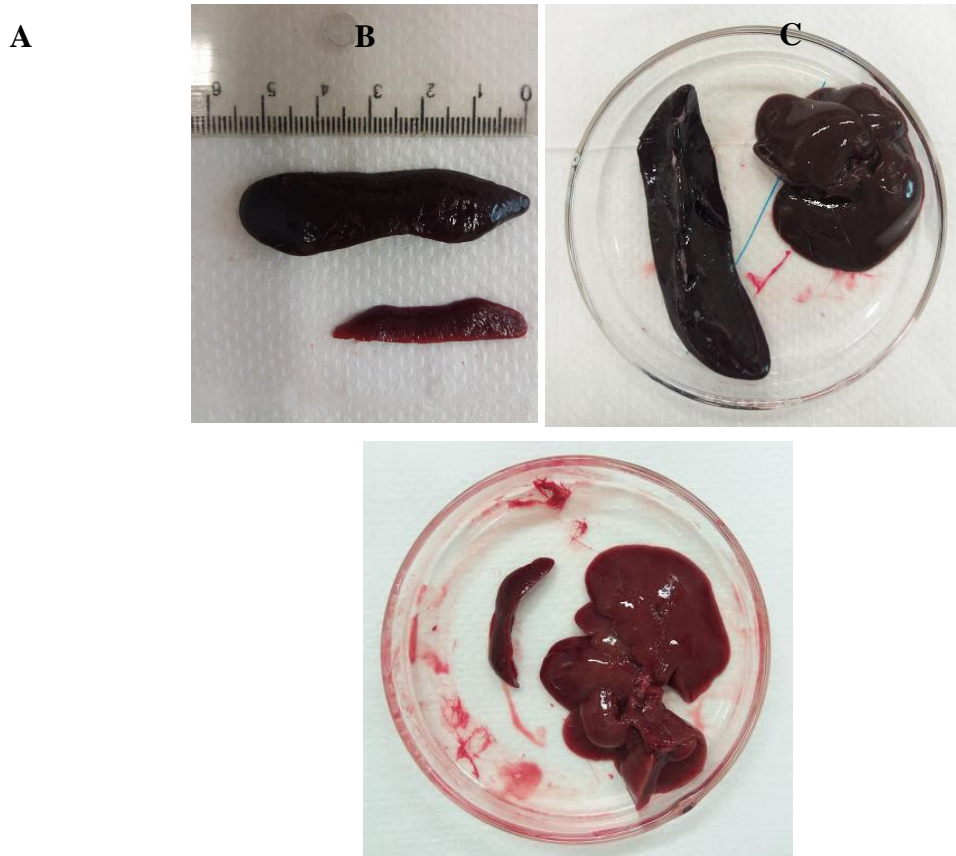
Figura 11 - Peso dos baços das fêmeas do grupo IV (grávidas inoculadas com *P. berghei* no dia 7 de gestação) e que morreram antes do dia da eutanásia programada.



Fonte: A autora, 2018.

Nota: Os baços foram removidos e pesados logo após a verificação da morte das ratas infectadas. A linha paralela ao eixo da abcissa representa a média dos pesos dos baços das fêmeas do grupo IV que sobreviveram até o 21º dia de gestação.

Figura 12 - Comparação entre os tamanhos, cor e aspecto externo do baço e fígado normal, típico de ratas não infectadas, e o baço aumentado e fígado escurecido de uma rata grávida infectada com *P. berghei* ANKA por ocasião da eutanásia no dia 21 de gravidez



Fonte: A autora, 2018.

Legenda: A: Comparação entre os baços de uma rata infectada e uma rata não infectada. B: Fígado e baço de uma rata infectada. C: Fígado e baço de uma rata não infectada.

5.3.3 Desfecho da gravidez de ratas controles (não inoculadas, GI) e inoculadas com *P. berghei* ANKA no dia 7 de gestação (GIV).

Quando comparado ao grupo I (grávidas não infectadas), não foi observado relevância nas observações de reabsorções e quantidade de filhotes no grupo IV (grávidas infectadas), como mostra a tabela 4.

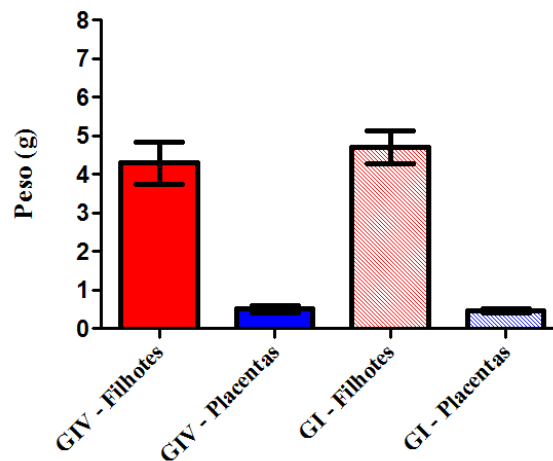
Foi observada uma leve diminuição na média de peso dos filhotes das mães infectadas em comparação com a média de peso dos filhotes das mães saudáveis, assim como um leve aumento do peso das placentas dos filhotes das mães infectadas quando comparados ao das mães não infectadas. As diferenças nos pesos de fetos e placentas não são relevantes (Figura 13).

Tabela 4 - Parâmetros registrados por ocasião da cesárea de ratas grávidas não inoculadas (GI) e infectadas com *P. berghei* ANKA (GIV) realizada no dia 21 de gestação. As cesáreas foram no dia da eutanásia programada ou logo após a morte das ratas em decorrência da infecção. Os valores são médias±DP.

Grupos:	GI-Controle	GIV	
	(não infectadas)	(inoculadas com <i>P. berghei</i> ANKA)	
Dia de gravidez da eutanásia ou morte não programada:	Eutanásia no dia 21	Eutanásia no dia 21	Morte no dia 21
N	15	16	3
Corpos Lúteos gravídicos, (N).	11,2 ± 2,2	12,6 ± 1,5	12 ± 3
Implantações, (N)	11,1 ± 2,1	12,0 ± 2,08	13,6 ± 2,1
Número total de reabsorções, (N)	0,9 ± 0,7	1,1 ± 1,4	0,6 ± 1,1
Reabsorções precoces, (N)	0,1 ± 0,3	0,2 ± 0,4	0
Reabsorções intermediárias, (N)	0,7 ± 0,7	0,9 ± 1,34	0,6 ± 1,1
Reabsorções tardias, (N)	0,1 ± 0,3	0	0
Tamanho da ninhada, (N)	10,3 ± 1,9	10,8 ± 2,2	13 ± 1
Peso dos fetos/filhotes, (g).	4,6 ± 0,4	4,4 ± 0,4	2,8 ± 0,54
Peso das placentas, (g)	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1

Nota: A ninhada foi a unidade de cálculo estatístico. As comparações estatísticas (teste t de Student) não revelaram diferenças entre as médias dos parâmetros do grupo controle (GI) e dos animais do grupo inoculado com *P. berghei* (GIV) que sobreviveram até a eutanásia programada para o dia 21 de gestação, porém revelaram diferenças entre as médias dos parâmetros do grupo controle (GI) e dos animais do grupo inoculado com *P. berghei* (GIV) que morreram no dia 21 de gestação.

Figura 13 - Comparação entre as médias (±DP) dos pesos dos fetos e das placentas das ratas grupos I (controle não inoculada) e IV (inoculadas com *P. berghei* ANKA no dia 7 de gravidez)



Fonte: A autora, 2018.

Nota: A ninhada foi a unidade de análise estatística. Os pesos foram obtidos após cesáreas realizadas no 21º dia de gestação.

6 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que, em ratas Wistar jovens (4 semanas de idade), originárias da colônia mantida pela FIOCRUZ, a injeção intraperitoneal de hemácias parasitadas com *P. berghei* ANKA resultou em infecção, com aumento gradual da taxa de parasitemia (% de hemácias parasitadas) até atingir um nível máximo (pico) por volta do 15º dia após a inoculação. Tal como descrito na literatura (QUINN & WYLER, 1980), após o 15º dia, há um decréscimo acentuado da taxa de parasitemia e resolução da infecção que, nas nossas ratas, ocorreu entre o 20º e 25º dia pós inoculação (Figura 4). Os níveis máximos de parasitemia alcançados em 02 (30 a 55%) das 04 ratas inoculadas são compatíveis com o que geralmente tem sido descrito na literatura (Quinn & Wyler, 1980). A terceira rata, porém exibiu percentuais de hemácias parasitadas mais baixos, sem apresentar claramente um pico, mas que evoluiu também para a resolução da infecção. Variações dos níveis máximos da taxa de parasitemia, e do curso desta, podem dever-se em parte às eventuais imprecisões da quantidade de parasitas (tamanho do inóculo) injetada ou, provavelmente, às variações da intensidade da resposta imune do hospedeiro. Digno de nota é o fato de uma quarta rata inoculada ter apresentado níveis crescentes de parasitemia até atingir 8% de hemácias parasitadas no 11º dia pós inoculação, quando exibiu quadro neurológico de instalação rápida caracterizado por sintomas como paralisia, ataxia, torpor, e incapacidade de abrir a boca, alimentar-se e beber água. Constatados estes sintomas compatíveis com quadro de malária cerebral, esta rata foi imediatamente submetida à eutanásia. Segundo Kamiyana et al (1987),

dependendo de certas condições, o *P. berghei* pode desencadear em ratos infectados um quadro neurológico semelhante ao da malária cerebral. Estes autores salientam que há uma dose ótima de parasitas (ou tamanho ótimo do inóculo) capaz de produzir malária cerebral (MC) em ratos, e que incidências mais baixas de MC são obtidas quando a dose ou tamanho do inóculo é maior ou menor do que aquele que é o mais eficaz. Kamiyama et al (1987) sugerem que não há uma clara correlação entre os níveis de parasitemia e o aparecimento de sintomas neurológicos compatíveis com malária cerebral em ratos.

Além disso, os dados apresentados nesta Dissertação indicam que ratas Wistar adultas (9 a 10 semanas de idade) não grávidas são muito mais resistentes à infecção pelo *P. berghei* ANKA do que as jovens procedentes da mesma colônia. Em experimento preliminar (Experimento II), 3 ratas adultas não grávidas inoculadas com o parasita não apresentaram hemácias parasitadas em nenhum dos sucessivos exames de distensões sanguíneas realizados até o 25º dia pós inoculação. No experimento principal (experimento III), envolvendo 10 ratas adultas não grávidas, hemácias infectadas não foram detectadas nos sucessivos exames de sangue de 5 ratas cujas taxas de parasitemia foram monitoradas até o 25º dia pós inoculação. Considerando conjuntamente os dois experimentos pode-se dizer que apenas 38,5% (5/13) das ratas adultas (9-10 semanas) não grávidas inoculadas com *P. berghei* ANKA desenvolveram a infecção. Esta proporção é muito inferior àquela (100%, 4/4) obtida quando o *P. berghei* ANKA foi inoculado em ratas jovens (4 semanas de idade). No grupo de ratas adultas não grávidas que desenvolveram a infecção, a doença foi bem mais branda, sem sintomas discerníveis, e com níveis máximos de parasitemia de apenas 2% ou menos, alcançados no 16º dia pós inoculação. O exame do sangue das ratas adultas não grávidas infectadas não acusou hemácias parasitadas 20 dias após a inoculação indicando que houve total remissão da doença (Figura 7).

O êxito da inoculação do *P. berghei* em fêmeas grávidas, e o curso clínico da infecção nessas ratas, foram consistentes com a hipótese levantada na Introdução desta dissertação de que a gravidez torna ratas adultas (9-10 semanas de idade) susceptíveis ao parasita. Em experimento preliminar (Experimento II) verificamos que 2 das 3 ratas que haviam acasalado com o macho (cópula comprovada pela presença de espermatozoides no lavado vaginal) exibiram um crescimento notável das taxas de parasitemia durante a gravidez, o que se tornou evidente a partir do 3º dia de infecção (10º dia de gravidez) como mostra a Figura 5. Em uma dessas fêmeas (F1) a taxa de parasitemia decresceu depois desse dia, não sendo o parasita detectado no sangue após o 19º dia de gravidez (12º dia pós inoculação). É possível que essa

rata (F1) tenha tido perdas gestacionais porque ela pariu apenas um filhote morto (natimorto) no 22º dia de gestação. A outra rata grávida inoculada com *P. berghei* exibiu um aumento gradual e consistente da parasitemia até dia do parto espontâneo, seguido por um rápido decréscimo dos níveis de hemácias parasitadas no período pós-parto (período de amamentação). Os parasitas desapareceram completamente do sangue da rata por volta do 25º dia pós-inoculação. Essa rata (F2) deu à luz a 11 filhotes vivos. A terceira rata (F3) exibiu apenas discreta e transitória elevação da taxa de parasitemia que prontamente retornou a zero. A rata F3 não tinha sítios de implantação visíveis no útero, indicando que neste caso não houve fecundação, ou então os produtos da concepção foram perdidos antes ou durante o período peri-implantação.

A escolha do dia 7 de gravidez (época em que ocorre a implantação do blastocisto no útero e tem início a placentação) para inoculação do parasita nas ratas grávidas se deveu à hipótese plausível de que a maior susceptibilidade das fêmeas grávidas resulta do acometimento da placenta (“malária placentária”). Como vimos, os resultados deste experimento preliminar foram consistentes com essa interpretação. A taxa de parasitemia da rata F2 decresceu rapidamente após o parto e expulsão das placentas. No caso da rata F1, a parasitemia diminuiu bem antes do parto, mas a ninhada resumiu-se a um único feto natimorto. Quando não foram detectadas implantações (caso da rata F3), indicando que a rata não estava grávida ou que a gestação não progrediu a ponto de formar a placenta, o percentagem de hemácias parasitadas foi muito baixa e não houve elevação consistente da parasitemia. De fato, vários estudos sugerem que a infecção pelo *P. falciparum* no homem, e pelo *P. berghei* em roedores (camundongos e ratos) durante a gravidez resulta em intensa infiltração de hemácias parasitadas na rede vascular da placenta (espaços intervilosos), um local onde o parasita está aparentemente protegido da resposta imune materna. Esta infiltração intensa de hemácias parasitadas na placenta, e a resposta a ela, parecem ser os eventos primariamente responsáveis por todas as complicações fetais, e pelos percentuais mais elevadas de hemácias parasitadas e maior gravidade da doença materna (SHARMA & SHUKLA, 2017, HVIID et al 2010, REEDER 2009, SABA et al 2008; NERES et al 2008, TEGOSHI et al 1992).

No experimento principal (Experimento III), 27 ratas comprovadamente grávidas (*i.e.*, gravidez confirmada pela presença de sítios de implantação no útero) foram inoculadas com o *P. berghei* no dia 7 de gestação. Destas fêmeas grávidas, apenas cinco não exibiram hemácias parasitadas nos sucessivos exames de distensões sanguíneas. Portanto, considerando

conjuntamente os experimentos preliminar e principal (II e III), a inoculação resultou no desenvolvimento de infecção em 83,3% (25/30) das ratas consideradas grávidas por terem acasalado. É possível que a rata F3 embora tivesse acasalado não tenha engravidado porque não tinha filhotes e sítios de implantação no útero. Se excluirmos essa rata o índice de sucesso seria ainda maior (86,2%; 25/29). De qualquer modo, este percentual de êxito da inoculação do *P. berghei* registrada entre as ratas grávidas é bem superior ao percentual observado entre as fêmeas não grávidas (38,5%) de idade idêntica e originárias da mesma colônia. Além disso, o curso da infecção (percentual de hemácias parasitadas) entre o dia da inoculação e o da eutanásia programada (cesárea no dia 21 de gestação) foi bem diferente como ilustrado na Figura 7. Enquanto entre as adultas não grávidas a taxa de parasitemia foi baixa (cerca de 2%), e sucedida pela rápida resolução da infecção até o 20º dia pós-inoculação, no caso das grávidas a taxa continuou a subir consistentemente até o dia da cesárea (dia 21 de gravidez, 14 pós- inoculação). É interessante notar que, entre as 6 ratas grávidas que foram inoculadas com o parasita e morreram antes do dia programado para eutanásia (*i.e.*, morreram espontaneamente nos dias 19, 20 ou 21), a parasitemia cresceu de forma contínua e atingiu no dia da morte taxas muito mais elevadas (40% de hemácias parasitadas) do que aquelas alcançadas no dia da eutanásia programada (6-7% de hemácias parasitadas). A magnitude da esplenomegalia confirma em linhas gerais as conclusões das comparações baseadas nas taxas de parasitemia. O peso dos baços das ratas grávidas infectadas foi muito superior ao peso do baço das ratas adultas não grávidas infectadas (Figura 9), e entre as grávidas infectadas o peso do baço das que morreram espontaneamente nos dias 20 e 21 foi maior do que o peso médio do baço das ratas infectadas que sobreviveram até o dia programado para eutanásia (dia 21 de gestação) (Figura 10).

Em resumo, esses resultados mostraram que a inoculação do *P. berghei* em ratas grávidas, no período em que ocorre a implantação do blastocisto e tem início a formação da placenta, levou à elevação progressiva e consistente da taxa de parasitemia e sintomas clínicos da infecção até a expulsão dos conceptos e placentas. Nos casos em que as taxas de parasitemia cresceram mais acentuadamente durante a gestação, as ratas morreram antes da data programada para a cesárea com indícios de terem entrado em trabalho de parto, mas sem sintomas neurológicos evidentes (*i.e.*, não notamos quadro compatível com malária cerebral entre as ratas grávidas infectadas que morreram nem entre aquelas que sobreviveram até a eutanásia programada). Esta evolução clínica da malária experimental em ratas grávidas para

quadros graves contrasta com a resistência à infecção apresentada por fêmeas não grávidas originárias da mesma colônia.

Como as ratas grávidas inoculadas com *P. berghei* ANKA apresentaram os sinais e sintomas clínicos da malária, avaliamos também o efeito da infecção materna sobre o desenvolvimento do conceito (embrião e feto). Neste sentido, um dos achados mais notáveis foi o fato de 6 das 23 ratas grávidas infectadas terem evoluído para óbito com indícios (e.g., aparecimento de sangramento vaginal) de início prematuro de trabalho de parto nos dias 19, 20 e 21 de gravidez. A moda da distribuição da duração da gestação de ratos coincide com as outras medidas de tendência central (média e mediana) e é 22 dias, com raros nascimentos espontâneos ocorrendo nos dias 21 e 23 de gravidez (dia da cópula = dia 0) (CHAHOUUD & PAUMGARTTEN, 2009). No grupo controle de 15 ratas grávidas não infectadas, por exemplo, não houve nenhum nascimento ou antecipado. É por essa razão que nos estudos de toxicidade para o desenvolvimento pré-natal as cesáreas para remoção dos fetos são programadas para o dia 21 de gravidez. O início prematuro do trabalho de parto (que neste caso evoluiu para a morte materna antes da completa expulsão de fetos e placentas), portanto, é um efeito que pode ser relacionado a prematuridade notada na malária placentária humana. A prematuridade e o baixo peso ao nascer (neonatos pequenos para a idade gestacional) são os dois desfechos adversos da gravidez mais comumente observados em mulheres (primíparas) que vivem em áreas endêmicas e tiveram malária (*P. falciparum* ou *P. vivax*) durante a gestação (MOORE et al 2017; TOBÓN-CASTAÑO et al 2011; SULLIVAN et al 1999).

Digno de nota é o possível papel da patologia placentária mediada pela infecção nestes desfechos adversos da gravidez e as relações do percentual de hemácias parasitadas com prematuridade e baixo peso ao nascer. Como mostrado na Tabela 4, o peso médio da placenta não diferiu entre mães controles (não infectadas) e mães infectadas submetidas à eutanásia (cesárea) no dia 21 de gravidez. Entretanto, o peso da placenta das ratas infectadas que entraram prematuramente em trabalho de parto (e morreram) no dia 21 foi muito superior (1,6 vezes) ao peso das placentas daquelas grávidas infectadas que não entraram em trabalho de parto e sobreviveram até a eutanásia programada. Esse aumento do peso da placenta aparentemente reflete o maior comprometimento deste órgão materno-fetal pela infecção, e está associado também a taxa de parasitemia bem mais elevada registrado nestas ratas. É plausível supor que o desfecho adverso da gestação mais grave e a morte materna estão associados ao quadro mais grave da malária placentária. Entretanto, à primeira vista, poderia haver dúvida se a maior gravidade da malária placentária seria causa ou consequência dos

percentuais mais elevados de hemácias parasitadas. A hipótese mais plausível, considerando todo o conjunto de informações obtidas (e.g. resistência de não grávidas a infecção), é a de que a maior gravidade da patologia placentária resultaria em percentuais mais elevados de hemácias parasitadas e não o contrário. Não é claro, e deve ser futuramente esclarecido, que outros fatores contribuíram para tornar a malária placentária mais grave nessas 6 ratas. É importante registrar que além das que entraram prematuramente em trabalho de parto no dia 21, as que morreram no dia 20 de gravidez também exibiam placentas mais pesadas. Todas as placentas removidas neste experimento foram fixadas para posterior exame anatomopatológico, cujos resultados poderão eventualmente corroborar essa hipótese. Infelizmente, não foi possível executar a análise histopatológica antes da conclusão da presente dissertação.

Resultado semelhante foi constatado em relação ao peso corporal dos fetos, uma das medidas mais confiáveis da maturidade do desenvolvimento intra-uterino em estudos experimentais. O diagnóstico clínico de neonatos pequenos para idade gestacional corresponde no experimento a fetos com peso corporal menor do que o daqueles fetos do grupo controle com a mesma idade gestacional. O baixo peso para a idade gestacional indica retardo do desenvolvimento pré-natal e pode ser causado por desnutrição intra-uterina por má-nutrição materna ou disfunções placentárias. Neste contexto, deve-se deixar claro que neonatos prematuros têm, via de regra, peso mais baixo do que as crianças nascidas à termo (no caso de bebês humanos, aqueles nascidos com 259 a 293 dias de gestação), mas podem ter ou não ter peso compatível com a média estabelecida para a idade gestacional (i.e., o neonato prematuro pode ter peso adequado para a idade gestacional). O peso fetal na prole de ratas infectadas com *P. berghei* ANKA, submetidas à eutanásia no dia 21 de gravidez, embora 5% menor (4,4 g versus 4,6 g), não diferiu estatisticamente daquele de ratas não infectadas do grupo controle. Todavia, os fetos das proles das 3 ratas infectadas que morreram no dia 21 de gravidez, e tinham, portanto, a mesma idade gestacional, exibiam peso corporal média que correspondia a apenas 60% do peso fetal médio (2,8 g versus 4,6 g) das ninhadas das ratas controles não-infectadas. Esses resultados sugerem que o quadro mais grave de disfunção placentária nesses casos (placentas maiores e parasitemia mais elevada) comprometeu as trocas de nutrientes entre mãe e feto via placenta e causou má-nutrição fetal.

Um dos resultados mais inesperados deste estudo foi a verificação que a infecção, mesmo nos casos de infecção materna e patologia placentária mais graves, não provocou um aumento discernível de perdas gestacionais, quer as precoces, intermediárias ou tardias

(Tabela 4). Uma possível interpretação deste fato é a dinâmica da infecção experimental e agravamento da patologia placentária. A infecção se deu do período peri-implantação (dia 7 de gravidez) e progrediu nos períodos embrionário e fetal, enquanto a placenta se desenvolvia para atender as necessidades crescentes do concepto. É provável que o agravamento da disfunção placentária tenha ocorrido apenas no período fetal avançado, impactando em desfechos fortemente relacionados a esse período (crescimento fetal e início do trabalho de parto), mas não em mortes embrionárias que são eventos muito mais precoces. Ratos (e camundongos) tem gestação curta e período fetal comparativamente curto em relação ao de outras espécies. No caso do homem (e primatas não humanos) o período fetal é muito mais longo e o impacto da infecção e patologia placentária na viabilidade fetal ou do neonato pode ser maior.

Um dos achados mais interessantes deste estudo foi a constatação da transmissão vertical da infecção na única ninhada de ratas infectadas (rata F2), que deram à luz espontaneamente (experimento II - preliminar) a filhotes vivos o que permitiu o acompanhamento pós-natal da prole (Figura 5, Tabela 2). Apenas 01 (uma fêmea) dos 11 filhotes da ninhada estava infectado apresentando ao longo do período de lactação sintomas como acentuada palidez, piloereção e prostração. No dia do desmame (dia 21 de vida pós-natal) o filhote infectado exibia uma parasitemia elevada (48% das hemácias parasitadas). Três dias após o desmame a parasitemia subiu para 83%, com poucas hemácias maduras e preponderância de reticulócitos, quadro clínico grave que evolui rapidamente (poucos dias) para o óbito. É digno de nota o fato da mãe (F2) ter tido o percentual máximo de hemácias parasitadas de cerca de 10% por ocasião do parto e que esta decresceu rapidamente após a expulsão dos conceptos e placentas indicando a doença evolui para a cura espontânea. No filhote infectado congenitamente, entretanto, a doença evolui clinicamente para morte com taxas elevadíssimas de parasitemia.

A malária congênita humana, ou a transmissão vertical da infecção, tem sido observada em área endêmicas de África e Ásia, principalmente em infecções pelo *P. falciparum* (STASSIJNS et al 2016; DOUAMBA et al 2014; QUÉDRAOGO et al 2012; POESPOPRODJO et al 2010; REDD et al 1996). Alguns estudos realizados na África encontraram hemácias parasitadas no cordão umbilical em 2,8 a 3,8% dos casos em que a mãe apresentava a doença (Douamba et al 2014, Quédraogo et al 2012). A transmissão vertical também foi relatada ocorrer ocasionalmente em camundongos Balb/c e ratos Wistar infectados experimentalmente com do *P. berghei* (ADACHI et al 2000; FISCHER 1996;

FABIANI et al 1951). Como o modo de transmissão transplacentária da malária ainda não foi elucidado, e há relativamente poucos estudos em modelos experimentais, pretendemos empregar este modelo em ratos para tentar esclarecer as relações entre as alterações placentárias e a infecção congênita, assim como os fatores predisponentes e protetores em relação a este desfecho adverso. Outro fato intrigante é gravidade da infecção congênita comparada à evolução não letal para a cura espontânea nos de infecção de ratos jovens casos (exceto o caso de malária cerebral), e a resistência de ratas adultas não grávidas à infecção.

Em síntese, neste estudo mostramos que ratas grávidas - ao contrário de ratas adultas não grávidas - são susceptíveis à infecção com *P. berghei* ANKA. A veracidade desta hipótese - o ponto de partida deste trabalho - foi, portanto, confirmada pelos resultados obtidos, o que nos permitirá utilizar o modelo para investigar os efeitos concomitantes da gravidez e infecção sobre a farmacocinética e passagem transplacentária de medicamentos antimaláricos. Adicionalmente, verificamos que na maioria dos casos a infecção de ratas grávidas evolui com sintomatologia branda e níveis crescentes, mas baixos, da parasitemia até a gravidez a termo. Nesses casos de parasitemia mais baixa em que não houve aumento de peso da placenta, exceto por um caso de transmissão vertical da infecção, não observamos efeito adversos da infecção materna sobre a prole. Em um grupo menor de ratas grávidas infectadas, em que as parasitemias foram muito mais elevadas e houve aumento do peso da placenta, notamos desfechos adversos da gravidez compatíveis com prematuridade e retardo do crescimento pré-natal. Essas ratas, entretanto, morreram espontaneamente antes do término da gravidez.

7 CONCLUSÃO

I. Ratas Wistar jovens (4 semanas) inoculadas com *P. berghei* ANKA desenvolveram, via de regra, quadro clínico de malária não-letal com taxas crescentes de parasitemia que, após atingir um pico de até 50%, evoluiu espontaneamente para a cura. Um dos ratos infectados desenvolveu sintomas neurológicos compatíveis com malária cerebral sendo submetido à eutanásia. Ratas adultas (9-10 semanas) não grávidas foram resistentes à infecção.

II. Ratas Wistar adultas (9-10 semanas) inoculadas com *P. berghei* ANKA no início da segunda semana de gravidez (período peri-implantação) desenvolveram a infecção com taxas crescentes de parasitemia. A susceptibilidade de ratas grávidas contrastou com a resistência de ratas adultas não grávidas à infecção.

III. Nos casos em que a gestação resultou em parto espontâneo, após o nascimento da prole, as taxas de parasitemia decresceram e a infecção evoluiu clinicamente para a cura. Foi possível comprovar um caso de transmissão vertical da malária (malária congênita) em um dos filhotes de uma ninhada de 11. Neste filhote os sintomas da infecção foram de excepcional gravidade (mas sem apresentar sinais de comprometimento cerebral) e as taxas

máximas de parasitemia foram extremamente elevadas, evoluindo o quando infeccioso para o óbito poucos dias após o desmame.

IV. Em 72,7% (16/22) das ratas grávidas inoculadas com *P. bergeri* ANKA, a infecção causou sintomas clínicos brandos e taxas de parasitemia crescentes, mas com valores máximos iguais ou inferiores a 10%. Nesses casos o peso médio das placentas das mães infectadas não diferiu do peso médio daquelas mães do grupo controle não-infectado; e não foram detectados indícios de retardo do desenvolvimento pré-natal da prole. As ratas restantes (27,3%), apresentaram acentuado aumento do peso da placenta (malária placentária), taxas máximas de parasitemia mais elevadas, entraram prematuramente em trabalho de parto e morreram. Neste grupo, além dos sinais consistentes com nascimentos prematuros, um dos efeitos relatados em casos de malária placentária humana, os fetos também foram pequenos para a idade gestacional. Em nenhuma das 22 ratas grávidas infectadas foram observados indícios de que a infecção resultou em perdas gestacionais (embrioletalidade) e malformações congênicas visíveis externamente.

V. Os resultados deste estudo, tal como previsto pela hipótese testada neste estudo, confirmaram que, apesar de ratas adultas não grávidas serem de fato resistentes à infecção, as ratas grávidas são passíveis de serem infectadas e, portanto, são modelos experimentais viáveis para investigar os efeitos da gravidez e da infecção e gravidez sobre a farmacocinética de medicamentos antimaláricos.

8 PERSPECTIVAS

Os desdobramentos do estudo apresentado nesta dissertação incluem a obtenção adicional de dados em material já coletado e ainda não analisado, assim como a realização de outras investigações para esclarecer alguns dos achados. Esses desdobramentos em perspectiva são:

1. Análise das concentrações de primaquina (PQ) nas amostras de plasma sanguíneo materno para esclarecer os efeitos da gravidez e infecção sobre a farmacocinética deste medicamento.
2. Realização de experimento complementar, medindo simultaneamente os níveis de PQ no sangue materno e fetal, para verificar se a infecção altera a passagem transplacentária da PQ.
3. Microdissecção (1/3 das ninhadas) para avaliação de anormalidades de tecidos moles e processamentos dos demais fetos fixados para análise de anomalias de esqueleto. Este desdobramento para complementar o estudo dos efeitos da infecção materna sobre o desenvolvimento embrio-fetal.

4. Exame histopatológico das placentas coletadas no experimento para melhor caracterização da malária placentária em ratos.
5. Realização de estudos adicionais tendo como foco a transmissão vertical da malária em ratos (infecção congênita), e se possível usar esse modelo para caracterizar os fatores predisponentes e protetores.
6. Investigar os efeitos da infecção materna sobre o desenvolvimento somático, neurológico, comportamental e cognitivo da prole.
7. Avaliar como a suscetibilidade a infecção varia ao longo da fase inicial de desenvolvimento pós-natal (período de lactação) e até a vida adulta e correlacionar a susceptibilidade a marcos do desenvolvimento (e.g., puberdade).

REFERÊNCIAS

- ADACHI, M.; YUDA, M.; ANDO, K.; SAKURAI, M.; CHINZEI, Y. Scant parasitemia in BALB/c mice with congenital malaria infection. **J Parasitol**, v. 5, n. 86, p. 1030-1034, 2000.
- CARMO, B. P. A. Estudo das alterações farmacocinéticas da primaquina durante a gravidez e na malária. Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 2015.
- BARILLAS-MURY C.; KUMAR S. Plasmodium-mosquito interactions: a tale of dangerous liaisons. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1539-1545, 2005.
- BOLCHOZ L. J; BUDINSKY R. A; MCMILLAN D, C; JOLLOW D. J. Primaquine-induced hemolytic anemia: formation and hemotoxicity of the arylhydroxylamine metabolite 6-methoxy-8-hydroxylaminoquinoline. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 297, p. 509–515, 2001.
- BRASIL. Ministério da saúde. Malária: Descrição da doença, 2014. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/malaria>. Acesso em: 25 de junho de 2018.
- BRASIL. Ministério da saúde. Manual de terapêutica da Malária. Superintendência de Campanhas de Saúde Pública – Sucam, 6ª edição, Brasília (DF), 2001. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/manu_terapeutica_malaria.pdf Acesso em: 25 de junho de 2018
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Ações de controle da malária. 1ª edição, 2006. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/acoes_controle_malaria_manual.pdf Acesso em 25 de junho de 2018.

CAMARGO E. P. Malária, maleita, paludismo. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 26-29, 2003.

CHAGAS, E. C. S.; NASCIMENTO C. T.; SANTANA FILHO F. S.; BÔTTO-MENEZES C. H.; MARTINEZ-ESPINOSA F. E. Malária durante a gravidez: Efeito sobre o curso da gestação na região amazônica. **Ver Panam Salud Publica**, v. 26, n. 3, p. 203-208, 2009.

CHAHOUD, I.; PAUMGARTTEN F. J. R. Influence of litter size on the postnatal growth of rat pups: is there a rationale for litter-size standardization in toxicity studies? **Environ Res**, v. 109, n. 8, p. 1021-1027, 2009.

CLYDE, D. F; Clinical problems associated with the use of primaquine as a tissue schizontocidal and gametocytocidal drug. **Bull World Health Organ**, v. 59, n. 3, p. 391-5, 1981

CONSTANTINO, L.; PAIXAO P.; MOREIRA R.; PORTELA M. J.; DO ROSARIO V. E.; ILEY J. Metabolism of primaquine by liver homogenate fractions: evidence for monoamine oxidase and cytochrome P450 involvement in the oxidative deamination of primaquine to carboxyprimaquine. **Exp Toxic Pathol**. v. 51, n. 4-5, p. 299-303, 1999.

DOUAMBA, Z.; DAO N. G.; ZOHONCON T. M.; BISSEYE C.; COMPAORÉ T. R.; KAFANDO J. G.; SOMBIE B. C.; OUERMI D.; DJIGMA F. W.; OUEDRAOGO P.; GHILAT N.; PIETRA V.; COLIZZI V.; SIMPORE J. Mother-to-Children *Plasmodium falciparum* Asymptomatic Malaria Transmission at Saint Camille. **Malar Res Treat**, v. 2014, 390513, 2014

FABIANI, G.; JAHIER H.; VARGUES R.; FULCHIRON G. Production of congenital malária in the rat and mouse by placental passage of *Plasmodium berghei*. **C R Seances Soc Biol Fil**, v. 145, n. 15-16, p. 1158-1159, 1951.

FISCHER, P. R.; Wistar rat-*Plasmodium berghei* model does not approximate human congenital malaria. **J Parasitol**, v. 82, n. 4, p. 635-637, 1996.

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

GANESAN S.; TEKWANI B. L.; SAHU R.; TRIPATHI L. M.; WALKER L. A.; Cytochrome P450 - dependent toxic effects of primaquine on human erythrocytes. **Tox App Pharm**, v. 241, n. 1, p. 14-22, 2009.

HVIID L.; MARINHO C. R.; STAALSOE T.; PENHA-GONÇALVES C. Of mice and women: rodent models of placental malaria. **Trends Parasitol**, v. 26, n. 8, p. 412-419, 2010.

IDOWU O. R.; PEGGINS J. O.; BREWER T. G.; KELLEY C. Metabolism of a candidate 8-aminoquinoline antimalarial agent, WR 238605, by rat liver microsomes. **Drug Metab Dispos**, v. 23, n. 1, p. 1-17, 1995.

KAMIYAMA T.; TATSUMI M.; MATSUBARA J.; YAMAMOTO K.; RUBIO Z.; CORTES G.; FUJII H. Manifestation of cerebral malaria-like symptoms in the WM/Ms rat infected with *Plasmodium berghei* strain NK65. **J Parasitol**, v. 73, n. 6, p. 1138-1145, 1987.

LAOSOMBAT V.; DHARMASAKTI S. Neonatal malaria in Southern Thailand. **J Trop Med Public Health**, v.12, n. 1, p. 99-106, 1981;12.

LOKE Y. W.; Transmission of parasites across the placenta. **Adv Parasitol**, v. 21, p. 155-228, 1982.

MACPHERSON G. G.; WARRELL M. J.; WHITE N. J.; LOOAREESUWAN S.; WARRELL D. A. Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. **American Journal of Pathology**, v. 119, n. 3, p. 385-401, 1958.

MOORE K. A.; SIMPSON J. A.; WILADPHAINGERN J.; MIN A. M.; PIMANPANARAK M.; PAW M. K.; RAKSUANSAK J.; PUKRITTAYAKAMEE S.; FOWKES F. J. I.; WHITE N. J.; NOSTEN F.; MCGREADY R. Influence of the number and timing of malaria episodes during pregnancy on prematurity and small-for-gestational-age in an area of low transmission. **BMC Med**, v. 15, n. 1, p. 117, 2017.

NERES R.; MARINHO C. R. F.; GONCALVES L. A.; CATARINO M. B.; PENHA-GONCALVES C. Pregnancy outcome and placenta pathology in *Plasmodium berghei* ANKA infected mice reproduce the pathogenesis of severe malaria in pregnant women. **PLoS One**, v. 3, n. 2, p. e 1608, 2008.

NOSTEN F.; MCGREADY R.; D'ALESSANDRO U.; BONELL A.; VERHOEFF F.; MENENDEZ C.; MUTABINGWA T.; BRABIN B. Antimalarial drugs in pregnancy: a review. **Curr Drug Saf**, v. 1, n. 1, p. 1-15, 2006.

ODUOLA A. M. J.; PHILLIPS J. H.; SPICER S. S.; GALBRAITH R. M. *Plasmodium berghei*: Histology, immunocytochemistry, and ultrastructure of the placenta in rodent malaria. **Experimental Parasitology**. v.62, n 2, p. 181-193, 1986.

OUÉDRAOGO A.; TIONO A. B.; DIARRA A.; BOUGOUMA E. C.; NÉBIÉ I.; KONATÉ A. T.; SIRIMA S. B.; Transplacental Transmission of *Plasmodium falciparum* in a Highly Malaria Endemic Area of Burkina Faso. **J Trop Med**, v. 2012, 109705, 2012.

PEDRONI H. C.; BETTONI C. C.; SPALDING S. M.; DALLA COSTA T. *Plasmodium berghei*: development of an irreversible experimental malaria model in Wistar rats. **Exp Parasitol**, v. 113, n. 3, p. 193-196, 2006.

POESPOPRODJO J. R.; HASANUDDIN A.; FOBIA W.; SUGIARTO P.; KENANGALEM E.; LAMPAH D. A.; TJITRA E.; PRICE R. N.; ANSTEY N. M.; Severe congenital malaria acquired in utero. **Am J Trop Med Hyg**, v. 82, n. 4, p. 563-565, 2010.

PRIMAQUINA®. Difosfato de primaquina. Farmanguinhos, FIOCRUZ. Farm. resp.: Carlos Araújo da Costa - CRF-RJ 2809. Disponível em: <http://www.far.fiocruz.br/wp-content/uploads/2017/03/Primaquina-Profsaude.pdf>. Acesso em: 25 de junho 2018

PYBUS B. S.; MARCSISIN S. R.; JIN X.; DEYE G.; SOUSA J. C.; LI Q.; CARIDHA D.; ZENG Q.; REICHARD G. A.; OCKENHOUSE C.; BENNETT J.; WALKER L. A.; OHRT C.; MELENDEZ V. The metabolism of primaquine to its active metabolite is dependent on CYP 2D6. **Malar J**. v. 12, p. 212, 2013.

QUINN T. C.; WYLER D. J. Resolution of Acute Malaria (*Plasmodium Berghei* in the Rat): Reversibility and Spleen Dependence. **Am J Trop Med Hyg**, v. 29, n. 1, p. 1 - 4, 1980

REDD S. C.; WIRIMA J. J.; STEKETEE R. W.; BREMAN J. G.; HEYMANN D. L. Transplacental transmission of *Plasmodium falciparum* in rural Malawi. **Am J Trop Med Hyg**, v. 55, n. 1, p. 57-60, 1996.

REEDER J. C. Malaria in pregnancy: getting grip with a sticky problem. **PNG Med J**, v. 42, p. 73-76, 1999.

SABA N.; SULTANA A.; MAHSUD I. Outcome and complications of malaria in pregnancy. **Gomal J Med Sci**, v. 6, n. 2, p. 98–101, 2008.

SALEWISHI E.; Faerbemethoden zum Makroskopischen Nachweis von Implantationsstellen am Uterus der Ratte. **Naunyn-Schmiedebergs Archiv fuer Experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v. 247, p. 367, 1964.

SARAIVA M. G. G.; AMORIM R. D. S.; MOURA S. A. M.; MARTINEZ-ESPINHOSA F. E.; BARBOSA M. G. V. Expansão urbana e distribuição espacial da malária no município de Manaus, Estado do Amazonas. **Rev. da Soc. Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, p. 515-522, 2009.

SHARMA L.; SHUKLA G. Placental Malaria: A New Insight into the Pathophysiology. **Front Med (Lausanne)**, v. 4, p.117, 2017.

STASSIJNS J.; VAN DEN BOOGAARD W.; PANNUS P.; NKUNZIMANA A.; ROSANAS-URGELL A. Prevalence and diagnostics of congenital malaria in rural Burundi, a cross-sectional study. **Malar J**, v. 15, n. 1, p. 443, 2016.

SULLIVAN A. D.; NYIRENDA T.; CULLINAN T.; TAYLOR T.; HARLOW S. D.; JAMES S. A.; MESHNICK S. R. Malaria infection during pregnancy: intrauterine growth retardation and preterm delivery in Malawi. **J Infect Dis**, v. 179, n. 6, p. 1580-1583, 1999.

TEGOSHI T.; DESOWITZ R. S.; PIRL K. G.; MAENO Y.; AIKAWA M. Placental pathology in *Plasmodium berghei*-infected rats. **Am J Trop Med Hyg**, v. 47, n. 5, p. 643-651, 1992.

TOBÓN-CASTAÑO A.; SOLANO M. A.; SÁNCHEZ L. G.; TRUJILLO S. B. Retardo no crescimento intrauterino, baixo peso ao nascer e prematuridade em recém-nascidos de grávidas com malária. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 3, p. 364-370, 2011.

VALE N.; MOREIRA R.; GOMES P. Primaquine revisited six decades after its discovery. **Eur J Med Chem**, v. 44, p. 937–953, 2009.

VASQUEZ-VIVAR J.; AUGUSTO O. Hydroxylated metabolites of the antimalarial drug primaquine. **J Biol Chem**. v. 267, p. 6848-6854, 1992.

VELÁSQUEZ C. M. R.; Suscetibilidade e resposta imune de mosquitos *Anopheles* (Diptera: Culicidae) da Região Amazônica Brasileira quando infectados experimentalmente por

Plasmodium vivax. Tese apresentada com vistas à obtenção do Título de Doutor em Ciências na área de concentração Biologia Celular e Molecular. Belo Horizonte, 2014.

VINCKE I. H.; LIPS M. Un nouveau plasmodium d'un rongeur sauvage du Congo *Plasmodium berghei* n. sp. **Ann Soc Belg Med Trop**, v. 28, n. 1, p. 97-104, 1948.

WHO. Malaria Report, 2015. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/>. Acesso em: 25 de junho de 2018.

WHO. Malária, 2016. Disponível em: https://www.paho.org/bra.../index.php?option=com_content&view=article&id=5287:malaria-2&Itemid=875. Acesso em: 25 de junho de 2018.

YAMAUCHI L. M.; COPPI A.; SNOUNOU G.; SINNIS P. Plasmodium sporozoites trickle out of the injection site. **Cell Microbiol.**, v. 9, n. 5, p. 1215-1222, 2007.