

TATIANA KARLA DOS SANTOS BORGES

INFLUÊNCIA DA PENTOXIFILINA SOBRE A INFECÇÃO MURINA POR *Plasmodium berghei* ANKA EM MODELOS SUSCEPTÍVEIS OU NÃO À MALÁRIA CEREBRAL.

Dissertação de Mestrado

Brasília, DF

2006

TATIANA KARLA DOS SANTOS BORGES

**INFLUÊNCIA DA PENTOXIFILINA SOBRE A INFECÇÃO
MURINA POR *Plasmodium berghei* ANKA EM MODELOS
SUSCEPTÍVEIS OU NÃO À MALÁRIA CEREBRAL.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Imaculada Muniz
Barboza Junqueira

Brasília, DF
2006

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Celular, área de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, Brasília-DF e foi realizado com recursos parcialmente providos do CNPq, processo número 74379/2003-5.4. Parte dos camundongos foi gentilmente cedida pela Fundação Oswaldo Cruz.

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos e amados filhos, Carolina e Matheus, tão pequenos, mas tão fortes e por suas vidas que tanto foram sacrificadas, por seus sorrisos que tantas vezes foram inibidos, pelos momentos sozinhos, pelas dúvidas e os medos, pela paciência, pelo esforço de entender, pelas lágrimas na minha ausência, pelo amor incondicional, pela alegria, por preencher meus dias, pelos teatros, pelas surpresas, pelos presentes, pela espera de minha volta, por serem a minha força de viver.

Este trabalho é para nós e por nós!

A Deus, meu pai, todo poderoso! Deus de misericórdia e de bondade, criador do céu e da terra...

Que cedeu amorosamente suas asas de proteção e me guiou durante este percurso. Que me acompanhou em todos os momentos. Deu-me força para seguir, saúde para trabalhar e discernimento para cumprir. Ajudou-me a ter paciência, a refletir, a ajudar. Iluminou meu caminho nas horas de tristeza, angústia e dificuldade. Floriu o meu jardim com vitórias e conquistas. E a minha mãe Maria, que em seus braços encontrei conforto e serenidade e que acalentou meus filhos quando não estava por perto. Sem os dois, eu não teria chegado a este momento!

Aos meus pais, Silas e Ivonete, minha família, meu porto seguro, que me ampararam em todos os momentos de minha vida, que padecem com meu sofrimento, que se alegram com minhas vitórias, que acompanham os meus passos, que se uniram em prol de minhas realizações. Por terem me ensinado responsabilidade, dignidade, coragem, objetividade e respeito. Por entenderem meu esforço e minha correria, que muito me afastaram do convívio familiar. Por terem acompanhado meu crescimento e trabalhado dobrado sacrificando os seus sonhos em favor dos meus e pelo vosso amor maior. A vocês, a quem muito amo, ofereço a minha vitória!

Ao meu querido amor, Maurício, pois muitas vezes, o nosso prazeroso convívio foi interrompido em favor das minhas atividades e por ter compreendido minha ausência e meus compromissos. Por ter segurado as minhas mãos e me conduzido, muitas vezes, pelo caminho. Por ter me ajudado nos momentos difíceis, pela sua confiança e presteza. Pelo seu exemplo de organização, força e hombridade. Pelo seu amor sempre presente ter sido força propulsora e encorajadora.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e amiga, Professora Dr.^a Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira, que pela oportunidade, me abriu um novo horizonte e me guiou para além das teorias e técnicas, transformando meus ideais em realizações, por repartir sua experiência profissional e de vida, o que auxiliou grandiosamente minha formação humana e profissional.

Ao meu amigo de mestrado, Paulo Cesar Tabanez, pelo seu companheirismo, sua gentileza, sua força nas horas de desânimo, sua objetividade, seu suporte e seu alegre convívio durante todo esse tempo. Por me ceder gentilmente seu computador. Pela ajuda tão grandiosa e tão necessária a realização deste trabalho. Pela superação dos problemas e obstáculos e por esta vitória que também é sua. Sem o seu auxílio, eu não teria chegado ao final deste trabalho com êxito.

À minha querida amiga e Professora Dr.^a Maria Augusta de Menezes, por seu exemplo de todos dias, de respeito ao que acredita, por fidelidade aos seus objetivos, pela coragem e sinceridade, pela experiência e sabedoria que tanto me ajudaram a acreditar no que eu realizava. Ainda pelo incentivo, pela cobertura, pelo apoio, pela confiança e pela oportunidade.

Ao querido Professor Dr. Carlos Eduardo Tosta, a quem admiro profundamente por sua serenidade e espiritualidade, pela sua experiência, pelo seu convívio agradável, por sua criatividade, ensinamentos e apoio.

Aos pesquisadores da Fundação Oswaldo Cruz, Dr. Cláudio Tadeu Daniel Ribeiro, Dr.^a Maria de Fátima Ferreira da Cruz e Dr. Leonardo José de Moura Carvalho, por nos ceder a cepa do *Plasmodium berghei* ANKA e parte dos camundongos CBA utilizados neste trabalho.

Aos meus irmãos, Alessandro e Katherine dos Santos Borges, a minha tia Maria de Fátima Benício dos Santos, minha cunhada Jackelline Cavalcante

do Nascimento Borges e ao meu enteado Daniel Batista Carneiro de Albuquerque, pelo apoio, pela amizade e incentivos em todas as horas.

Ao meu pai, Silas Guerra Borges, pela formatação e ajuda na correção deste trabalho e à minha mãe, Ivonete dos Santos Borges, pelos cálculos.

A Professora Sr^a Selma Aparecida Souza Kückelhaus, pela amizade, apoio e colaboração que tanto foram úteis para a finalização deste trabalho.

À Sr.^a Shirley Claudino Pereira Couto e René Oliveira Pires, pelo companheirismo e auxílio na preparação das substâncias e organização do laboratório.

Ao Sr. Nelson Pelet Nascimento pelo preparo dos meios de cultura e pelo auxílio com a parasitemia e ao Sr. José Siqueira da Silva pela confecção das lâminas usadas neste trabalho e ao Sr. Felício Salla Neto pela amizade.

A todos os meus estagiários, principalmente, ao Rodrigo Henrique Pereira Porto dos Santos e ao Jofran da Cruz Barroso, pelo auxílio nos cuidados com os animais e nos procedimentos deste trabalho.

Ao Centro Universitário de Brasília – UniCEUB – em nome da Professora Sr.^a Magda Verçosa e do Professor Sr. Carlos Alberto Júnior por ter gentilmente cedido espaço no biotério do Laboratório de Ciências – Labocien do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB, para a manutenção provisória dos animais.

Ao Seminário Laveran-Deane sobre Malária, organizado pela Fundação Oswaldo Cruz, por todas as sugestões importantes que auxiliaram no amadurecimento deste trabalho científico.

Aos meus colegas, amigos e professores, principalmente, à Miriam Cândida da Costa, Valdi Tutunji, Viviany Nicolau de Paula Dias Coelho e Tania Andrade pelo incentivo, apoio e cobertura nas aulas e a todos os que de uma maneira ou de outra auxiliaram na realização deste trabalho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao modelo experimental

Aquele que, inocentemente, foi alvo dos nossos estudos. Frágil e indefeso, porém, modelo importantíssimo para evolução do conhecimento científico.

Não se justificam os meios para chegarmos aos fins, mas é importante entender que sua vida permitiu que nós pudéssemos adentrar um pouco mais na complexidade de uma doença negligenciada, que ainda assola milhares de indivíduos, principalmente crianças, em regiões pobres do globo terrestre.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	XII
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVIII
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 Delineamento experimental	22
3.2 Tipo de estudo.....	24
3.3 Animais utilizados nos experimentos.....	24
3.4 Inóculo.....	25
3.5 Grupos de estudo.....	25
3.6 Peso.....	30
3.7 Hematócrito	30
3.8 Parasitemia	30
3.9 Curva de mortalidade espontânea dos animais infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA e tratados ou não com a pentoxifilina	31
3.10 Obtenção dos macrófagos peritoneais	32
3.11 Determinação da capacidade fagocitária dos macrófagos peritoneais.....	33
3.12 Preparação de leveduras para o teste de fagocitose.....	34
3.13 Preparação do pool de soro fresco para avaliação da fagocitose facilitada por opsoninas	35
3.14 Produção do peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais.....	35
3.15 Curva-padrão para a determinação do peróxido de hidrogênio.....	36
3.16 Padronização da dose ótima de acetato de forbol miristato (PMA) para determinar a produção do peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais de murinos	37

3.17	Produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais	38
3.18	Curva-padrão para determinação da produção de óxido nítrico	39
3.19	Padronização da dose ótima de lipopolissacarídeo (LPS) e interferon- γ (INF- γ) para avaliar a produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais	39
3.20	Produção de fator de necrose tumoral (FNT) nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais.....	40
3.21	Análise estatística.....	42
4	RESULTADOS.....	44
4.1	Influência da pentoxifilina sobre a sobrevivência de camundongos Balb/C não susceptíveis à malária cerebral infectados com o <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	45
4.2	Influência da pentoxifilina sobre a sobrevivência de camundongos CBA susceptíveis à malária cerebral infectados com o <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	46
4.3	Influência da pentoxifilina sobre a evolução do peso dos camundongos Balb/C não susceptíveis e CBA susceptíveis à malária cerebral durante a infecção malárica.....	48
4.4	Influência da pentoxifilina sobre a evolução do hematócrito	54
4.5	Influência da pentoxifilina sobre a evolução da parasitemia em camundongos CBA susceptíveis e camundongos Balb/C não susceptíveis à malária cerebral infectados com o <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	62
4.5.1	Aspectos morfológicos da parasitemia.....	64
4.6	Influência da pentoxifilina sobre a capacidade fagocitária dos macrófagos peritoneais dos camundongos CBA susceptíveis e Balb/C não susceptíveis à malária cerebral por <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	66
4.6.1	Fagocitose pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos....	67
4.6.2	Fagocitose pelos receptores para opsoninas.....	72
4.6.3	Aspectos morfológicos da fagocitose	78
4.7	Produção de fator de necrose tumoral	80
4.7.1	Produção de fator de necrose tumoral pelos camundongos Balb/C não susceptíveis à malária cerebral.....	80
4.7.2	Produção de fator de necrose tumoral pelos camundongos CBA susceptíveis à malária cerebral	83
4.7.3	Análise comparativa da produção de fator de necrose tumoral pelos camundongos Balb/C não susceptíveis e os CBA susceptíveis à malária cerebral	86

4.8	Produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais de camundongos CBA susceptíveis e Balb/C não susceptíveis à malária cerebral na infecção pelo <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	90
4.9	Produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais dos camundongos CBA susceptíveis e Balb/C não susceptíveis à malária cerebral na infecção pelo <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	93
4.10	Correlação dos dados	97
5	DISCUSSÃO	98
6	CONCLUSÃO.....	122
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
8	ANEXO DE TABELAS	148
9	ANEXO DE REAGENTES.....	175

LISTA DE ABREVIATURAS

[]	Concentração
AMA-1	Antígeno da Membrana Apical 1
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
CD106	VCAM
CD31	PECAM
CD36	Glicoproteína de diferenciação leucocitária, presente também na membrana de plaquetas, monócitos, células endoteliais, células epiteliais mamárias e em uma variedade de linhagens de culturas celulares. Desempenha importante papel no fenômeno de adesão, transdução de sinal e hematopatologia. O CD36 também é o receptor para trombospondina e eritrócitos infectados por malária.
CD54	ICAM-1
CD62E	Selectina endotelial
CD62P	Selectina plasmática
CD81	Tetraspanina
CEM	Campanha de Erradicação da Malária
CLAG9	Proteína de citoaderência ligado ao gene assexual do <i>Plasmodium</i>
CN	Célula citotóxica natural
CPH1	Complexo Principal de Histocompatibilidade do tipo 1
CPH2	Complexo Principal de Histocompatibilidade do tipo 2
CSP	Proteínas Circunsporozoíta
DBL	Proteínas de ligação do sistema Duffy do <i>P. falciparum</i> e <i>P. knowlesi</i>
DDT	Diclodifeniltricloroetano
DNA	Ácido dextrorribonuclêico
DO	Densidade óptica
DP	Desvio padrão
EBA-175	Proteína de ligação do Eritrócito
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ERK	Cinase regulada por sinais extracelulares
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FAD	Flavina adenina dicucleotideo
FMN	Flavina mononucleotideo

FNT	Fator de necrose tumoral
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GPI	Glicofosfatidilinositol
GSH	Glutaciona reduzida
GSH –Px	Glutaciona peroxidase
GSK-Rd	Glutaciona redutase
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IF	Índice fagocitário
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IM	Intramuscular
INF-γ	Interferon-gama
IP	Intraperitoneal
JNK	Cinase c-jun N terminal
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPKs	Proteínas cinases ativadas por mitógenos
MC	Malária cerebral
MEK	Cinase reguladora de mitógenos
MSP	Proteína da Superfície do Merozoíto
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NaOH	Hidróxido de sódio
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NHCO₃	Bicarbonato de sódio
NO	Óxido nítrico
NO₂	Dióxido de nitrogênio
NOS I ou nNOS	Enzima óxido nítrico sintase neuronal
NOS II ou iNOS	Enzima óxido nítrico sintase indutível
NOS III ou eNOS	Enzima óxido nítrico sintase endotelial
NOS	Enzima óxido nítrico sintase
O₂⁻	Íon superóxido
OH	Radical hidroxila

OH⁻	Íon hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Receptores para padrões de reconhecimento
Pb	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA
PDE	Fosfodieterase
PECAM	Molécula de adesão celular de plaquetas ao endotélio
<i>Pf</i> EMP1	Proteína de ligação à membrana eritrocitária do <i>P. falciparum</i> - 1
PIACM	Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária
PMA	Acetato forbol miristato
PTX	Pentoxifilina
R1FNT	Receptor 1 do fator de necrose tumoral
R2FNT	Receptor 2 do fator de necrose tumoral
RAF-1	Proto-oncogênese proteína cinase serina/treonina
RBL	Proteínas de ligação ao retículo <i>Pf</i> EMP1
RSP1/2	Proteína supressora do gene controlador de crescimento e proliferação celular RAS
SFB	Soro fetal bovino
SH	Sulfato de heparan
SOD	Superóxido dismutase
STF	Solução salina tamponada com fosfato
SVS	Secretaria de Vigilância Sanitária
TCD4+	Linfócito T CD4
TCD8+	Linfócito T CD8
TGF-β	Fator de transformação de crescimento beta
Th1	Resposta celular do tipo 1
Th2	Resposta celular do tipo 2
TOLL	Receptor para padrões de reconhecimento TOLL
TRAP	Proteína adesiva relacionada com a trombospondina
TSP	Trombospondina
VCAM	Molécula de adesão celular vascular

RESUMO

A malária é um dos problemas mais importantes de saúde pública mundial, devido sua grande morbi-mortalidade e sua ampla distribuição geográfica. As manifestações clínico-patológicas observadas na malária decorrem da hiperativação do sistema imunitário com produção aumentada de citocinas, particularmente do FNT, que participa da ativação do sistema imunitário e da defesa antiplasmódio, mas por outro lado, está envolvido nos mecanismos imunopatogênicos. A pentoxifilina é um inibidor da via de sinalização e transcrição do NF-κB que promove a transcrição de vários componentes da resposta imune, inclusive do FNT, podendo modular algumas funções do sistema imunitário. Este trabalho avaliou a influência da pentoxifilina sobre a evolução da malária e sobre as funções dos macrófagos em camundongos susceptíveis ou não à malária cerebral. Foram estudados camundongos Balb/C e CBA infectados com 10^6 eritrócitos parasitados por *Plasmodium berghei* ANKA, tratados a partir do terceiro dia de infecção com 8 mg/kg/dia de pentoxifilina ou com NaCl 0,9%. Outros dois grupos não infectados foram tratados com 8 mg/kg/dia de pentoxifilina ou com NaCl 0,9%. No oitavo dia de infecção, o sangue foi obtido para a determinação do FNT e os macrófagos foram recuperados da cavidade peritoneal para avaliação, *in vitro*, das funções imunológicas. A capacidade fagocitária dos macrófagos peritoneais foi avaliada pelo teste de fagocitose em placa sendo determinado o índice fagocitário. A produção de óxido nítrico foi determinada pela reação de Griess. O peróxido de hidrogênio foi determinado pelo teste de oxidação do vermelho de fenol na presença de peroxidase. O FNT foi avaliado no soro e nos sobrenadantes das culturas dos macrófagos pelo teste imunoenzimático. Foi avaliada também a influência da pentoxifilina sobre a parasitemia, o hematócrito, o peso e a mortalidade. O tratamento com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina aumentou em um dia o início da morte e em três dias a sobrevida dos camundongos Balb/C e retardou a parasitemia em quinze dias em relação aos animais não tratados. Nos camundongos CBA, a pentoxifilina não alterou a parasitemia nem influenciou o início da morte, porém, aumentou em treze dias a sobrevida dos animais. Enquanto, os camundongos Balb/C infectados e tratados morreram a partir do décimo segundo dia com parasitemia de 52,4%, anemia com hematócrito de 12,2% e menor perda de peso; os camundongos CBA morreram a partir do oitavo dia com uma parasitemia de 7,3% e hematócrito de 43%, entretanto a pentoxifilina não influenciou a evolução do peso. Foi observado que o tratamento com a pentoxifilina estimulou o aumento da capacidade fagocitária dos macrófagos peritoneais dos camundongos Balb/C, por

meio dos receptores para opsoninas, mas não alterou a fagocitose nos camundongos CBA. Observamos também que a produção de FNT é maior no sobrenadante das culturas de macrófagos peritoneais do que no soro e que a produção basal de FNT é maior nos camundongos Balb/C infectados e tratados do que nos camundongos CBA infectados e tratados. Observamos ainda que a pentoxifilina não alterou a produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais dos camundongos Balb/C e CBA infectados com *Plasmodium berghei* ANKA. Apesar do tratamento com pentoxifilina não ter alterado a produção basal ou estimulada de óxido nítrico nos camundongos Balb/C, a droga promoveu um aumento significativo da produção basal de óxido nítrico nos camundongos CBA infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA. Nossos dados sugerem que as duas cepas de camundongos apresentam mecanismos imunopatogênicos diferentes e que a hiperativação do sistema imunitário que ocorre nas formas graves da malária está relacionado provavelmente com as características genéticas do indivíduo, que determinarão o tipo de evolução da doença. Demonstram também que a pentoxifilina não interferiu de modo significativo na resposta do sistema imunitário envolvida na imunopatogenia nos camundongos Balb/C, não susceptíveis a forma cerebral da malária, melhorando inclusive alguns aspectos evolutivos da doença como a sobrevivência e o retardo da parasitemia. Sugerem, portanto, que a utilização da pentoxifilina como terapêutica complementar às drogas antiplasmodiais, na dose de 8mg/kg/dia, antes das manifestações clínicas de gravidade, deve ser avaliada em seres humanos, com o objetivo de diminuir a grande morbidade e mortalidade da malária.

ABSTRACT

Malaria has global importance in health care due to its high prevalence, worldwide geographic distribution and high morbidity and mortality. The pathophysiology and clinical manifestations of the disease are mainly caused by hyperactivation of immune system with high production of cytokines, mainly TNF, which may modulate several functions of the immune system. Furthermore, TNF is involved in anti-plasmodial defense. However, this cytokine may also participate in malaria immunopathology. Pentoxifylline is a phosphodiesterase inhibitor that has suppressive effect on TNF production by probably acting on NF- κ B signaling pathway. It has been shown that this drug can modulate many functions of the immune system. This work aimed to evaluate the influence of pentoxifylline on malaria outcome and on macrophage functions of susceptible (CBA) and not susceptible (Balb/C) mice to cerebral malaria. The Balb/C and CBA mice were injected with 10^6 *Plasmodium berghei* ANKA infected-erythrocytes, and after three days mice were treated with 8mg/Kg/day of pentoxifylline or NaCl 0,9%. Two other not infected groups were treated the same way. On the eightieth day after infection, blood was collected and macrophages were obtained from peritoneal cavity to assess, *in vitro*, immunological functions. Phagocytosis was evaluated by phagocytic index. Nitric oxide production was evaluated by Griess reaction. Hydrogen peroxide production was evaluated by phenol red oxidation. TNF production was assessed in serum and supernatant of peritoneal macrophage cultures by immunoassay test. Influence of pentoxifylline on parasitemia, hematocrit, body weight and mortality were assessed. Pentoxifylline increased in one day the beginning of death and in three days the survival time and delayed the increase of parasitemia in fifteen days in the Balb/C mice. Pentoxifylline did not influence parasitemia and neither influenced the beginning of death of the CBA mice. However, this drug increased thirteen days the survival time of these animals. While, infected-treated Balb/C mice began to die on twelfth day post-infection with 52,4% of parasitemia, 12,2% of hematocrit and less weight body loss, infected-treated CBA mice began to die on eighties day post-infection with 7,3% of parasitemia and 43% of hematocrit. Although pentoxifylline enhanced the phagocytic capacity of the Balb/C peritoneal macrophages by opsoninreceptors, it did not influence the phagocytosis of the CBA mice in both groups. TNF production by peritoneal macrophages was higher than TNF serum levels. Furthermore, the production of TNF by the infected-treated Balb/C group was higher than that produced by CBA group. Pentoxifylline did not influence hydrogen peroxide and nitric oxide production by macrophages of both CBA and Balb/C mice,

except for *Plasmodium berghei* ANKA infected-treated CBA mice, in which the treatment increased the production of this cytokine. Our findings suggest that both CBA and Balb/c mice show different immunopathological mechanisms and that the hiperactivation of immune system seems to be related to individual genetic features, which may determinate the malaria outcome. Moreover, pentoxifylline therapy did not influence the disease outcome and immune response of mice not susceptible to cerebral malaria (Balb/C), but it improved some features of the disease, such as survival and parasitemia. Our data suggest that pentoxifylline associated to anti-plasmodial therapy, before clinical manifestations of severity of the disease, should be evaluated to reduce the morbidity and mortality of severe human malaria.

INTRODUÇÃO

A malária é uma das doenças infecciosas humanas mais prevalentes e de importante expressão mundial por apresentar altas taxas de morbidade e mortalidade e por causar vulnerabilidade social e perdas econômicas, principalmente nos países pobres, onde as regras sociais e culturais, a política, a percepção da doença, as crenças, a situação econômica e o acesso a redes de saúde e ao tratamento, contribuem, ainda mais, para seu impacto social e econômico, sua transmissão e manutenção (Sachs & Malaney, 2002; Jones & Williams, 2004; Guinovart e cols, 2006).

A malária está presente em 105 países e mais de 50 % da população mundial estão expostas à doença, sendo que cerca de 300 a 500 milhões de casos novos surgem anualmente, ocasionando acima de 1 milhão de mortes anuais. O continente africano, contudo, detém 90% da mortalidade mundial, na sua maioria, de crianças menores de 5 anos de idade (Greenwood e cols, 1991; Breman e cols, 2004; Suh e cols, 2004; WHO, 2006).

No Brasil, apesar da redução expressiva do número de casos até 2002 (348.259 casos), desde 2003 observa-se novamente um aumento na incidência de casos da doença, refletindo a dificuldade na sustentação das estratégias de controle da malária no país. Segundo dados da Secretaria de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde na Amazônia Legal, em 2004 foram notificados 463.792 casos, concentrando-se a maioria na faixa etária de 15 a 49 anos (59%), seguido pelo grupo até 15 anos de idade, que representou 32% dos casos e pelo grupo acima de 49 anos com 9% dos casos (Bértoli & Moitinho, 2001; Silva-Júnior, 2005).

A malária é transmitida por fêmeas de *Anopheles* que ao fazerem repasto sangüíneo inoculam os esporozoítos na derme do hospedeiro (Pimenta e cols, 1994; Tadei & Dutary Thatcher, 2000). O esporozoíta é a forma infectante do parasita da malária que são protozoários pertencem ao gênero *Plasmodium* do filo Apicomplexa;

no entanto, somente 4 das mais de 100 espécies deste gênero infectam os seres humanos: *P. ovale*, *P. vivax*, *P. malarie* e *P. falciparum*. No Brasil, existem, de modo autóctone, somente as três últimas espécies, tendo sido o *P. falciparum* responsável por 14,3% do total de casos novos de malária no período de janeiro a agosto de 2003 (WHO, 2002; FUNASA, 2002; Souza & Riley, 2002).

Da derme, os esporozoítos alcançam um vaso sanguíneo e seguem até nos sinusóides hepáticos, onde infectam o hepatócito (Mota e cols, 2002; Mota & Rodriguez, 2004; Yuda & Ishino, 2004). Os plasmódios apresentam antígenos específicos já bem conhecidos que promovem a entrada do parasita no hepatócito, como a proteína circunsporozoíta (CSP) e proteína adesiva relacionada com a trombospondina (TRAP). Estas proteínas ao se ligarem especificamente a proteoglicana sulfato de heparan (SH) ou a tetraspanina chamada CD81, presentes na superfície do hepatócito, são capazes de promover a entrada do esporozoíto, tanto em camundongos quanto em humanos (Frevert e cols, 1993; Silvie e cols, 2003). No interior do hepatócito, os parasitas passam por uma reprodução assexuada esquizônica que produz merozoítos, formas capazes de infectar eritrócitos humanos.

A invasão do eritrócito pelo parasita envolve vários mecanismos, onde várias moléculas da superfície do plasmódio, como a proteína da superfície do merozoíto (MSPs), a proteína de ligação do eritrócito (EBA-175), o antígeno da membrana apical 1 (AMA-1) dentre outras, são capazes de se ligarem a diversos receptores na superfície da hemácia. Um dos mecanismos de entrada na célula ocorre pela sinalização na superfície celular via ácido siálico existente nas glicoforinas A, B, C que compõe a membrana da hemácia; por sua vez, esta sinalização pode estimular a ligação de proteínas do plasmódio, as chamadas DBLs (Proteínas de ligação do sistema Duffy) e as RBLs (Proteínas de Ligação ao Reticulócito), ao grupo

sangüíneo Duffy presentes na membrana da hemácia. Dentro dos eritrócitos, o *Plasmodium sp.* passa por outro ciclo esquizônico que tem como resultado a produção de merozoítos infectantes e de gametócitos. Esses últimos ao serem sugados pelo mosquito se reproduzem sexuadamente formando novos esporozoítos, completando o ciclo biológico (Talman e cols, 2004).

Durante seu desenvolvimento o plasmódio interage de várias maneiras com o organismo do hospedeiro, ou por mudar a superfície da membrana celular da hemácia, formando protusões que expressam antígenos do parasito, tais como PfEMP1, CLAG9 e RSP1/2, capazes de se ligar a diversos receptores do hospedeiro como o ICAM-1 (CD 54), VCAM-1 (CD106), PECAM (CD31), CD36, trombospondina (TSP), P-selectina (CD62P) e E-selectina (CD62E); ou por liberar moléculas que possuem um efeito orgânico sistêmico, como a molécula glicofosfatidilinositol (GPI) que tem a capacidade de se ligar ao receptor TOLL, estimulando uma resposta inflamatória no hospedeiro. O resultado das interações parasito-hospedeiro pode sofrer influência de vários fatores, como a taxa de multiplicação do parasito, a espécie do plasmódio, o polimorfismo e variação antigênica dos plasmódios. Além dos fatores relacionados ao parasita, fatores relacionados ao hospedeiro também influenciam no que resultará da relação entre ambos, como o grau de imunidade do hospedeiro, suas características genéticas, a idade, acrescidos de fatores sociais e geográficos que podem influenciar em aspectos como a rapidez do acesso ao tratamento. O somatório de todos estes fatores contribui para a expressão clínica variada da doença, ainda não totalmente compreendida, que pode se apresentar desde forma pouco sintomática até formas graves que podem causar a morte do indivíduo (Brown, 1999; Silamut e cols, 1999; Kyes e cols, 2001; Miller e cols, 2002, Nebl e cols, 2005).

O *Plasmodium falciparum* é o principal responsável pelas formas graves da malária humana, onde as alterações sistêmicas de vários tecidos e órgãos podem ocasionar anemia (Newton e cols, 1997; Kurtzhals e cols, 1999; Jakeman e cols, 1999; Menendes e cols, 2000), comprometimento pulmonar, que pode chegar a síndrome de angústia respiratória aguda, (Asiedu & Sherman, 2000; Anstey e cols, 2002; Maitland & Marsh, 2004), nefropatia (Barsoum, 2000; Naqvi e cols, 2003) e acometimento cerebral (Medana e cols, 2001) onde a mortalidade pode ocorrer em até 50% dos casos (Warrel, 1987).

A forma cerebral se expressa histopatologicamente pelo seqüestro de eritrócitos parasitados na microcirculação cerebral, assim como pela hemorragia e edema perivascular (MacPherson e cols, 1985; Sein e cols, 1993; Turner e cols, 1994). Fisiologicamente, a acidose metabólica causada pela infecção, juntamente com a constante hipóxia e reoxigenação no local de seqüestro são importantes causas de dano neurológico, conseqüentemente com perda de função neural e de integridade do tecido cerebral. Na malária cerebral, o aumento da expressão de adesinas nas células endoteliais da microvasculatura leva a aderência de hemácias parasitadas, leucócitos ativados e plaquetas ao endotélio, subseqüentemente causando obstrução ao fluxo vascular, hipóxia e dano a barreira hemato-encefálica (Miller e cols, 2002; Becker e cols, 2004).

As bases da imunidade clínica na malária ainda não estão totalmente esclarecidas, mas sabe-se que as respostas do sistema imunitário para controle da infecção pelo parasita são estágio-específicas e de extrema complexidade devido à magnitude e diversidade dos estímulos antigênicos. Os linfócitos T possuem um papel fundamental na proteção contra os plasmódios tanto em humanos quanto em roedores. Todavia, estes linfócitos podem influenciar a fisiopatologia da doença. O equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2, e conseqüentemente, entre a resposta pró-

e antiinflamatória determinam a evolução da parasitemia na malária, o grau de anemia, a gravidade clínica, a apresentação e a evolução da doença (Day e cols, 1999; Riley, 1999).

Na resposta pró-inflamatória ocorre produção de citocinas como o interferon-gama (INF- γ), interleucina 12 (IL-12) e fator de necrose tumoral (FNT), além de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, principalmente o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o óxido nítrico (NO). Esse tipo de resposta é crítica para a eliminação do plasmódio e estimula a fagocitose pelo macrófago e ativação do sistema complemento (Wenisch e cols, 1997), ambos envolvidos no controle da infecção. Por outro lado, a produção excessiva dos mediadores pró-inflamatórios contribui para a fisiopatologia das formas graves. Contudo, ainda não está totalmente esclarecido o mecanismo imunopatológico envolvido na doença (Malaguarnera & Musumeci, 2002; Sansanee e cols, 2004; Becker e cols, 2004).

O FNT é uma citocina pró-inflamatória pleiotrófica que parece apresentar um papel chave na patogenia das formas graves da malária. Ele é secretado principalmente por fagócitos mononucleares (Vijaykumar e cols, 2001) e neutrófilos (Chen & Sendo, 2001) em resposta a estímulos variados, como por exemplo, a molécula glicofosfatidilinositol (GPI), que está presente na MSPs dos plasmódios, ao se ligar nos receptores TOLL ativa as vias de sinalização intracelular ERK, JNK e NF- κ B nos macrófagos e neutrófilos, estimulando a produção de mediadores pró-inflamatórios (Zhu e cols, 2004).

Em 1987, Grau e cols demonstraram que camundongos CBA/Ca infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA apresentavam manifestações neurológicas e alterações histopatológicas semelhantes às aquelas observadas na forma cerebral da malária em seres humanos. Nestes animais os níveis séricos de FNT estavam muito elevados, enquanto que, o mesmo não ocorreu nos camundongos Balb/C infectados

com *P. berghei* e nos camundongos CBA/Ca infectados com *P. yoelli*, ambos resistentes à forma cerebral da malária. Em crianças e adultos, os níveis séricos de FNT estão mais elevados nos casos de malária grave letal do que nos casos não letais e encontram-se também mais elevados na malária cerebral quando comparados com as outras formas leves da doença (Grau e cols, 1989; Kwiatkowski e cols, 1990; Butcher e cols, 1990).

As funções biológicas do FNT ocorrem após a ligação de sua estrutura tri-dimensional (Eck & Sprang, 1989) aos receptores específicos 1 e 2 (R1FNT e R2FNT) expressos como proteínas de membrana em várias células, os quais podem também se apresentar como componentes solúveis no sangue (Zhang, 2004). Segundo McGuire e cols (1998), os níveis séricos destes receptores são semelhantes em crianças febris infectadas pelo *P. falciparum* quando comparadas com crianças normotérmicas com malária e crianças normais. Estes autores também demonstram que os receptores solúveis não bloqueiam o efeito pirogênico do FNT. Entretanto, Piguet e cols (2002) sugerem que a evolução da malária cerebral é dependente da produção excessiva de FNT e do tipo de receptor (R1FNT ou R2FNT) ao qual este FNT se ligará. Neste trabalho, Piguet e cols demonstraram que camundongos C57BL/6 nocauteados nos dois alelos codificantes do receptor R1FNT morriam com malária cerebral e os camundongos nocauteados nos dois alelos do R2FNT eram resistentes a esta forma da doença. Resultado semelhante foi observado por Lucas e cols, em 1997, em camundongos nocauteados nos genes codificantes do receptor de FNT 1 e 2; neste trabalho, nos cérebros de animais CBA/Ca, a expressão de R2FNT estava elevada e a de R1FNT estava normal, enquanto nos camundongos Balb/C, a expressão de ambos receptores era normal.

O FNT desempenha várias funções biológicas, entre elas estão: (a) a capacidade de induzir sua própria produção, além da síntese de outras citocinas

pró-inflamatórias, (b) ativar linfócitos T, (c) estimular a expressão das moléculas do complexo de histocompatibilidade principal 1 e 2 (CPH1 e CPH2) em várias células e (d) promover o extravasamento de leucócitos para o sítio de infecção (Goetz e cols, 2004). Na malária, o FNT foi capaz de inibir o crescimento *in vitro* do *Plasmodium falciparum* quando adicionado em co-culturas de células mononucleares humanas e eritrócitos infectados e de promover o aumento da fagocitose quando nestas culturas eram adicionados também anticorpos anti-*P. falciparum* (Muniz-Junqueira e cols, 2001). Por outro lado, a capacidade desta citocina estimular a expressão de moléculas de aderência no endotélio vascular, como ICAM-1, VCAM-1, PECAM, CD36 e TSP pode facilitar, quando produzida em excesso, a adesão aumentada de eritrócitos parasitados na microvasculatura cerebral ocasionando alterações na barreira hemato-encefálica, nas junções celulares que contribuem para obstrução do fluxo sanguíneo nestas vênulas e para a neurotoxicidade (Odeh, 2001; Gimenez e cols, 2003).

O FNT estimula a produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio pelos fagócitos por mecanismos ainda pouco esclarecidos, mas sabe-se que a via do NF- κ B está envolvida. Estas espécies reativas estão associadas aos mecanismos microbicidas contra o plasmódio, porém, podem também contribuir para a fisiopatologia da malária (Clark & Cowden, 2003; Becker e cols, 2004).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas fisiologicamente no metabolismo aeróbio de várias células nas quais, inicialmente, o O₂ sofre redução monovalente formando o íon superóxido (O₂⁻). Esta reação é catalisada por sistemas enzimáticos como a cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias, as enzimas metabolizadoras do ácido araquidônico (lipoxigenases e cicloxigenases), o citocromo p450, a xantina oxidase, peroxidases, a sintase do óxido nítrico, peroxidases e outras hemoproteínas (Cai, 2005). Outra fonte produtora de O₂⁻ é o

sistema NADPH oxidase nos leucócitos. Nos macrófagos não estimulados, os componentes deste sistema se encontram complexados tanto na membrana celular quanto no citosol; quando a célula é estimulada ou na fagocitose, os componentes do citosol se translocam para a membrana e transferem um elétron do NADPH para o oxigênio formando o O_2^- (Babior, 1999).

O oxigênio pode ainda sofrer uma redução divalente formando H_2O_2 pela catalisação da oxidase da xantina e a oxidase da glicose, contudo a maior quantidade desta molécula é proveniente da dismutação do O_2^- . Em pH fisiológico, a dismutação é rápida, porém ela é acelerada na presença de superóxido dismutase (SOD). Na presença de metais pesados, o H_2O_2 participa da reação de Fenton formando o radical hidroxila (OH); quando associadas as peroxidases como a catalase forma um composto que oxida o NO até formar o radical dióxido de nitrogênio (NO_2). O OH é tão reativo que geralmente retira um íon hidrogênio da molécula mais próxima danificando a estrutura celular. A reatividade do H_2O_2 em comparação ao OH é bem menor, o que propicia sua passagem pela bicamada lipídica, provavelmente pelos canais de água, e sua atuação tóxica à distância (Forman & Torres, 2001).

O estresse oxidativo causado pelo EROs, em níveis fisiológicos, promove sinais adaptativos e reparadores, todavia, quando a produção acentua-se, eles são capazes de causar a formação de pontes dissulfeto nas proteínas portadoras de grupamento tiol (-SH) com prejuízo de suas funções, promovem defeitos no reparo do DNA por meio de sinais apoptóticos, lipoperoxidação das membranas celulares com conseqüente perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, levando a célula à morte. Contudo, as células possuem um sistema de proteção capaz de atenuar os efeitos tóxicos dos EROs. Este sistema detoxifica as espécies reativas antes que causem lesão ou reparam a lesão. No primeiro caso, os

antioxidantes envolvidos são a glutathiona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), a catalase, a glutathiona peroxidase (GSH-Px) e a vitamina E; no segundo caso, o ácido ascórbico, a glutathiona redutase (GSK-Rd) e a GSH-Px (Ferreira & Matsubara, 1997).

Na malária, o papel do H_2O_2 não está totalmente esclarecido. Estudo realizado com camundongos C57BL/10 infectados com *P. berghei* K173, susceptíveis à malária grave, demonstrou que estes animais produzem quantidade significativamente menor de O_2^- e H_2O_2 do que camundongos da mesma cepa infectados com *P. yoelli* 17XNL, que apresentam uma infecção limitada, sugerindo que a produção de EROs influencia a evolução clínica na malária letal e não letal (Brinkmann e cols, 1984). O mesmo foi observado por Stevenson e cols (1992), ao trabalharem com camundongos C57BL/6 resistentes à infecção pelo *P. chabaudi* AS e camundongos susceptíveis A/J. Outros estudos indicam um efeito microbicida do H_2O_2 sobre o *P. yoelli* (Ockenhouse & Shear, 1984; Dockrell & Playfair, 1984) e *P. falciparum* (Ockenhouse e cols, 1984; Wozencraft e cols, 1984; Malhotra e cols, 1988), *in vitro*. Contudo, Hermsen e cols (1997) demonstram que os EROs possuem um papel no desenvolvimento da malária cerebral em camundongos C57BL infectados com *Plasmodium berghei* K173.

Estudos em pacientes com idade entre 15 e 37 anos infectados com *P. vivax* ou *P. falciparum*, mostraram que durante a malária não complicada, o estresse oxidativo está elevado e que este fato contribui para o controle da parasitemia, provavelmente devido ao aumento do H_2O_2 (Pabón e cols, 2003; Turrens, 2004). Por outro lado, o peróxido de hidrogênio parece estar relacionado com a anemia em pacientes com *P. vivax* (Meera e cols, 1999) e *P. falciparum* (Kremsner e cols, 2000), já que contribui para a peroxidação lipídica na membrana do eritrócito causando hemólise (Das & Nanda, 1999).

O óxido nítrico é uma espécie reativa de nitrogênio (ERN) muito importante para o sistema imunitário e para o organismo como um todo, pois é uma molécula mensageira inter e intracelular que possui inúmeras funções biológicas, entre elas a manutenção do tônus vascular, a regulação homeostática da pressão arterial, impede a agregação plaquetária, está envolvida na neurosinalização, além de auxiliar no combate direto do agente infeccioso ou limitar seu crescimento, regular a resposta inflamatória e de ser a molécula efetora da citotoxicidade mediada pelo macrófago contra patógenos (Brunet, 2001).

O NO pode ser produzido e atua em todas as células. Sua produção é mediada pelas enzimas óxido nítrico sintases (NOS) que estão virtualmente presentes em todas as células. Existem três isoenzimas diferentes de NOS: a neuronal (nNOS ou NOS I), a induzível (iNOS ou NOS II) e a endotelial (eNOS ou NOS III). A iNOS é a enzima responsável pela produção de NO em resposta aos estímulos das citocinas pró-inflamatórias como o FNT, INF- γ e IL-1, e antígenos de patógenos tais como o GPI (Nathan & Xie, 1994; Lyons, 1995; Tachado e cols, 1997; Alderton e cols, 2001).

Todas as NOS são constituídas por uma cadeia de polipeptídeo única com dois domínios: o domínio oxigenase N-terminal que contém um sítio catalítico para ligação da L-arginina e necessita de cofatores como o protoporfirinogênio IX (heme) e H₄B; e o domínio reductase C-terminal que contém duas flavinas como cofatores, a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e a flavina mononucleotídeo (FMN) que cataliza a transferência de elétrons do NADPH para a heme responsável pela ativação reducional do superóxido e oxidação da L-arginina. A biosíntese de NO ocorre quando a NOS, primeiramente, cataliza a hidroxilação da porção N-terminal do grupo guanidina presente na L-arginina e logo em seguida, realiza uma clivagem

oxidativa para formação de L-citrulina e NO em uma reação dependente de O_2^- e NADPH (Mansuy & Boucher, 2004).

Vários estudos tentam compreender o papel do NO na malária, entretanto ainda existem muitas controvérsias. Assim como o H_2O_2 , esta molécula possui efeitos benéficos auxiliando na defesa antiparasitária, mas por outro lado está também implicada na fisiopatologia das formas graves da malária (Sobolewski e cols, 2005a). Vários autores demonstram que o NO possui efeito antiparasitário contra *P. falciparum* e *P. chabaudi* (Rockett e cols, 1991; Taylor-Robinson, 1997; Taylor-Robinson & Looker, 1998; Taylor-Robinson & Smith, 1999), contudo o mesmo não foi evidenciado contra *P. berghei* (Asensio e cols, 1993; Sobolewski e cols, 2005b).

Em humanos, níveis elevados de espécies reativas de nitrogênio foram observados em pacientes com malária cerebral, principalmente naqueles que vieram a óbito e estes achados correlacionaram-se com a profundidade e a duração do coma e a evolução da doença (Al Yaman e cols, 1996; Agina & Abd-Allah, 1999). A produção aumentada de NO também foi observada nos casos de anemia associada à malária (Gyan e cols, 2002) e provavelmente este fato esteja associado ao aumento da expressão de iNOS nestes pacientes (Keller e cols, 2004). Alguns autores sugerem que o polimorfismo no gene NOS2A pode influenciar na evolução clínica da malária (Boutlis e cols, 2003; Clark e cols, 2003) tanto na forma cerebral (Burgner e cols, 1998), quanto na anemia grave (Hobbs e cols, 2003). Outra linha de pesquisa sugere que o NO reage avidamente com o oxigênio presente nas moléculas de hemoglobina. A detoxificação do NO pela hemoglobina pode influenciar na biodisponibilidade desta molécula propiciando uma resposta inflamatória maior e uma maior produção do superóxido. O superóxido pode seguir duas vias: a da dismutação que leva a produção de peróxido de hidrogênio, ou pode

reagir rapidamente com o NO formando o radical peroxinitrito que é extremamente tóxico, principalmente no cérebro (Sobolewski e cols, 2005a).

Estudos têm demonstrado que a pentoxifilina age inibindo a nível transcricional a produção do FNT (Han e cols, 1990), tanto *in vitro* (Lin e cols, 2004), *ex vivo* (Paradowski e cols, 1996) e *in vivo* (Das e cols, 2003) e conseqüentemente, pode influenciar na produção de espécies reativas de oxigênio (Paradowski e cols, 1996; Beshay e cols, 2001).

A pentoxifilina, 1-(5-oxohexil) 3,7-dimethyl xantina (PTX), tem sido usada clinicamente no tratamento de doenças vasculares, na isquemia aguda cerebral, doenças infecciosas, no choque septicêmico, na síndrome da angústia respiratória aguda e na endotoxemia (Lenoble Giovannangeli, 1989, Ji e cols, 2004; Adhikari e cols, 2004). A droga possui vários efeitos, entre eles, inibe a ativação plaquetária, promove a vasodilatação por aumento dos níveis de prostaglandina, previne a hipotensão retardada e a hiporeatividade vascular a noradrenalina, reduz a viscosidade sangüínea e a fluidez da membrana dos eritrócitos. Alguns estudos demonstram que a PTX devido ao seu efeito na microcirculação e na oxigenação periférica pode ser utilizada também na radioterapia, melhorando o efeito radiobiológico da irradiação e inibindo o reparo do DNA no tumor (Wu e cols, 1999; Böhm e cols, 2003; Nieder e cols, 2005).

A ação farmacobiológica da PTX está relacionada com sua capacidade de inibir uma enzima importante na sinalização celular, a fosfodiesterase (FDE), causando aumento da concentração celular de cAMP, que por sua vez, inibe o influxo Ca_2^+ , um dos mediadores intracelulares mais importante nas vias de sinalização do macrófago, inclusive na via do NF- κ B. Este efeito da PTX diminuindo a concentração de Ca_2^+ alteram a regulação do NF- κ B, importante fator de transcrição nuclear que atua na expressão de vários genes envolvidos na

imunidade, como os genes das proteínas de fase aguda, quimiocinas, fatores de crescimento, receptores destas proteínas, moléculas co-estimulatórias de membrana, moléculas de adesão e moléculas regulatórias de proliferação e apoptose e citocinas, como o FNT (Sun e cols, 1999; Caamaño e Hunter, 2002; MacEwan, 2002).

Por apresentar essas ações, a utilização da PTX tem sido avaliada como terapia coadjuvante no tratamento da malária, já que a droga pode inibir a atividade das citocinas inflamatórias envolvidas na fisiopatogenia das formas graves da doença (Prada e cols, 1993; Marcinkiewicz, 2000). Todavia, a aplicabilidade da PTX no tratamento da malária grave ainda é controversa. Em camundongos CBA/Ca inoculados com *Plasmodium berghei* ANKA tratados com PTX no primeiro dia da infecção, a droga preveniu o desenvolvimento da malária cerebral, inibiu o acúmulo de mRNA do FNT nos macrófagos desses animais, mas não influenciou a parasitemia (Kremsner e cols, 1991). Por outro lado, Santos-Neto e cols (1992) utilizando o mesmo modelo e tratando os animais com 8 mg/kg/dia de PTX, também no início da infecção, observaram elevação da parasitemia e uma mortalidade maior logo nos três primeiros dias da infecção, apesar do aumento na sobrevivência dos animais tratados.

O tratamento com pentoxifilina logo no primeiro dia de infecção promove maiores alterações histopatológicas. Enquanto, Stoltenburg-Didinger e cols (1993) observaram que o tratamento com a pentoxifilina no início da infecção malárica preveniu o dano celular nos neurônios do hipocampo de camundongos C57BL/6 infectados com o *Plasmodium berghei* K 173; Cunha e cols (1996) observaram que o cérebro de camundongos CBA tratados com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina desde o primeiro dia da infecção apresentaram lesões cerebrais com dano neuronal, porém sem alterações hemorrágicas. No pulmão, o tratamento com pentoxifilina iniciado

desde o primeiro dia de infecção, aumentou as áreas de necrose (Araújo e cols, 1995), com aumento do infiltrado septal pulmonar e edema alveolar, ocorrendo intensa aderência de células mononucleares e de eritrócitos ao endotélio vascular pulmonar (Siqueira e cols, 1996; Cavalcante e cols, 1997). Quando utilizada em uma fase mais tardia (3º dia), o tratamento com 8 mg/Kg/dia promoveu uma diminuição do edema no córtex cerebral e diminuição da necrose, microhemorragia e edema no hipocampo (Cunha e cols, 1997), enquanto Paula Jr (2003), utilizando a droga no terceiro dia de infecção não observou melhora evidente nas alterações histopatológicas cerebrais. No fígado, observa-se alterações histopatológicas compatíveis com uma melhor defesa anti-parasitária ocasionadas, provavelmente, pelo aumento da fagocitose pelas células de Kupffer após o tratamento dos animais com a PTX (Cavalcante e cols, 1996; Paula Jr, 2003).

Pelas observações no modelo experimental, a PTX deve ser utilizada não muito precocemente para não impedir os efeitos antiparasitários do fator de necrose tumoral, mas antes do aparecimento das formas graves da doença, sendo que na dose de 40 mg/kg/dia mostrou indícios de toxicidade, e os melhores resultados foram observados com a dose mais baixa de 8 mg/kg/dia; desta maneira a escolha da dose é essencial para a ação moduladora desejável da função dos macrófagos. O tratamento de camundongos CBA infectados com *P. berghei* ANKA com 8 mg/kg/dia de PTX a partir do terceiro dia de infecção retardou o aumento da parasitemia até após o quinto dia e melhorou a sobrevivência dos animais; provavelmente, porque a PTX modulou a função dos macrófagos, diminuindo a influência destas células na resposta exacerbada do sistema imunitário (Paula Jr, 2003).

Em 1995, Di Perri e cols utilizaram 10mg/kg/dia de PTX associada ao quinino no tratamento de crianças com malária cerebral observaram que o tempo de duração do coma foi abreviado e a mortalidade diminuiu no grupo de crianças que

recebeu o tratamento do quinino associado a PTX. Estes dados foram confirmados pelo estudo de Das e cols, em 2003, que trataram pacientes adultos em coma com quinino associado ou não a 10 mg/kg/dia de PTX e observaram também uma melhora da sintomatologia e diminuição do período do coma nos pacientes que receberam a PTX associada ao tratamento antiparasitário. Em ambos os estudos os níveis séricos de FNT diminuíram.

O mesmo não foi observado nos estudos de Hemmer e cols, em 1997, que utilizaram 20mg/kg/dia de PTX em associação com cloroquina em paciente adultos com diferentes formas da malária grave, porém nenhum com a forma cerebral. Neste estudo, a droga não modificou a evolução da doença e alguns pacientes apresentaram efeitos colaterais como náusea, complicações gastrointestinais e vertigens, sendo necessário a interrupção do tratamento. Em outro estudo, a PTX (40mg/kg/dia) associada ao artesunato foi utilizada no tratamento de adultos com malária grave incluindo 18 pacientes com a forma cerebral, todavia, também não foi observado nenhum benefício clínico pela associação da PTX ao tratamento (Looareesuwan e cols, 1998). Em ambos os trabalhos, não houve diminuição da produção de FNT, contudo Wenisch e cols (1998) apesar de não terem observado melhora na evolução do coma em adultos que fizeram uso de 20 ou 40mg/kg/dia de PTX associada ao artesunato puderam demonstrar a diminuição nos níveis de FNT quando a maior dose foi utilizada.

Apesar dos vários estudos realizados, o papel da PTX ainda não está bem estabelecido nas formas graves da malária. Várias observações, *in vitro* e *in vivo*, apontam para um efeito benéfico da droga sobre a evolução clínica de indivíduos ou animais susceptíveis à malária cerebral, possivelmente pela modulação das funções dos macrófagos e da produção exacerbada de FNT, mecanismos envolvidos na fisiopatogenia das formas cerebrais da doença. Entretanto, para que seu efeito seja

efetivo o tratamento com a droga deve ser realizado precocemente, antes do aparecimento dos parâmetros clínicos de gravidade da doença, como a anemia e o coma. Por outro lado, entre os mecanismos de defesa contra o plasmódio encontra-se a ação do FNT, por isso, a utilização da PTX deve ser iniciada apenas após o estabelecimento das ações benéficas do FNT e conseqüentemente, do NO e H₂O₂ (Muniz-Junqueira e cols, 2001, Paula Jr, 2003). Contudo, não é possível estabelecer *a priori* quais pacientes irão apresentar formas graves ou cerebral da malária, desta maneira, seria importante compreender melhor a influência desta droga em indivíduos com outras formas graves ou com malária não complicada, haja vista que, os mecanismos imunopatológicos são diferentes em cada situação e não está estabelecido ainda qual seria a resposta do sistema imunitário ao tratamento com a PTX em indivíduos que não desenvolveriam as formas graves da doença.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar comparativamente a evolução da malária nos camundongos Balb/C, resistentes à malária cerebral e os camundongos CBA, susceptíveis a forma cerebral da doença, quando infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA, verificando se o tratamento com pentoxifilina influencia as funções do sistema de fagócitos nos dois modelos. E, se ocorre possível influência desta droga na parasitemia, no hematócrito, no peso e na sobrevivência destes animais.

Para tal análise, foram realizados:

- 1) A avaliação da influência da pentoxifilina sobre a capacidade fagocitária dos macrófagos peritoneais, na ausência e na presença de opsoninas, *in vitro*, em camundongos Balb/C resistentes e nos CBA susceptíveis à malária cerebral infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA;
- 2) A avaliação da influência da pentoxifilina sobre a produção de peróxido de hidrogênio, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais dos camundongos Balb/C resistentes e dos CBA susceptíveis à malária cerebral infectados com *Plasmodium berghei* ANKA;
- 3) A avaliação da influência da pentoxifilina sobre a produção de óxido nítrico, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais nos camundongos Balb/C resistentes e nos CBA susceptíveis à malária cerebral infectados com *Plasmodium berghei* ANKA;
- 4) A avaliação da influência da pentoxifilina sobre a produção de fator de necrose tumoral pelos macrófagos peritoneais, *in vitro*, e seus níveis sérico

nos camundongos Balb/C resistentes e nos CBA susceptíveis à malária cerebral infectados com *Plasmodium berghei* ANKA;

- 5) A avaliação da influência da pentoxifilina sobre a sobrevivência dos camundongos Balb/C resistentes ou CBA susceptíveis à malária cerebral infectados com *Plasmodium berghei* ANKA;
- 6) A avaliação da influência da pentoxifilina sobre o peso corporal dos camundongos Balb/C resistentes e CBA susceptíveis à malária cerebral infectados com *Plasmodium berghei* ANKA;
- 7) A avaliação da influência da pentoxifilina sobre o hematócrito de camundongos Balb/C resistentes e CBA susceptíveis à malária cerebral infectados com *Plasmodium berghei* ANKA;
- 8) A avaliação da influência da pentoxifilina sobre a parasitemia nos camundongos Balb/C resistentes e nos CBA susceptíveis à malária cerebral infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

Foram constituídos dois grupos de estudos para a realização do presente trabalho, um grupo utilizando camundongos susceptíveis a malária cerebral da cepa CBA e outro utilizando camundongos não susceptíveis a malária cerebral da cepa Balb/C. Ambos foram subdivididos em quatro subgrupos, onde 2 subgrupos continham animais não infectados e os outros dois continham animais infectados com *Plasmodium berghei* ANKA. Sendo que os animais destes subgrupos foram tratados ou não com 8 mg/kg/dia de pentoxifilina. De todos os animais foram recuperados os macrófagos peritoneais para avaliações das funções dos fagócitos no oitavo dia da infecção. Os macrófagos peritoneais recuperados foram utilizados para avaliação da função fagocitária, da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e da produção de fator de necrose tumoral.

O hematócrito foi realizado nos terceiro, quinto, oitavo e vigésimo primeiros dias de infecção no grupo Balb/C e nos terceiro, quinto e oitavo dias de infecção no grupo CBA.

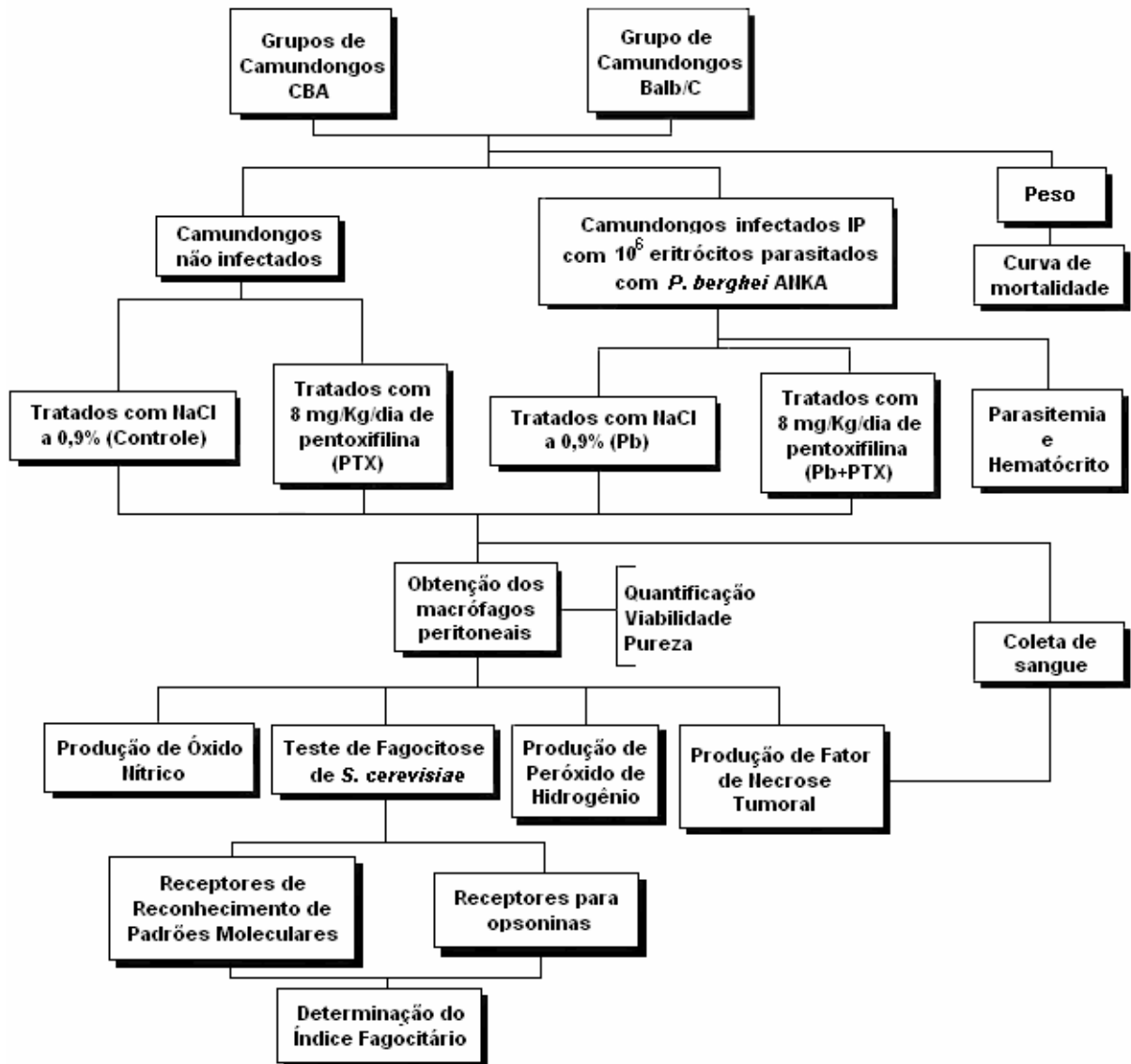
A parasitemia foi realizada pela avaliação do estiramento do sangue da ponta da cauda, nos 4º, 9º, 15º e 21º dia após infecção nos camundongos Balb/C e nos 3º, 5º e 8º dias nos camundongos CBA.

O sangue de todos os animais foi coletado no oitavo dia de infecção para determinação do FNT.

Foi realizada a curva de mortalidade espontânea dos animais tratados com 8 mg/kg/dia no modelo CBA e Balb/C ou 16 mg/kg/dia de pentoxifilina no modelo Balb/C em comparação com os animais tratados com salina. O peso dos animais foi avaliado diariamente.

O estudo seguiu o delineamento geral conforme discriminado abaixo:

Delineamento experimental



3.2. Tipo de estudo

Este estudo é do tipo experimental e foi realizado no Laboratório de Imunologia Celular, da área de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, utilizando camundongos CBA como modelo experimental susceptível à malária cerebral e camundongos Balb/C como modelo não susceptível à malária cerebral, ambos infectados ou não com o *Plasmodium berghei* ANKA.

Durante toda a realização deste trabalho, as normas éticas para a pesquisa científica com animais de laboratório foram rigorosamente obedecidas, conforme a determinação da lei número 6.638 de 8 de maio de 1979 e dos princípios éticos para experimentação com animais de laboratório, definidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1990). O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade de Brasília.

3.3. Animais utilizados nos experimentos

Os animais de ambas as cepas estudadas, acima descritas, eram machos, com idade entre 2 e 6 meses, tendo sido uma parte comprada do Centro de Bioterismo de Campinas - UNICAMP, Campinas, São Paulo e outra parte foi gentilmente cedida pela Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ.

Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas em grupos de no máximo cinco animais, com água e ração *ad libitum*, sob condições de luz e temperatura ambiente controladas. A ambientação dos camundongos Balb/C foi feita durante 30 dias no biotério da Faculdade de Saúde do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB antes da realização dos experimentos e a ambientação dos camundongos CBA foi feita durante 30 dias no alojamento de animais da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB.

3.4. Inóculo

A cepa do *Plasmodium berghei* ANKA foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Imunologia da Malária – Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ e mantida com solução preservadora de Alsevier em nitrogênio líquido. Para uso, uma alíquota era descongelada e sofria duas passagens em camundongo Swiss antes da infecção dos animais dos grupos de estudo para garantir a virulência da cepa. Os camundongos de passagem eram inoculados com 10^6 eritrócitos parasitados suspensos em solução salina tamponada com fosfato (STF), pH 7,2, estéril, por via intraperitoneal (IP) (Clark e cols, 1990; Kremsner e cols, 1991; Neill & Hunt, 1992).

O inóculo utilizado para infecção era obtido por punção cardíaca quando a parasitemia do camundongo Swiss encontrava-se acima de 10%. O número de eritrócitos totais na suspensão era quantificado em hemocítômetro de Neubauer e a determinação da parasitemia era feita em um distendido delgado, fixado com metanol e corado com coloração panótica, pela contagem de 500 eritrócitos.

3.5. Grupos de estudo

Para avaliar a função dos macrófagos peritoneais, os animais foram separados em dois grandes grupos: os da cepa Balb/C e os da cepa CBA.

Os animais da cepa Balb/C foram separados em quatro grupos:

Grupo Pb+PTX (Pb+PTX): no qual 12 camundongos Balb/C foram infectados por via intraperitoneal (IP) com 10^6 eritrócitos parasitados pelo *Plasmodium berghei* ANKA suspensos em 200 μ L de STF, pH 7,2, e tratados com 8mg/kg/dia de pentoxifilina (Trental, lote 106708, Laboratório Aventis Pharma LTDA) diluída em 50 μ L de NaCl 0,9%, pH 7,2 (Santos-Neto e cols, 1992; Araújo e cols, 1995), por via

intramuscular (IM), de 12 em 12 horas, a partir do terceiro até o oitavo dia da infecção. A média \pm DP do peso destes animais foi de 32,5g \pm 1,4g.

Grupo Pb: no qual 13 camundongos Balb/C foram infectados por via IP com 10^6 eritrócitos parasitados pelo *Plasmodium berghei* ANKA, suspensos em 200 μ L de STF, pH 7,2 e tratados com 50 μ L de NaCl 0,9%, pH 7,2, IM, a partir do terceiro até o oitavo dia da infecção, de 12 em 12 horas. Sendo a média \pm DP do peso destes animais de 32,7g \pm 1,2g.

Grupo PTX: no qual 13 camundongos Balb/C não infectados receberam, por via IP, 200 μ L de STF, pH 7,2, no primeiro dia e foram tratados, por via IM, com 8 mg/kg/dia de pentoxifilina (Trental, lote 106708, Laboratório Aventis Pharma LTDA) diluída em 50 μ L de NaCl 0,9%, pH 7,2, de 12 em 12 horas, a partir do terceiro até o oitavo dia da infecção. Sendo a média \pm DP do peso destes animais de 31,1g \pm 1,0g.

Grupo Controle Normal: no qual 13 camundongos Balb/C não infectados receberam 200 μ L de STF, pH 7,2, por via IP, no primeiro dia do experimento e foram tratados a partir do terceiro até o oitavo dia de experimentação com NaCl 0,9%, pH 7,2, por via IM, de 12 em 12 horas. Sendo a média \pm DP do peso destes animais de 31,0g \pm 1,1g.

Os animais da cepa CBA foram separados também em quatro grupos:

Grupo Pb + PTX: no qual 5 camundongos CBA foram infectados por via intraperitoneal (IP) com 10^6 eritrócitos parasitados pelo *Plasmodium berghei* ANKA

suspensos em 200µL de STF, pH 7,2, e tratados com 8mg/kg/dia de pentoxifilina (Trental, lote 106708, Laboratório Aventis Pharma LTDA) diluída em 50µL de NaCl 0,9%, pH 7,2 (Santos-Neto e cols, 1992; Araújo e cols, 1995), por via intramuscular (IM), de 12 em 12 horas, a partir do terceiro até o oitavo dia da infecção. Sendo a média ± DP do peso destes animais de 21,3g ± 2,2g.

Grupo Pb: no qual 4 camundongos CBA foram infectados por via IP com 10⁶ eritrócitos parasitados pelo *Plasmodium berghei* ANKA, suspensos em 200µL de STF, pH 7,2 e tratados com 50µL de NaCl 0,9%, pH 7,2, IM, a partir do terceiro até o oitavo dia da infecção, de 12 em 12 horas. Sendo a média ± DP do peso destes animais de 21,8g ± 2,0g.

Grupo PTX: no qual 3 camundongos CBA não infectados receberam por via IP, 200µL de STF, pH 7,2, no primeiro dia e foram tratados, por via IM, com 8mg/kg/dia de pentoxifilina (Trental, lote 106708, Laboratório Aventis Pharma LTDA) diluída em 50µL de NaCl 0,9%, pH 7,2, de 12 em 12 horas, a partir do terceiro até o oitavo dia da infecção. Sendo a média ± DP do peso destes animais de 19,3g ± 2,8g.

Grupo Controle Normal: no qual 3 camundongos CBA não infectados receberam 200µL de STF, pH 7,2, por via IP, no primeiro dia do experimento e foram tratados a partir do terceiro até o oitavo dia de experimentação com NaCl 0,9%, pH 7,2, por via IM de 12 em 12 horas. Sendo a média ± DP do peso destes animais de 19,3g ± 3,2g.

Para avaliar a parasitemia, a sobrevivência, o hematócrito e o peso, os animais foram separados em dois outros grandes grupos: os da cepa Balb/C e os da cepa CBA, sendo formado dois subgrupos de cada cepa:

Grupo Pb + PTX: no qual 13 camundongos do grupo CBA e 20 camundongos do grupo Balb/C foram infectados por via intraperitoneal (IP) com 10^6 eritrócitos parasitados pelo *Plasmodium berghei* ANKA suspensos em 200 μ L de STF, pH 7,2, e tratados com 8 mg/kg/dia de pentoxifilina (Trental, lote 106708, Laboratório Aventis Pharma LTDA) diluída em 50 μ L de NaCl 0,9%, pH 7,2 (Santos-Neto e cols, 1992; Araújo e cols, 1995), por via intramuscular (IM), de 12 em 12 horas, a partir do terceiro até o oitavo dia da infecção. Sendo a média \pm DP do peso destes animais de 21,3g \pm 2,2g.

Grupo Pb: no qual 10 camundongos do grupo CBA e 10 camundongos do grupo Balb/C foram infectados por via IP com 10^6 eritrócitos parasitados pelo *Plasmodium berghei* ANKA, suspensos em 200 μ L de STF, pH 7,2 e tratados com 50 μ L de NaCl 0,9%, pH 7,2, IM, a partir do terceiro até o oitavo dia da infecção, de 12 em 12 horas. Sendo a média \pm DP do peso destes animais de 21,8g \pm 2,0g.

Um outro subgrupo de camundongos foi utilizado no estudo para avaliar a sobrevivência dos camundongos Balb/C:

Grupo Pb + PTX 16: no qual 10 camundongos do grupo Balb/C foram infectados por via intraperitoneal (IP) com 10^6 eritrócitos parasitados pelo *Plasmodium berghei* ANKA suspensos em 200 μ L de STF, pH 7,2, e tratados com 16mg/kg/dia de pentoxifilina (Trental, lote 106708, Laboratório Aventis Pharma

LTDA) diluída em 50µL de NaCl 0,9%, pH 7,2 (Santos-Neto e cols, 1992; Araújo e cols, 1995), por via intramuscular (IM), de 12 em 12 horas, a partir do terceiro até o oitavo dia da infecção. Sendo a média \pm DP do peso destes animais de 21,3g \pm 2,2g.

Não houve diferença estatística entre as médias dos pesos dos animais dos diferentes grupos de camundongos Balb/C, $p= 0,635$, pelo teste ANOVA; nem entre as médias de peso dos diferentes grupos de camundongos CBA, $p= 0,819$, pelo teste de Kruskal-Wallis. Porém, o peso dos animais do grupo CBA foi significativamente menor do que o dos animais do grupo Balb/c, $p<0,001$, Mann-Whitney.

Os animais utilizados para avaliação da função dos macrófagos peritoneais foram anestesiados com éter e sacrificados por deslocamento cervical no oitavo dia da infecção malárica e imediatamente após o sacrifício foram coletados os macrófagos peritoneais para a avaliação da função fagocitária, produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e fator de necrose tumoral alfa. O sangue para obtenção de soro foi coletado no oitavo dia de infecção por punção do plexo ocular

Nos outros animais, o sangue da ponta da cauda foi utilizado para a avaliação da parasitemia e do hematócrito: a parasitemia foi realizada nos quarto, nono, décimo quinto e vigésimo primeiro dias após infecção no grupo Balb/C e no terceiro, quinto e oitavo dia no grupo CBA; o hematócrito foi realizado no terceiro, quinto e oitavo dia de infecção nos dois modelos e também no vigésimo primeiro dia de infecção no camundongo Balb/C. O peso foi computado desde o dia da infecção até o dia da morte espontânea dos animais.

Durante a avaliação da sobrevida, observamos que os animais do grupo CBA apresentaram sinais clínicos de malária cerebral, como ataxia, movimento circular,

paralisia, convulsão e coma e nos camundongos Balb/C, sinais clínicos de anemia como palidez de mucosas (Grau e cols, 1987).

3.6. Peso

O peso dos camundongos foi aferido desde o dia da infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA até o dia da morte espontânea, sempre pela manhã e na mesma balança (CT200-S Portable-advanced - Ohaus) e expresso em gramas (g).

3.7. Hematócrito

O hematócrito indica a percentagem de hemácias no volume sanguíneo e é dependente do volume de plasma, da produção de hemácias e do tamanho das hemácias, sendo um dos parâmetros para avaliar a presença de anemia ou monitorar a evolução da mesma. Para avaliar a influência do tratamento com pentoxifilina sobre o hematócrito, o sangue da ponta da cauda foi coletado nos terceiro, quinto e oitavo dias de infecção malárica e também no vigésimo primeiro dia de infecção nos camundongos Balb/C, em capilar de vidro heparinizado e centrifugado em 700g, durante 10 minutos.

3.8. Parasitemia

Para avaliar a influência do tratamento com pentoxifilina sobre a parasitemia, lâminas com um distendido delgado foram confeccionadas utilizando o sangue da ponta da cauda, no 4º, 9º, 15º e 21º dia após infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA, nos camundongos Balb/C e no 3º, 5º e 8º dia após a infecção, nos camundongos CBA. Os esfregaços eram então corados utilizando kit rápido de coloração panótica (Newprov, Paraná-Brasil) que se constitui de um fixador

(Solução de ciclohexadieno a 0,1%), um corante ácido (Solução de azobenzenosulfônico a 0,1%) e um fixador básico (solução de fenotiazina a 0,1%).

Para a determinação da parasitemia, foram analisados 500 eritrócitos por lâmina e foi quantificada a porcentagem de eritrócitos infectados por microscopia óptica com aumento de 1000X, utilizando-se um retículo de contagem adaptado à lente da ocular do microscópio.

3.9. Curva de mortalidade espontânea dos animais infectados com *Plasmodium berghei* ANKA e tratados ou não com a pentoxifilina

Com o objetivo de verificar a influência do tratamento com a pentoxifilina sobre a sobrevivência dos camundongos com malária, 20 camundongos CBA e 40 camundongos Balb/C foram infectados com 10^6 eritrócitos parasitados pelo *P. berghei* ANKA (Clark e cols, 1990), sendo que destes 10 camundongos CBA infectados (Grupo Pb+PTX) e 20 camundongos Balb/C infectados (Grupo Pb+PTX 8) receberam tratamento com 8 mg/kg/dia de pentoxifilina e 10 camundongos Balb/C infectados (Grupo Pb+PTX 16) receberam tratamento com 16 mg/kg/dia de pentoxifilina, de 12 em 12 horas, a partir do terceiro dia da infecção; para comparação 10 animais CBA e 10 animais Balb/C infectados foram tratados com NaCl 0,9% (grupos Pb).

O dia da morte espontânea de cada animal foi computado e a curva de sobrevivência segundo Kaplan-Meier foi construída para análise comparativa entre os grupos Pb e Pb+PTX de cada cepa de animais, susceptíveis (CBA) ou não (Balb/C) à malária cerebral.

Não houve diferença na média de peso entre os grupo Pb e Pb+PTX dos camundongos Balb/C, $p=0,989$, pelo teste t , e nem entre os grupos de camundongos CBA, $p=0,145$, pelo teste de Mann-Whitney.

3.10. Obtenção dos macrófagos peritoneais

Após pesagem, os animais eram anestesiados com éter etílico e sacrificados por deslocamento cervical. Para a coleta dos macrófagos peritoneais, os animais eram fixados pelos membros superiores e inferiores em decúbito dorsal e feita uma anti-sepsia da parede abdominal com álcool a 70%. A pele da parte central do abdômen e a membrana peritoneal eram delicadamente levantadas com uma pinça hemostática e uma pequena incisão era feita com tesoura fina de ponta romba para dar acesso a cavidade peritoneal. Por esta pequena abertura eram injetados 10mL de STF estéril, 0,15M, gelada, pH 7,2, em seguida a incisão era obliterada por pinça hemostática para que a cavidade abdominal fosse delicadamente massageada. O líquido era recuperado por aspiração com pipeta Pasteur de vidro estéril inserida no flanco esquerdo. Este procedimento de lavagem era repetido até que se obtivesse 10mL de líquido da cavidade peritoneal.

O líquido recuperado do lavado peritoneal era centrifugado a 200g, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante era desprezado e as células ressuspensas em 2mL de meio de cultura RPMI 1640, pH 7,2 (Sigma, EUA), acrescido de 20mM de HEPES (Sigma, EUA), 26,4mL/L de NaHCO_3 a 7,5% e 25mg/L de gentamicina. Logo após, as células eram quantificadas e avaliadas em sua viabilidade, em hemocítômetro de Neubauer utilizando solução de nigrosina a 0,05% na proporção de 1:5 e depois as células eram novamente suspensas, em RPMI 1640, pH 7,2, para serem utilizadas nos vários testes funcionais (Muniz-Junqueira e cols, 1992).

3.11. Determinação da capacidade fagocitária dos macrófagos peritoneais

A fagocitose era feita em placa de 24 escavações, estéril (TPP – Zellkultur Testplate - Suíça), contendo lamínulas de vidro de 13mm de diâmetro. Após a obtenção e quantificação dos macrófagos como acima descritos, 2×10^5 macrófagos suspensos em 500 μ L de RPMI 1640, pH 7,2, sem soro fetal bovino eram distribuídos por escavação e as placas eram incubadas por 2 horas em câmara úmida, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em ar, para permitir a aderência dos macrófagos à lamínula.

Após a incubação, as escavações eram lavadas com STF, pH 7,2, a 37°C para retirada das células não aderidas e em seguida as preparações eram novamente incubadas por 30 min, em atmosfera de CO₂ a 5%, com uma suspensão de 10^6 ou 4×10^6 *Saccharomyces cerevisiae* em 500 μ L de RPMI 1640, pH 7,2, a 37°C com 10% soro fetal bovino (SFB). As leveduras eram previamente sensibilizadas por 30 minutos a 37°C com 10% de SFB inativado a 56°C por 30 minutos ou com pool de soro fresco de camundongos a 10%.

Após este período as escavações eram lavadas com STF, pH 7,2, a 37°C com 10% SFB, a fim de retirar as leveduras não ingeridas ou fortemente aderidas aos macrófagos. A última lavagem era feita com RPMI 1640, pH 7,2, contendo 20% de SFB para melhor preservar as preparações. Em seguida, as lâminas eram secas com vento quente, fixadas por 1 minuto com metanol e coradas com solução de Giemsa a 10% em tampão para coloração, pH 7,2, por 10 minutos.

As lamínulas eram montadas em lâminas para microscopia com entellan (Merk, Alemanha) e 200 células de cada preparação eram examinadas com aumento de 1000X, em óleo de imersão. O índice fagocitário (IF) foi calculado pela multiplicação da média do número de leveduras ingeridas ou fortemente aderidas

por macrófago (A), pelo número de macrófagos envolvidos na fagocitose (B) e os dados foram expressos por 100 macrófagos (Shaw & Griffin, 1981). A fórmula para este cálculo é $IF = A \times B$.

3.12. Preparação de leveduras para o teste de fagocitose

Para preparação das leveduras foi utilizada a técnica de Lachman & Hobart (1978), que modifica a superfície do *Saccharomyces cerevisiae* para facilitar a adsorção da proteína C3 do complemento. Por esta técnica, foi demonstrado por Brandi (1993) que também os anticorpos normalmente presentes no soro podem adsorver-se nas leveduras.

A suspensão estoque de leveduras foi preparada dissolvendo 50g de fermento fresco (Fleischmann) em 220mL de STF, pH 7,2. Esta suspensão foi autoclavada a 120°C por 30 minutos e em seguida lavada com STF até obter-se um sobrenadante límpido. O sedimento foi suspenso em 28mL de STF contendo 0,1M de 2-mercaptoetanol, incubado a 37°C por 2 horas, em agitação constante e em seguida lavada três vezes com STF para retirada do 2-mercaptoetanol. Após lavagem o sedimento foi suspenso em 55mL de solução de iodoacetoamida a 0,02M em STF. A preparação foi incubada novamente por 2 horas à temperatura ambiente, lavada três vezes por centrifugação em STF, sendo ressuspensa posteriormente em 220mL de STF. As leveduras foram, então submetidas a uma nova autoclavação por 30 minutos a 120°C, lavadas por centrifugação até obter-se o sobrenadante límpido e a preparação foi suspensa em 10mL de tampão veronal, pH 7,2, contendo azida sódica (2000mg/L) como preservativo. A solução estoque era mantida estéril a 4°C, podendo ser utilizada por anos.

3.13. Preparação do pool de soro fresco para avaliação da fagocitose facilitada por opsoninas

Para avaliar a fagocitose facilitada pelas opsoninas, como os componentes do sistema complemento, presentes no soro fresco, foi realizado o teste de fagocitose como descrito no item 3.11, substituindo as leveduras sensibilizadas com soro fetal bovino por leveduras sensibilizadas com um pool de soro fresco de camundongos, como fonte das opsoninas. Todo o restante do procedimento da fagocitose foi realizado conforme já descrito.

No mesmo dia de cada experimento era coletado sangue do plexo ocular de três camundongos e que era centrifugado para obtenção do soro. O pool destes soros frescos era utilizado a 10% para sensibilização das leveduras para realização dos testes de fagocitose pelos receptores para opsoninas.

3.14. Produção do peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais

A produção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi quantificada no sobrenadante das culturas dos macrófagos peritoneais, após 1h de incubação, pela microtécnica de oxidação do vermelho de fenol na presença de peroxidase (Pick e cols, 1981). O princípio desta técnica fundamenta-se na oxidação da fenolsulfoftaleína (vermelho de fenol) pela peroxidase na presença de H_2O_2 formando um produto que pode ser lido por colorimetria.

Para tal procedimento, os macrófagos eram coletados da cavidade peritoneal em STF, gelada, centrifugados a 4°C em 200g, durante 10 minutos, quantificados em hemocitômetro de Neubauer e distribuídos, em triplicata, $1,5 \times 10^5$ células por escavação em 200µL de RPMI 1640, pH 7,2, a 4°C sem soro fetal bovino em placas

estéreis de cultura de 96 escavações de fundo chato (Corning, EUA). A placa era incubada por 1 hora em câmara úmida, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em ar, para a adesão dos macrófagos. Após incubação, as escavações eram lavadas 3 vezes com STF, pH 7,2, a 37°C e incubadas na presença ou não de 20nM de acetato forbol miristato (PMA) (Sigma) e na presença de vermelho de fenol a 1% e peroxidase tipo 1 RZ 1.3 correspondendo a 19 unidades de purpurogalina/mL (Sigma), por 60 minutos, em câmara úmida, a 37°C, contendo 5% de CO₂ em ar. A reação era interrompida com 10µL de NaOH 1N e em seguida a leitura era realizada em espectrofotômetro de placa (Biorad) com filtro de 590 nm. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em micromoles de H₂O₂ (µM).

3.15. Curva-padrão para a determinação do peróxido de hidrogênio

A curva-padrão para a determinação de H₂O₂ foi preparada a partir de uma solução estoque de H₂O₂ (Sigma) na concentração de 10 mM diluída seriadamente nas diluições de 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 e 1:6400, respectivamente, 100µM, 50µM, 25µM, 12,5µM, 6,25µM, 3,12µM e 1,56µM, com vermelho de fenol acrescido de peroxidase, correspondendo a 19 unidades de purpurogalina/mL. O padrão 0µM foi preparado com vermelho de fenol sem peroxidase. A curva foi distribuída em triplicata na placa de 96 escavações, logo após a última incubação do item 3.14 e anteriormente ao acréscimo de NaOH 1N.

3.16. Padronização da dose ótima de acetato de forbol miristato (PMA) para determinar a produção do peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais de murinos

Para determinação da dose ótima de PMA para utilização na determinação do peróxido de hidrogênio foi feita uma curva de dose-resposta para a qual foram coletados um pool de macrófagos peritoneais de 3 camundongos Swiss, em STF, gelada, centrifugados a 4°C em 200g, durante 10 minutos, quantificados em hemocítmetro de Neubauer e ressuspensos para $1,5 \times 10^5$ células em 200µL de RPMI 1640, pH 7,2, a 4°C sem soro fetal bovino e distribuídos em placas estéreis de cultura de 96 escavações de fundo chato. A placa era incubada por 1 hora em câmara úmida, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em ar, para a adesão dos macrófagos. Após incubação, era lavada 3 vezes com STF, pH 7,2, a 37°C e incubadas sem ou com as concentrações de 0,2nM, 10nM, 20nM, 40nM, 80nM, 200nM e 2000nM de PMA, na presença de vermelho de fenol a 1% e peroxidase tipo 1 RZ 1.3, correspondendo a 19 unidades de purpurogalina/mL, por 60 minutos, em câmara úmida, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em ar. A reação foi interrompida com 10 µL de NaOH 1N e em seguida a leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa (Biorad) com filtro de 590 nm. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em densidade óptica (DO). A solução de vermelho de fenol foi preparada utilizando 19 unidades de purpurogalina/mL e a curva-padrão foi preparada conforme descrito anteriormente.

Os sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais apresentaram após estímulo com PMA, a média \pm DP (DO) da concentração de H₂O₂ de 0,307 \pm 0,010 quando utilizada a concentração de 0,2nM; de 0,311 \pm 0,005 para 10nM; de 0,343 \pm 0,001 para 20nM; de 0,276 \pm 0,032 para 40nM; de 0,341 \pm 0,001 para 80nM; de 0,338 \pm 0,001 para 200nM; e de 0,335 \pm 0,009 para 2000nM. Os estímulos com

20nM e 80nM apresentaram as melhores respostas. Como as concentrações de 40 nM, 200nM e 2000nM apresentaram uma média mais baixa estando o estímulo de 80nM entre elas, foi padronizado utilizar 20nM de PMA por escavação nos experimentos para avaliação da produção de peróxido de hidrogênio.

3.17. Produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais

O óxido nítrico é um produto da oxidação da L-arginina em citrulina e sendo uma molécula instável rapidamente decompõe-se em nitrito e nitrato. A produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos peritoneais foi avaliada pela quantificação do nitrito no sobrenadante das culturas utilizando a reação de Griess (Green e cols, 1981).

O princípio da reação de Griess baseia-se na reação do nitrito com uma amina primária aromática em meio ácido para formar um sal de diazônio, que por sua vez reage com um composto aromático formando um azo composto violeta que pode ser lido colorimetricamente (Promega, 2006).

Os macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal em STF, gelada, pH 7,2, centrifugados a 4°C em 200g, durante 10 minutos, quantificados em hemocítmetro de Neubauer e distribuídos, em triplicata, em placas de cultura, estéreis, com 96 escavações, de fundo chato (TPP – Zellkultur Testplate - Suíça). Foram adicionados $1,5 \times 10^5$ macrófagos por escavação em um volume final de 200µL de RPMI 1640, pH 7,2, a 4°C, sem soro fetal bovino. Os macrófagos eram, então, incubados por 1 hora em câmara úmida, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em ar, para a etapa de adesão.

Após incubação, as escavações eram lavadas com STF, pH 7,2, a 37°C, depois incubadas por 24 horas com ou sem 10µg/mL de LPS (Sigma, EUA) ou com

10ng/mL de IFN- γ (Sigma, EUA) ou com ambos, em um volume final de 200 μ L de RPMI 1640, pH 7,2, a 37°C, com 10% de soro fetal bovino.

Após 24 horas de incubação, a placa era centrifugada por 10 minutos a 200g e 100 μ L do sobrenadante das culturas eram acrescentados de 100 μ L do reagente de Griess (1-N naftiletileno diamina dihidroclorido a 0,1%, sulfanilamida a 1% e H₃PO₄ a 2,5%).

A reação era imediatamente lida em espectrofotômetro de placa (Biorad) em comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram expressos em micromolar (μ M).

3.18. Curva-padrão para determinação da produção de óxido nítrico

A curva-padrão para a determinação de óxido nítrico foi elaborada a partir da diluição seriada de uma solução de nitrito de sódio (NaNO₂) 200 μ M nas diluições de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128, respectivamente, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M, 6,25 μ M, 3,12 μ M e 1,56 μ M, com água destilada. O padrão 0 μ M foi preparado somente com água destilada.

3.19. Padronização da dose ótima de lipopolissacarídeo (LPS) e interferon- γ (INF- γ) para avaliar a produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais

Para se determinar a concentração ótima do interferon- γ e do lipopolissacarídeo que foram usadas como estímulo para produção do óxido nítrico, foi coletado um *pool* de macrófagos peritoneais de 3 camundongos Swiss, em STF, gelada, centrifugados a 4°C em 200g, durante 10 minutos, quantificados em hemocítmetro de Neubauer e distribuídos 1,5x10⁵ células por escavação em 200 μ L

de RPMI 1640, pH 7,2, a 4°C sem soro fetal bovino em placas de cultura de 96 escavações, estéreis.

Após a aderência a lâmina os macrófagos foram incubados por 24 horas, na ausência ou na presença LPS (5µg/mL, 10µg/mL e 20µg/mL) e/ou INF-γ (1ng/mL, 5ng/mL, 10ng/mL e 20ng/mL). A produção do NO foi avaliada como acima descrito.

Para os macrófagos que foram submetidos ao estímulo com LPS, a média ± DP (DO) da produção de óxido nítrico no sobrenadante das culturas foi de 598 ± 13 para a concentração de 5µg/mL, 591 ± 24 para 10µg/mL e 567 ± 6 para 20µg/mL. Quando o estímulo utilizado foi o INF-γ, a média ± DP da DO foi de 571 ± 10 para a concentração de 1ng/mL, 594 ± 6 para 5ng/mL, 594 ± 0 para 10ng/mL e 585 ± 5 para 20ng/mL. Como as concentrações de 5 e 10µg/mL de LPS e 5 e 10ng/mL de INF-γ produziram as maiores respostas, acrescentamos às culturas de macrófagos peritoneais, os dois estímulos simultaneamente. A média ± DP da DO foi de 622 ± 9 quando utilizadas as concentrações de 5µg/mL de LPS com 5ng/mL de INF-γ; de 599 ± 8 quando utilizado 10µg/mL de LPS com 5ng/mL de INF-γ; de 598 ± 6 quando utilizado 5µg/mL de LPS com 10ng/mL de INF-γ; e de 620 ± 5 quando utilizado 10µg/mL de LPS com 10ng/mL de INF-γ. Como um dos melhores resultados foi o do estímulo com 10µg/mL de LPS e 10ng/mL de INF-γ, foi padronizado utilizar estas concentrações nos experimentos para avaliação do óxido nítrico já que são as quantidades mais comumente utilizadas na literatura para este procedimento.

3.20. Produção de fator de necrose tumoral (FNT) nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais

O fator de necrose tumoral é uma citocina liberada pelos macrófagos ativados e pode ser determinado no sobrenadante das culturas ou no soro pelo método de enzimaensaio (ELISA), que se baseia na reação antígeno-anticorpo, onde

anticorpos anti-FNT, adsorvidos em uma placa de poliestireno de 96 escavações, e o FNT presente nas amostras ligam-se especificamente, sendo esta reação visualizada colorimetricamente, após adição de um segundo anticorpo anti-FNT marcado com enzima na presença do substrato específico.

Para a avaliação da produção de FNT, foram obtidos os sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais e amostras de sangue retiradas no oitavo dia de infecção por punção do plexo ocular, sem uso de anticoagulante. Após coagulação espontânea as amostras eram centrifugadas para obtenção de soro e mantidas a -70°C até a determinação do FNT.

Os macrófagos eram coletados da cavidade peritoneal, após lavagem com 15 mL de STF gelada, pH 7,2, centrifugados a 4°C em 200g, durante 10 minutos e quantificados em hemocitômetro de Neubauer. Eram adicionados 2×10^5 macrófagos por escavação em 500 μ L de RPMI 1640, pH 7,2, a 4°C, sem soro fetal bovino. A placa era, então, incubada por 2 horas em câmara úmida, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em ar, para a adesão dos macrófagos. Após incubação, as escavações eram lavadas 3 vezes com STF, pH 7,2, a 37°C e os macrófagos incubados por 6 horas (Matic e cols, 1991; Coelho, 2003), com ou sem 1 μ g/mL de LPS (Otterlei e cols, 1991) em RPMI 1640, pH 7,2, a 37°C, com 10% de soro fetal bovino. Após incubação, a placa era centrifugada e 200 μ L dos sobrenadantes recuperados, acondicionados em eppendorfs e mantidos a -70°C até a determinação do FNT.

Os testes foram realizados utilizando um kit comercial imunoenzimático de fase sólida tipo sanduíche, para FNT de camundongos (Ms TNF- α , BioSource, Bélgica). As amostras de soro e sobrenadante foram testadas no mesmo ensaio, após descongelamento prévio até a temperatura ambiente.

A determinação do FNT foi realizada conforme instruções do fabricante. Os padrões foram acrescentados em todas as placas nas concentrações de 1250, 625,

321,5, 156,2, 78,1, 39,1, 19,5 e 0 pg/mL. As amostras de soro foram diluídas 1:2 com tampão de incubação e as amostras do sobrenadante das culturas foram diluídos 1:2 com tampão diluente dos padrões e distribuídas nas placas contendo anticorpos policlonais anti-FNT adsorvidos nas paredes. Após incubação por 90 minutos, em temperatura ambiente, com um segundo anticorpo monoclonal biotilado para FNT de camundongo, as escavações foram lavadas 4X com solução de lavagem e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente com 100µL de solução de estreptavidina-peroxidase. Uma segunda lavagem foi realizada 4X e a placa foi novamente incubada em temperatura ambiente, na ausência da luz, durante 30 minutos, acrescida de 100µL do cromógeno estabilizado (tetrametilbenzidina) em cada escavação. Após este período 100µL da solução de interrupção foram adicionadas nas escavações e a reação colorimétrica produzida foi avaliada utilizando um espectrofotômetro de placa (Titertek) com filtro de 430 nm e a concentração expressa em pg/mL.

3.21. Análise estatística

As variáveis estudadas foram analisadas quanto à normalidade ou não da distribuição nas amostras previamente às comparações entre os grupos. Para análise entre duas variáveis não relacionadas com distribuição normal foi utilizado o teste *t*-Student e quando a distribuição era não normal, o teste de Mann-Whitney era utilizado para a comparação entre os dois grupos. Para análise de mais do que duas variáveis não relacionadas com distribuição normal, foi utilizado o teste de ANOVA, seguido do método de Student-Newman-Keuls, para comparação entre os grupos. Para comparação entre variáveis não relacionadas com distribuição não normal foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn, para comparação entre os grupos.

Considerando que a maioria das variáveis exibiu distribuição não gaussiana, os resultados foram uniformemente representados por meio da mediana, quartis e extremos.

O teste de correlação de Spearman foi utilizado para verificar a correlação entre as variáveis não paramétricas e o teste de correlação de Pearson para variáveis paramétricas.

Para analisar a influência sobre a mortalidade nos grupos tratados ou não com a pentoxifilina foi feita uma curva de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier e a diferença estatística foi avaliada pelo teste de Logrank.

As diferenças entre as variáveis comparadas foram consideradas estatisticamente significantes quando a probabilidade bi-caudal da sua ocorrência devida ao acaso (erro tipo I) foi menor que 5% ($p < 0,05$).

As análises e os gráficos foram realizados empregando-se o software Graphpad Prism 4 for Windows (GraphPad Software – San Diego, USA)

RESULTADOS

4.1 Influência da pentoxifilina sobre a sobrevida de camundongos Balb/C não susceptíveis à malária cerebral infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA

Para verificar a influência do tratamento com pentoxifilina sobre a sobrevida de camundongos não susceptíveis à malária cerebral foi observada a mortalidade espontânea utilizando-se camundongos Balb/C infectados com *Plasmodium berghei* ANKA não tratados (n=10) ou tratados com 8 (n= 20) ou 16 (n=10) mg/Kg/dia de pentoxifilina, por via intramuscular, de 12/12h. O tratamento retardou em 1 (um) dia o início da morte dos animais infectados tratados com 8 mg/kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX8) e prolongou em 3 (três) dias a sobrevida deste grupo em relação aos animais infectados e tratados com salina 0,9% (Pb). Os animais do grupo Pb começaram a morrer no décimo primeiro dia, enquanto que os animais do grupo Pb+PTX 8 começaram a morrer no décimo segundo dia da infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA. No décimo oitavo dia, 80% dos animais do grupo Pb já haviam morrido, enquanto ainda estavam vivos 50% dos animais do grupo Pb+PTX 8. No vigésimo dia de infecção, todos os animais infectados e não tratados com pentoxifilina já haviam ido a óbito, enquanto ainda restavam 50% de camundongos no grupo tratado (p=0,007 entre o grupo Pb e Pb+PTX 8; Teste de Logrank). Quando o tratamento foi realizado utilizando 16 mg/kg/dia de pentoxifilina, os animais começaram a morrer precocemente (nono dia) e no décimo primeiro dia, quando se iniciou a morte dos primeiros animais do grupo Pb, só restavam 50% dos animais do grupo Pb+PTX 16, contudo este grupo apresentou uma sobrevida de 7 dias em relação ao grupo infectado tratado com salina e de 3 dias em relação ao grupo infectados tratado com 8 mg/Kg/dia. No vigésimo quarto dia, enquanto já haviam morrido todos os animais do grupo Pb+PTX 8, ainda restavam 40% dos animais do grupo Pb+PTX 16, entretanto, não houve diferença estatística na

sobrevida dos camundongos dos grupos Pb e Pb+PTX 16 ($p= 0,174$) e nem entre o grupo Pb+PTX 8 e Pb+PTX 16 ($p= 0,154$). A mediana da sobrevida foi 13 dias para o grupo Pb, 18 dias para o grupo Pb+PTX8 e 17 dias para o grupo Pb+PTX16. A **figura 1** mostra a curva de porcentagem cumulativa realizada segundo o método de Kaplan-Meier e a diferença estatística entre os grupos foi avaliada pelo teste de Logrank (4,8; $p=0,041$).

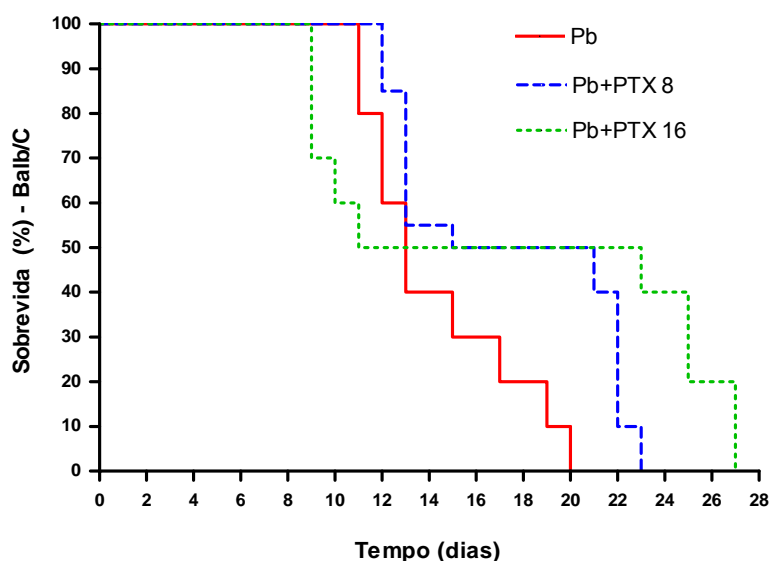


Figura 1. Influência da pentoxifilina na sobrevida de camundongos Balb/C infectados pelo *P. berghei* ANKA e tratados ou não com 8 ou 16 mg/Kg/dia de pentoxifilina. A curva de sobrevida foi feita pelo método de Kaplan-Meier, e a diferença estatística avaliada pelo teste de Logrank (4,8; $p=0,041$); Pb x Pb+PTX 8 ($p= 0,007$); Pb x Pb+PTX 16 ($p= 0,174$); Pb+PTX 8 x Pb+PTX 16 ($p=0,154$).

4.2 Influência da pentoxifilina sobre a sobrevida de camundongos CBA susceptíveis à malária cerebral infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA

Para verificar a influência do tratamento com pentoxifilina sobre a sobrevida dos camundongos susceptíveis à malária cerebral foi observada a mortalidade espontânea utilizando-se camundongos CBA infectados com *Plasmodium berghei*

ANKA tratados (n=13) ou não (n=10) com 8mg/Kg/dia de pentoxifilina, em duas doses diárias de 12/12h, por via intramuscular. O tratamento não retardou o início da morte em relação aos animais não tratados, contudo, prolongou em 13 dias a sobrevivência dos animais tratados (23% dos animais) em relação aos não tratados. Estes 23%, não apresentaram sintomas neurológicos; entretanto, apresentaram sintomas como dispnéia, apatia, palidez de mucosas, eriçamento do pêlo e anemia.

Os animais dos dois grupos começaram a morrer no sétimo dia de infecção e no oitavo dia, enquanto 100% dos animais não tratados já haviam morrido, 38,5% dos animais tratados ainda estavam vivos. A mediana da sobrevivência foi de 7 dias para o grupo Pb e 8 dias para o grupo Pb+PTX. A **figura 2** mostra a curva de porcentagem cumulativa realizada segundo o método de Kaplan-Meier e a diferença estatística entre os grupos foi avaliada pelo teste de Logrank (4,7; p=0,03).

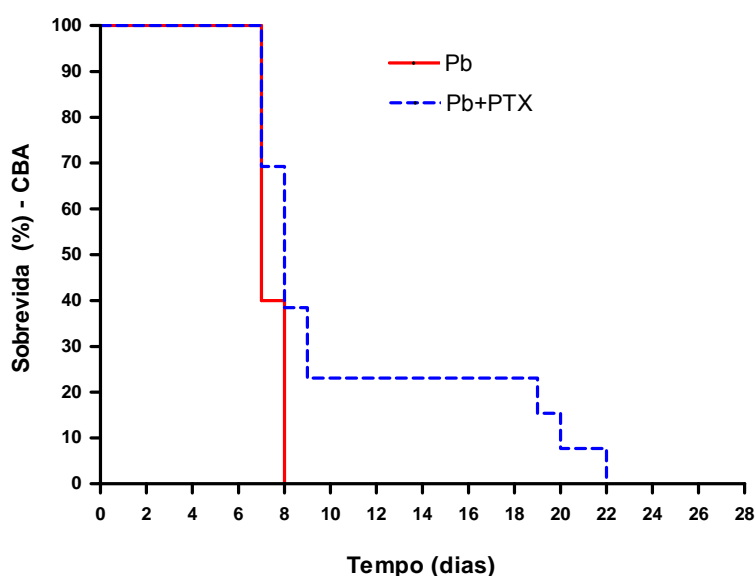


Figura 2. Influência da pentoxifilina na sobrevivência de camundongos CBA infectados pelo *P. berghei* ANKA, tratados ou não com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina. Curva de sobrevivência pelo método de Kaplan-Meier e a diferença estatística avaliada pelo teste de Logrank (4,7; p=0,03).

4.3 Influência da pentoxifilina sobre a evolução do peso dos camundongos Balb/C não susceptíveis e CBA susceptíveis à malária cerebral durante a infecção malárica

Para avaliar a influência da pentoxifilina sobre a evolução do peso dos camundongos susceptíveis (CBA) e não susceptíveis (Balb/C) à forma cerebral na infecção malárica, os animais foram infectados com *Plasmodium berghei* ANKA e tratados ou não com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina, por via intramuscular, de 12 em 12 horas, a partir do terceiro dia da infecção até o dia da morte espontânea. Foram utilizados 10 animais no grupo de camundongos Balb/C infectados tratados com salina 0,9% e 20 animais no grupo tratado com PTX. Para o modelo CBA, foram utilizados 10 animais no grupo infectado e 13 no grupo infectado tratado. Desde o primeiro dia da infecção até o dia da morte espontânea, o peso de cada animal foi aferido sempre no mesmo horário e na mesma balança. Para analisar a perda de peso em relação ao dia da infecção, foi aplicado a fórmula para o cálculo da variação percentual de peso expressa pelo peso final (pf) menos o peso inicial (pi) dividido pelo peso inicial: $\Delta\%: (pf-pi)/pi$.

Para os camundongos Balb/C, as medianas de peso foram de 27,5g para o grupo infectado tratado com salina e de 27,3g para os animais infectados e tratados com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina antes da infecção pelo *P. berghei* ANKA ($p=0,941$, teste *t*, **figura 3A**).

No grupo Balb/C, não houve diferença na mediana do $\Delta\%$ dos pesos entre os animais do grupo Pb e Pb+PTX do primeiro até o sexto dia de infecção malárica ($p>0,05$, teste *t*, **figura 4**). Do sétimo ao décimo primeiro dia da infecção, os animais tratados com pentoxifilina ($\Delta 7\% = -0,037$; $\Delta 10\% = -0,077$) perderam menos peso do que os animais infectados tratados com salina ($\Delta 7\% = -0,155$; $\Delta 10\% = -0,187$) ($p<0,05$, Mann-Whitney; **figura 3B e 4**). Do décimo segundo até o vigésimo dia de

infecção pelo *P. berghei* ANKA não houve variação estatística na média percentual de peso entre os animais do grupo Pb e Pb+PTX ($p > 0,05$, teste *t*, **figura 4**). A perda de peso total foi de 33,3% para grupo infectado ($\Delta\% = -0,332$) e de 23,5% para o grupo infectado e tratado com pentoxifilina ($\Delta\% = -0,217$); $p = 0,041$, Mann-Whitney (**figura 3C**).

Para os camundongos CBA, as medianas de peso foram de 28,5g para o grupo infectado tratado com salina e de 29,7g para os animais infectados e tratados com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina antes da infecção pelo *P. berghei* ANKA ($p = 0,067$, Mann-Whitney; **figura 5A**). A infecção malárica causou perda de peso progressiva durante a curva de sobrevivência, contudo as medianas de variação percentual de peso ($\Delta\%$) não foram estatisticamente diferentes entre os grupos Pb e Pb+PTX ($p > 0,05$, teste *t*, **figura 5B e 6**) até o sétimo dia de infecção.

A comparação do peso entre os camundongos susceptíveis (CBA) e não susceptíveis (Balb/C) à malária cerebral no dia zero, antes do tratamento, mostrou não havia variação significativa de peso entre todos os grupos dos dois modelos ($p = 0,205$, Kruskal-Wallis; **figura 7**).

A análise comparativa da variação percentual de peso entre os dois modelos foi realizada no sétimo dia, pois a maioria dos camundongos CBA infectados não tratados com pentoxifilina já haviam morrido. O grupo Pb do modelo Balb/C perdeu mais peso ($\Delta\% = -0,155$) do que o mesmo grupo no modelo CBA ($\Delta\% = -0,09$), respectivamente, 15,3% e 9,2% ($p = 0,007$, Mann-Whitney). Por outro lado, não houve diferença estatística entre as medianas do $\Delta\%$ de peso para os grupos Pb+PTX de ambos os modelos no sétimo dia de infecção ($p = 0,426$, Mann-Whitney) (**figura 8**).

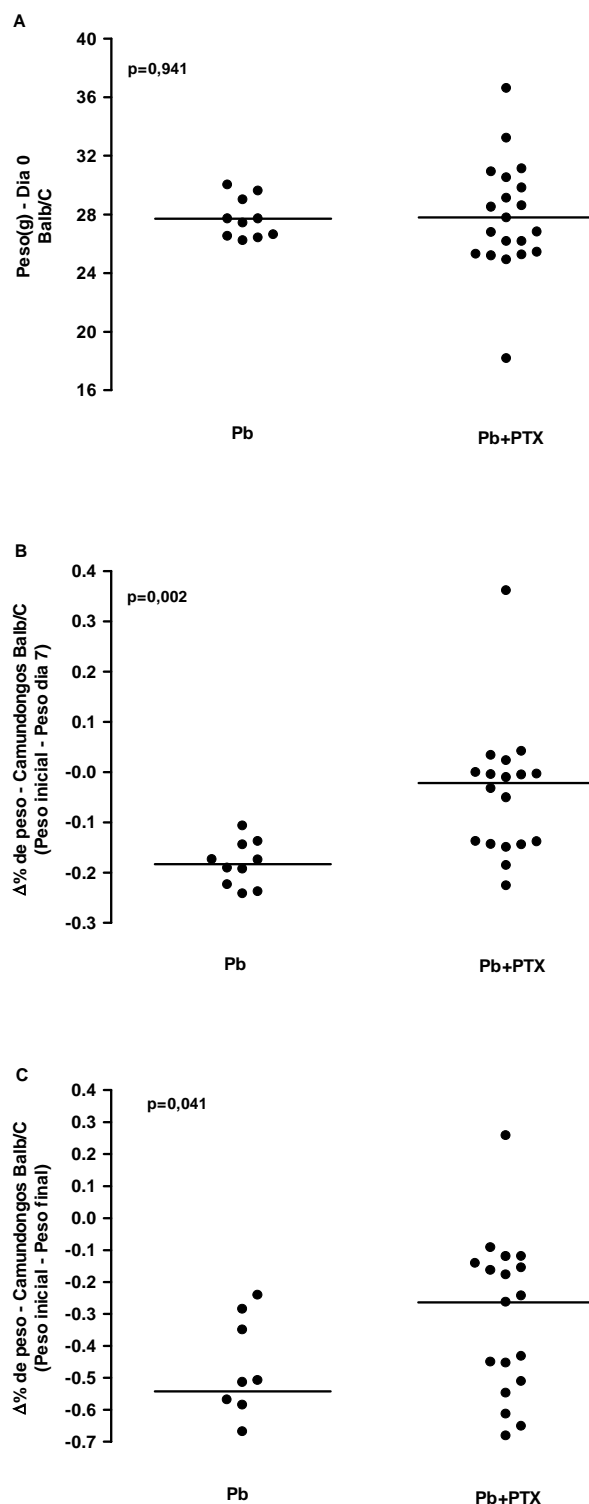


Figura 3. Análise comparativa entre o peso dos grupos de camundongos Balb/C infectados, tratados (Pb+PTX) ou não (Pb) com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina. A) Análise do peso no dia da infecção pelo *P. berghei* ANKA (Dia 0); não houve diferença estatística entre os grupos, $p=0,941$, teste *t* (Pb: média= 27,5g; Pb+PTX: média= 27,3g). B) Análise do peso no sétimo dia de infecção demonstrou diferença estatística nas medianas de variação percentual entre os grupos Pb ($\Delta\% = -0,155$) e Pb+PTX ($\Delta\% = -0,037$) pelo teste Mann-Whitney, $p=0,002$. C) Análise da perda de peso total demonstrou diferença estatística nas medianas de variação percentual entre os grupos Pb ($\Delta\% = -0,332$) e Pb+PTX ($\Delta\% = -0,217$) pelo teste Mann-Whitney, $p=0,041$.

OBS: Os resultados estão dispostos em tabelas em anexo no final deste trabalho.

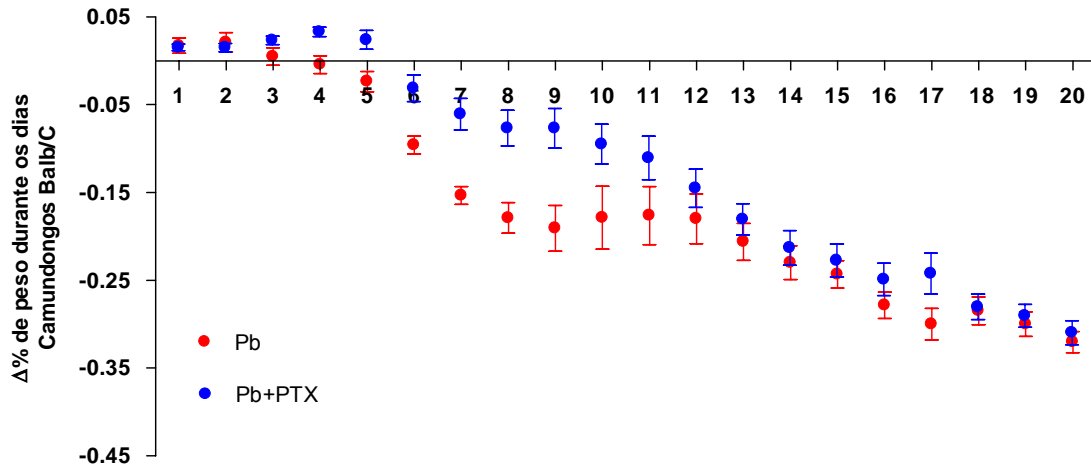


Figura 4. Variação percentual do peso dos camundongos Balb/C infectados com *P. berghei* ANKA tratados ou não com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina. A perda de peso foi analisada junto com a curva de sobrevivência. Até o sexto dia de infecção não houve diferença estatística entre as médias do $\Delta\%$ de peso ($p > 0,05$, teste *t*). Do sétimo ao décimo dia de infecção, o grupo Pb+PTX perdeu menos peso do que o grupo Pb ($p < 0,05$, Mann-Whitney). Do décimo primeiro dia até o vigésimo dia de infecção, não houve diferença estatística entre as médias do $\Delta\%$ de peso ($p > 0,05$, teste *t*).

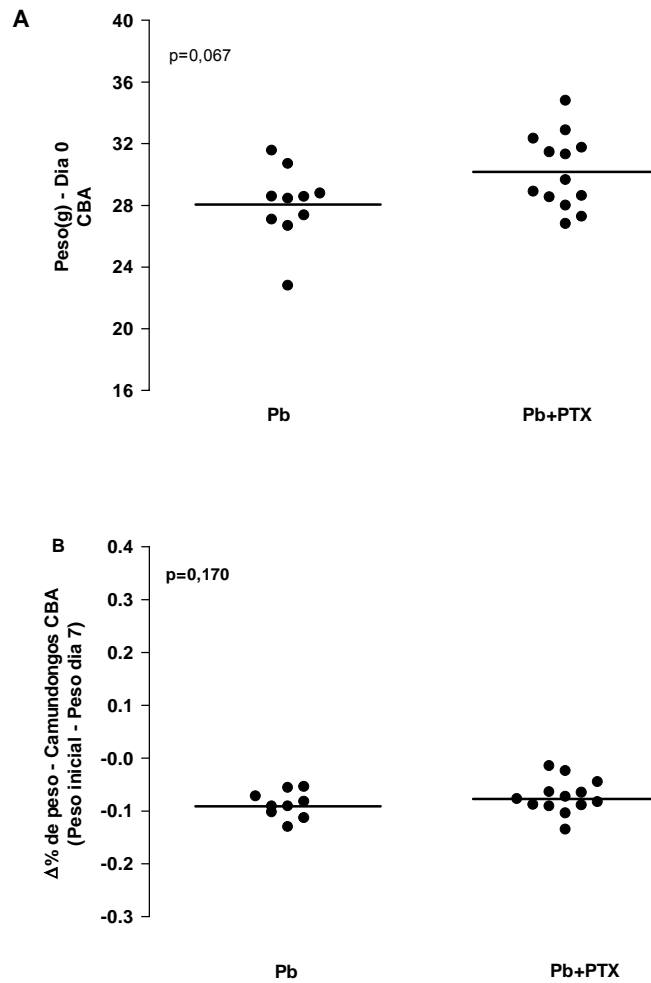


Figura 5. Peso dos camundongos CBA infectados com *P. berghei* ANKA durante o tratamento ou não com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina. A) Peso dos animais antes da infecção pelo *P. Berghei* ANKA; $p=0,067$, Mann-Whitney. B) Variação percentual de peso no sétimo dia em relação ao peso inicial. Não houve diferença entre os grupos Pb e Pb+PTX; $p=0,170$, teste *t*.

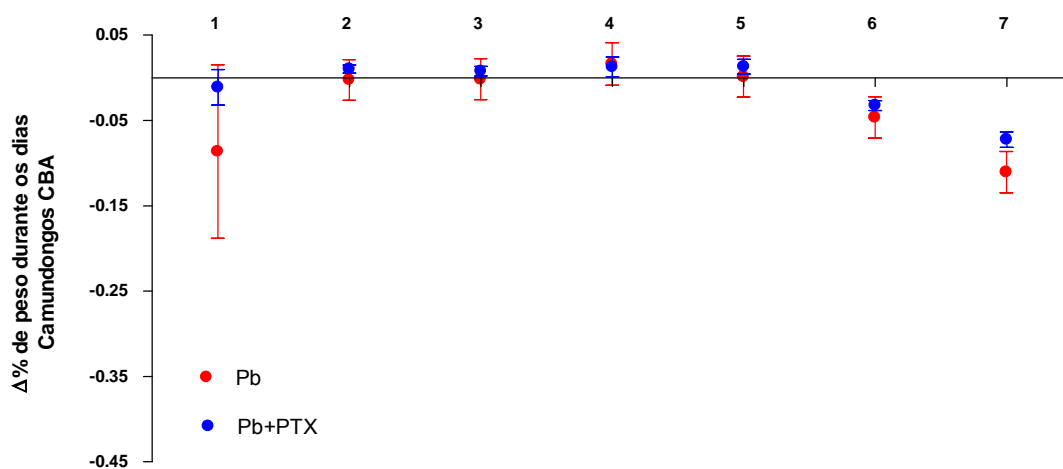


Figura 6. Peso dos camundongos CBA infectados com *P. berghei* ANKA durante o tratamento ou não com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina. Não houve diferença estatística nos Δ% de peso entre os grupos Pb e Pb+PTX ($p>0,05$, teste *t*).

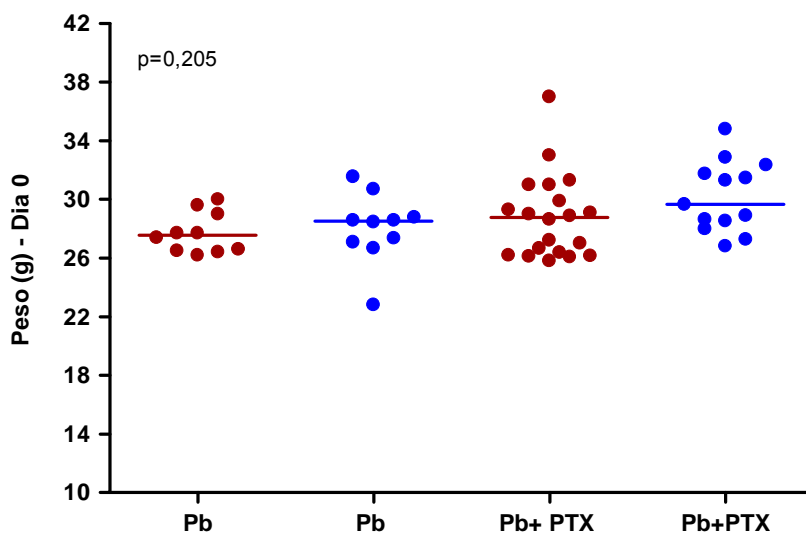


Figura 7. Análise comparativa entre os pesos dos camundongos Balb/C (●) e CBA (●) infectados com *P. berghei* ANKA no dia da infecção pelo *P. berghei* ANKA; $p=0,205$, ANOVA.

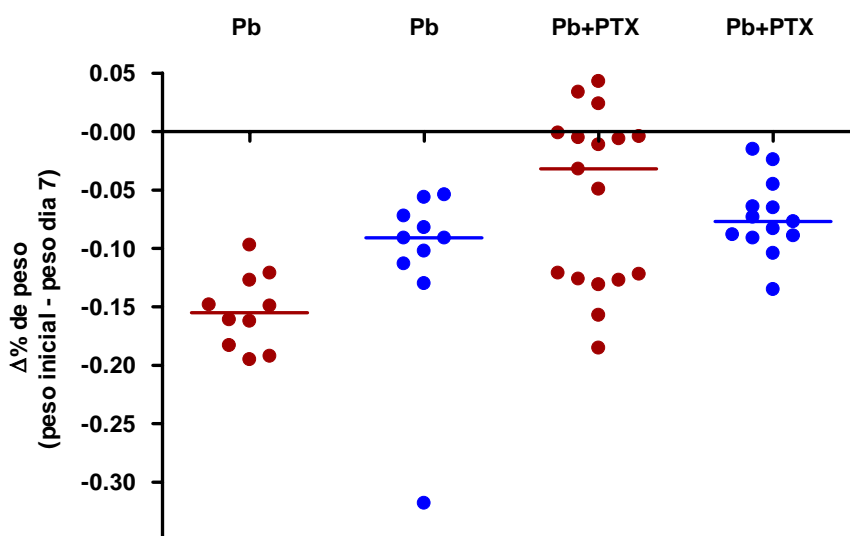


Figura 08. Análise comparativa entre os pesos dos camundongos dos grupos estudados no sétimo dia da infecção com *P. berghei* ANKA, para os animais tratados ou não com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina, nos dois modelos murinos Balb/C (●) e CBA (●). Houve diferença estatística entre a média dos $\Delta\%$ dos pesos dos grupos infectados e não tratados (0,007, Mann-Whitney), mas não entre os grupos infectados tratados com pentoxifilina ($p=0,426$, Mann-Whitney).

4.4 Influência da pentoxifilina sobre a evolução do hematócrito

Para avaliar se a pentoxifilina influencia a evolução da anemia considerando o hematócrito, o sangue da ponta da cauda foi retirado nos 3º, 5º, 8º e 21º dias após infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA nos camundongos Balb/C e nos 3º, 5º e 8º dias nos camundongos CBA. O tratamento dos animais foi iniciado no terceiro dia de infecção, por via intramuscular, com intervalo diário de 12 horas.

Não houve diferença estatística no terceiro dia de infecção na mediana dos hematócritos entre os 4 grupos de camundongos Balb/C estudados ($p=0,737$, ANOVA; **figura 9A**). No quinto dia, o grupo infectado tratado com pentoxifilina apresentou uma redução significativa de 12,3% na mediana do hematócrito, enquanto não houve diferença entre os outros grupos ($p<0,0001$, ANOVA; **figura 9B**). No oitavo dia, com exceção do grupo controle, houve redução significativa da mediana do hematócrito em todos os outros grupos ($p<0,001$, ANOVA; **figura 9C**), contudo não houve diferença estatística entre as médias dos hematócritos do grupo infectado e infectado tratado com pentoxifilina ($p=0,118$, teste t), mas houve entre os grupos PTX *versus* Pb e PTX *versus* Pb+PTX ($p<0,0001$, teste t).

Houve uma queda discreta na mediana do hematócrito dos camundongos Balb/C do grupo não infectado tratado com pentoxifilina somente no oitavo dia da infecção (Ht=54%). No 3º dia o hematócrito foi de 60% e no quinto dia foi de 58% ($p=0,001$, ANOVA). A infecção malárica diminuiu a mediana do hematócrito dos animais não tratados de 58% no terceiro dia para 57% no quinto e para 33% no oitavo dia da infecção ($p<0,0001$, ANOVA). Enquanto, os animais infectados e tratados com pentoxifilina apresentaram a mediana do hematócrito de 57% no terceiro dia, 50% no quinto e 33% no oitavo dia ($p<0,0001$, ANOVA). (**figura 10**)

Comparando-se os quatro grupos de estudo do modelo CBA, em cada dia, observamos que também não houve diferença estatística entre as medianas dos

hematócritos de todos os grupos estudados no terceiro dia da infecção ($p=0,662$, Kruskal-Wallis). No quinto e oitavo dias, houve uma redução significativa dos hematócritos no grupo tratado com pentoxifilina (Ht 5= 37% e Ht 8= 35%) e no grupo infectado (Ht 5= 45% e Ht 8= 44%); $p<0,05$, Kruskal-Wallis; não havendo diferença estatística entre os dois ($p=0,286$, Kruskal-Wallis). (**figuras 11**)

No grupo não infectado do modelo CBA, o tratamento com a pentoxifilina mostrou uma tendência para diminuir a mediana do hematócrito de 59% no terceiro dia para 48% no quinto e mantendo-se em 48% no oitavo ($p=0,066$, Kruskal-Wallis). A infecção malárica diminuiu para 45% a mediana do hematócrito no quinto dia e para 44% no oitavo dia da infecção ($p=0,025$, Kruskal-Wallis). Os camundongos infectados tratados com pentoxifilina apresentaram diminuição do hematócrito a partir do quinto dia da infecção (37%), mantendo-se baixo no oitavo dia (35%) ($p=0,008$, Kruskal-Wallis). (**figura 12**)

A análise comparativa dos hematócritos entre os dois modelos mostrou que no terceiro dia, as medianas não divergiam estatisticamente entre si ($p=0,798$, Kruskal-Wallis). No quinto dia, os dois grupos tratados com pentoxifilina (PTX e Pb+PTX) e o grupo infectado (Pb) dos camundongos CBA tiveram uma diminuição significativamente maior da mediana do hematócrito do que os camundongos Balb/C ($p<0,0001$, Kruskal-Wallis); porém, no oitavo dia, não houve diferença estatística entre as medianas dos hematócritos dos mesmos grupos nos dois modelos ($p>0,05$, Kruskal-Wallis) (**figura 13**). Contudo, a maioria dos camundongos CBA morreu por volta do sétimo dia com a mediana do hematócrito de $43\% \pm 2,9\%$, enquanto os camundongos Balb/C morreram em torno do 21º dia com a mediana do hematócrito de $12,2\% \pm 0,4\%$ ($p<0,0001$; ANOVA). Os camundongos CBA que morreram tardiamente (23%) apresentaram a mediana do hematócrito de $21,3\% \pm 1,8\%$ (**figura 14**).

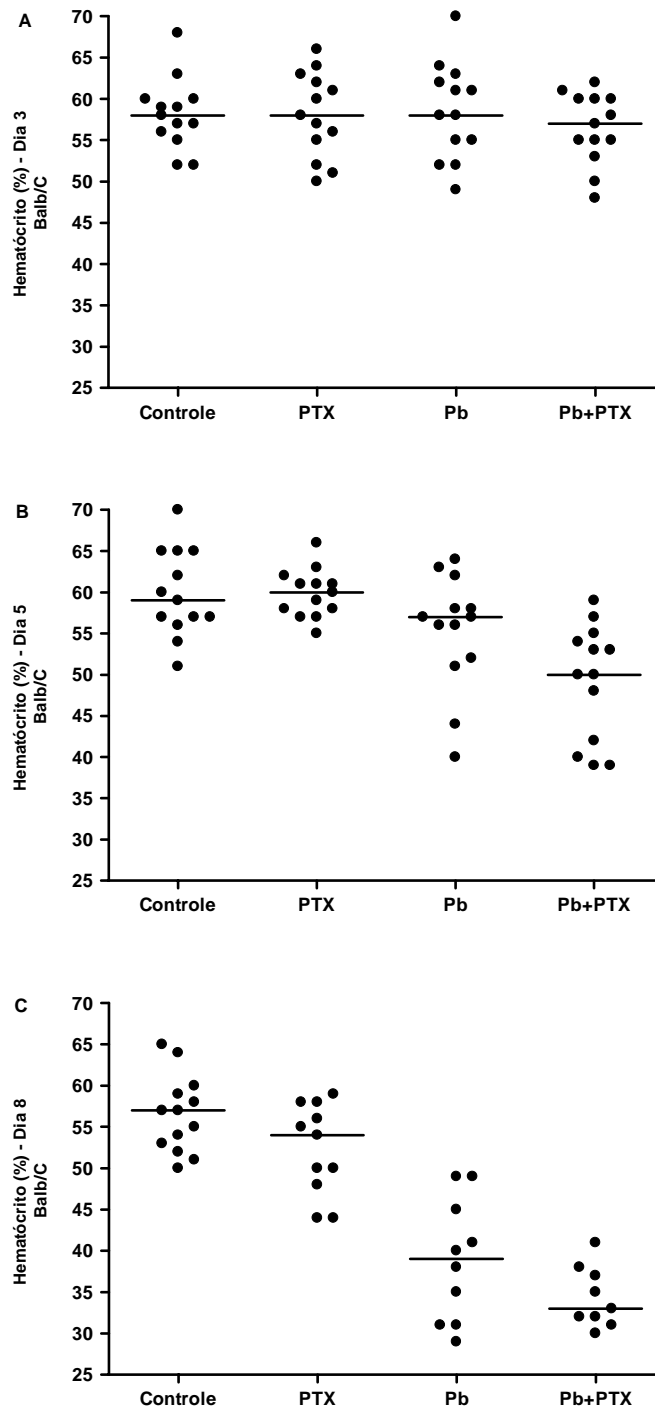


Figura 9. Influência da pentoxifilina sobre o hematócrito em camundongos Balb/C, não susceptíveis à malária cerebral, infectados com *Plasmodium berghei* ANKA: A) Hematócrito do terceiro dia de infecção, antes do início do tratamento. Não houve diferença estatística entre os grupos; $p=0,737$. B) Hematócrito do quinto dia de infecção. O grupo Pb+PTX apresentou uma queda na mediana do hematócrito, os outros grupos não tiveram diferença estatística significativa; $p<0,0001$. C) Hematócrito do oitavo dia de infecção. As medianas dos grupos infectados foram significativamente menores que os grupos não infectados; $p<0,0001$. Todas as análises foram realizadas pelo teste ANOVA seguido do método de Student-Newman-Keuls para comparação entre os grupo Pb e Pb+PTX no oitavo dia de infecção ($p<0,05$).

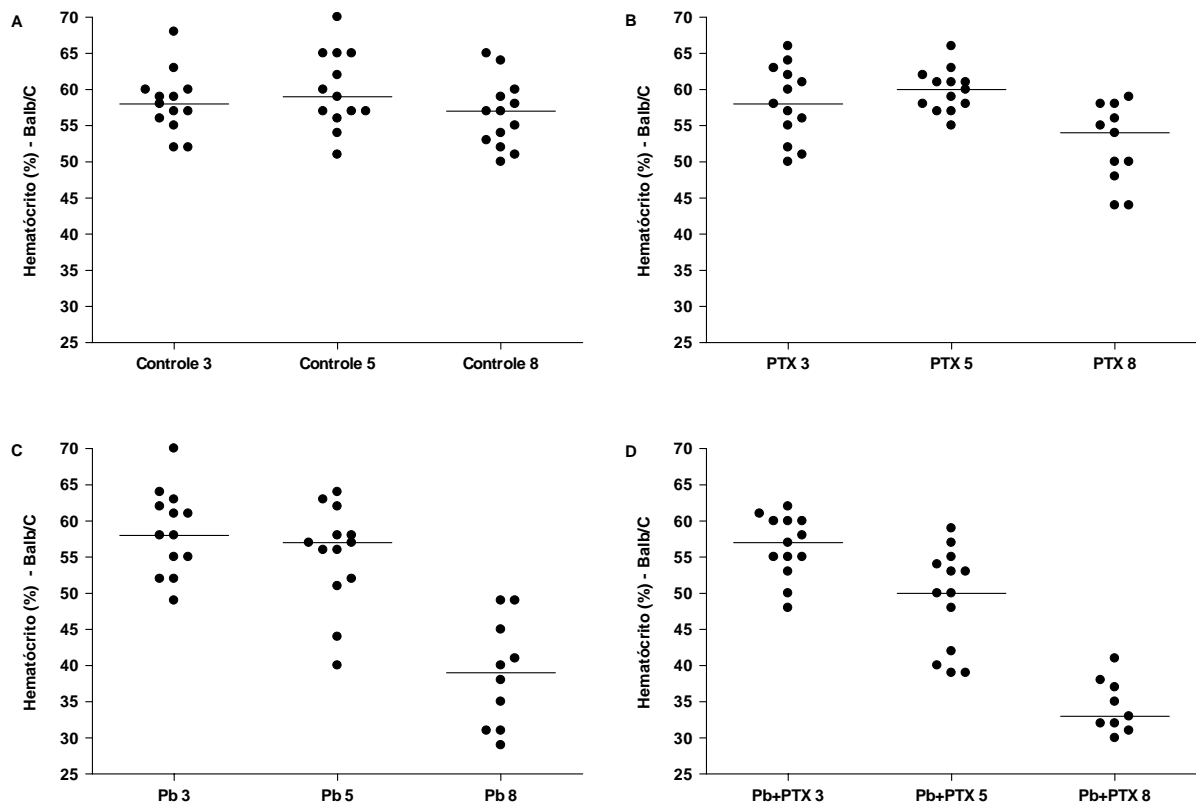


Figura 10. Análise comparativa entre os hematócitos do 3º, 5º e 8º dias após infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA em cada grupo experimental: A) No grupo controle não houve variação significativa da medianados hematócitos entre os dias; $p=0,225$. B) No grupo não infectado tratado com pentoxifilina houve uma queda na média do hematócrito no dia 8; $p=0,001$. C) A infecção malárica promoveu uma diminuição dos hematócitos dos animais não tratados com pentoxifilina, no oitavo dia de infecção; $p<0,0001$. D) Os camundongos infectados e tratados com pentoxifilina tiveram uma queda na mediana dos hematócrito a partir do quinto dia de infecção; $p<0,0001$. Todas as análises foram realizadas pelo teste ANOVA seguido do método de Student-Newman-Keuls para comparação entre os grupos PTX3 x PTX8; PTX5xPTX8, Pb3 e Pb8; Pb5 x Pb8; Pb+PTX3 x Pb+PTX8; Pb+PTX5 e Pb+PTX8 ($p<0,05$).

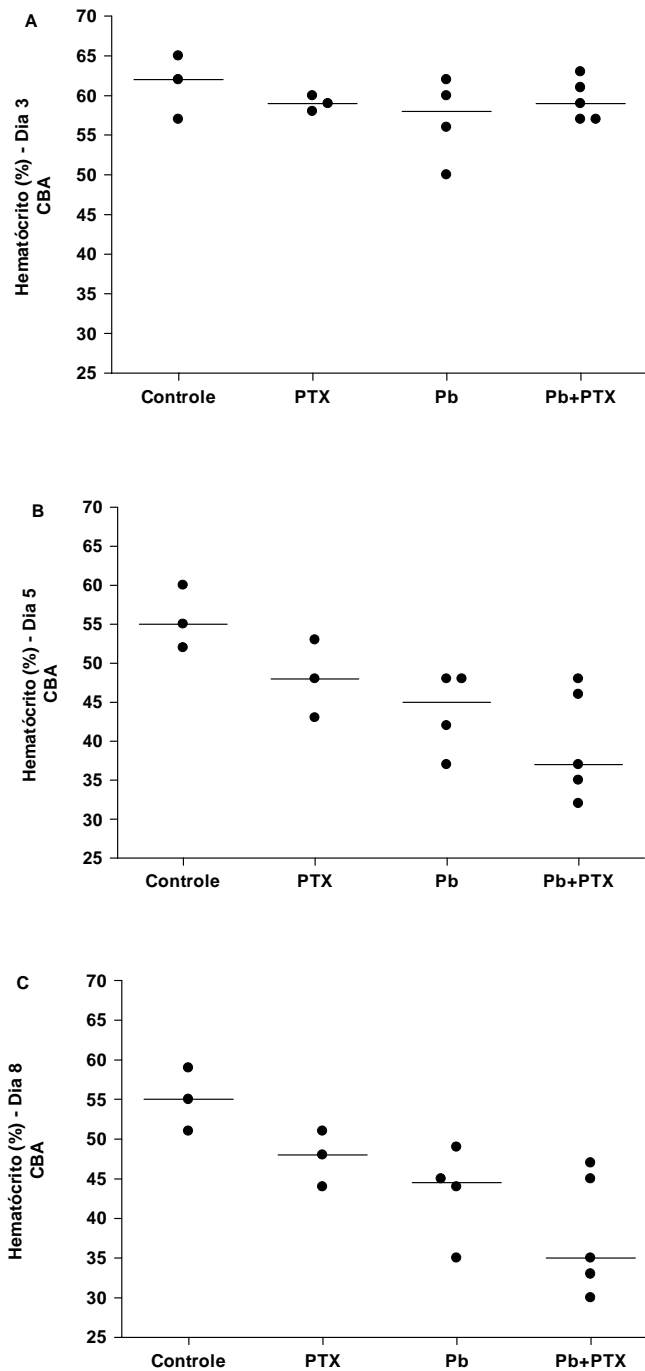


Figura 11. Influência da pentoxifilina sobre o hematócrito de camundongos CBA, susceptíveis à malária cerebral, infectados com *Plasmodium berghei* ANKA. A) Hematócrito do terceiro dia de infecção, antes do início do tratamento; $p=0,662$. B) Hematócrito do quinto dia de infecção. Diminuição dos hematócritos do grupo infectado (Pb) e infectado tratado (Pb+PTX); $p=0,037$. C) Hematócrito do oitavo dia de infecção. Os grupos Pb e Pb+PTX tiveram os hematócritos mais baixos do que os outros grupos; $p=0,035$. Todas as análises foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do método de Dunn para comparação entre os grupos no quinto dia e no oitavo dia: Pb+PTX x Pb; Pb+PTX x PTX; Pb+PTX x Controle ($p<0,05$).

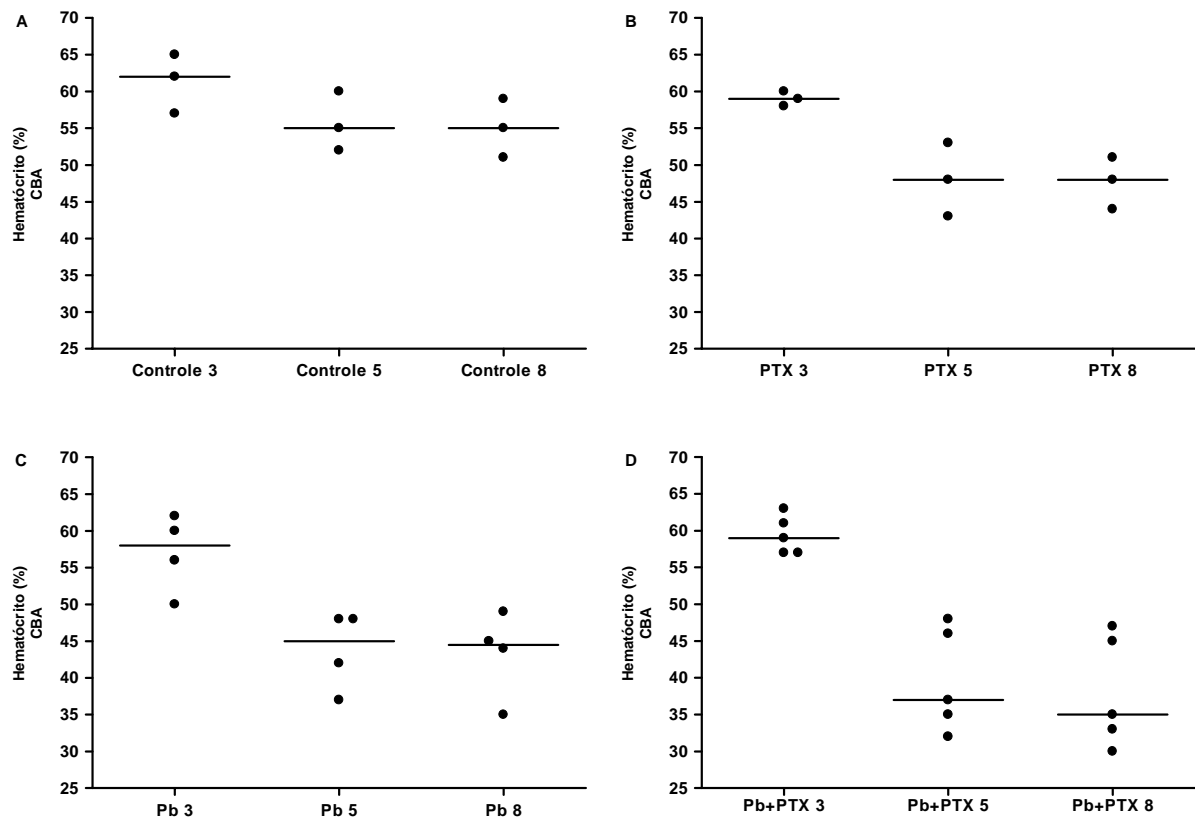


Figura 12. Análise comparativa entre os hematócitos dos 3º, 5º e 8º dias após infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA em cada grupo experimental, no modelo CBA susceptível à malária cerebral: A) Grupo controle, $p=0,184$, Kruskal-Wallis. B) Grupo não infectado tratado com pentoxifilina demonstrou uma tendência para diminuir o hematócrito no quinto dia, $p=0,066$, Kruskal-Wallis. C) Grupo infectado não tratado: diminuição dos hematócitos a partir do quinto dia, $p=0,025$ (Kruskal-Wallis). D) Os camundongos tratados com pentoxifilina: diminuição dos hematócitos a partir do quinto dia de infecção, $p=0,008$, Kruskal-Wallis.

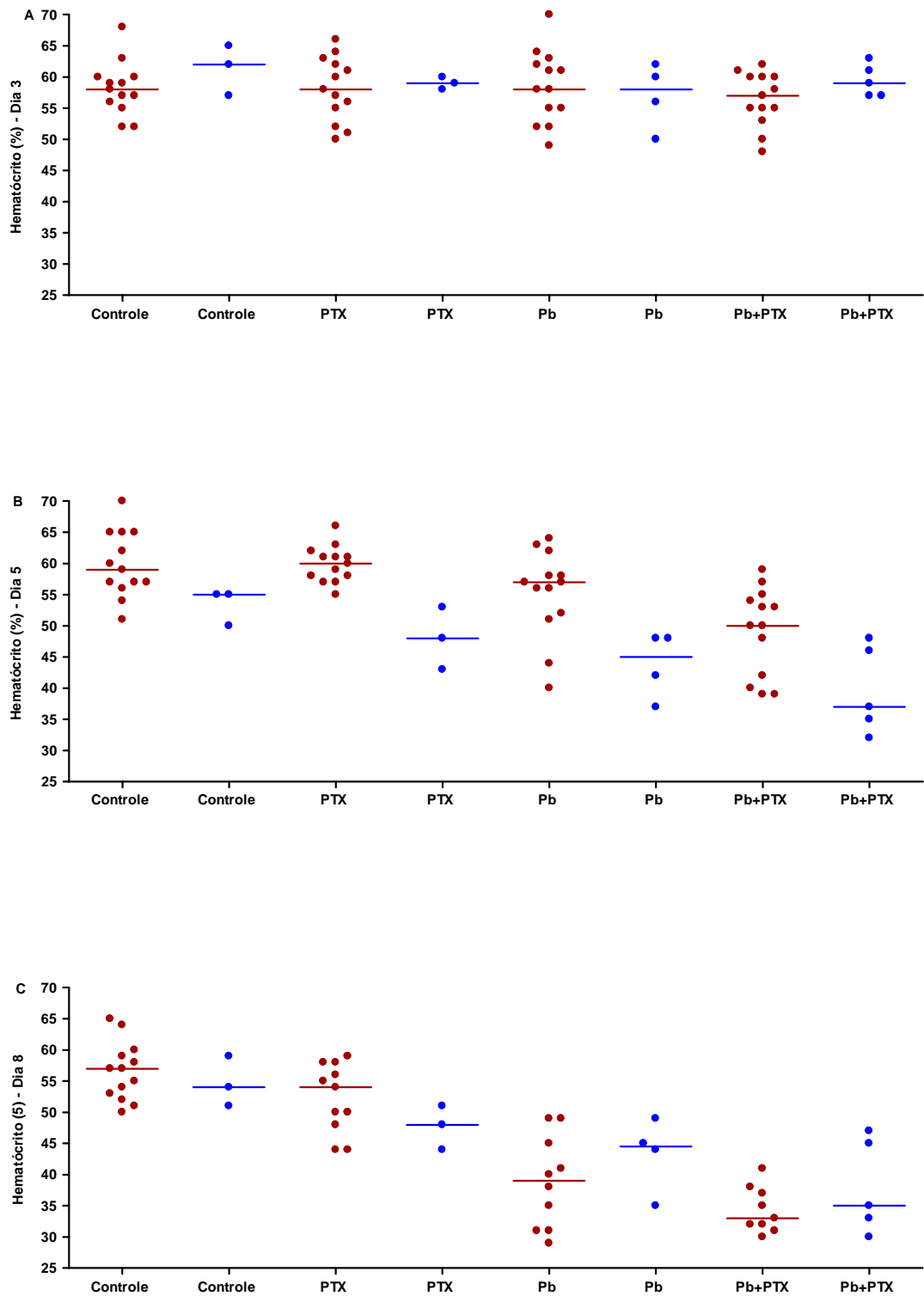


Figura 13. Análise comparativa entre as medianas dos hematócritos dos modelos murinos Balb/C (●) e CBA (●). A) Terceiro dia de infecção. Não houve diferença estatística entre os grupos; $p=0,798$ (Kruskal-Wallis). B) Quinto dia de infecção. Camundongos CBA apresentaram hematócritos menores do que os dos camundongos Balb/C nos grupos PTX, Pb e PB+PTX; $p<0,0001$ (Kruskal-Wallis). C) Oitavo dia de infecção. Não houve diferença estatística entre as médias dos hematócritos dos dois modelos $p>0,05$ (Kruskal-Wallis).

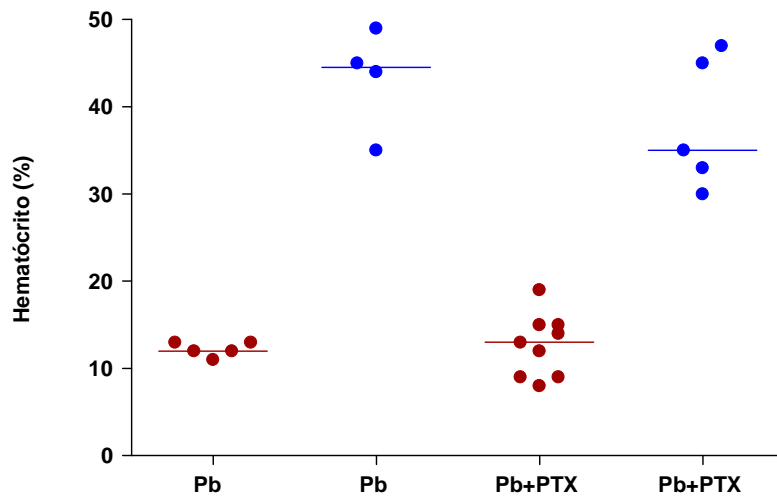


Figura 14. Comparação entre medianas dos hematócritos no dia da morte dos animais, que ocorreu no 8º dia de infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA nos modelos CBA (●) e no 21º dia da infecção no modelo Balb/C (●): grupos infectados não tratados (Pb) e tratados com pentoxifilina (Pb+PTX); Pb CBA x Pb Balb/C: $p < 0,0001$ e Pb+PTX CBA x Pb+PTX Balb/C: $p < 0,0001$. Análise realizada pelo teste de Mann-Whitey.

4.5 Influência da pentoxifilina sobre a evolução da parasitemia em camundongos CBA susceptíveis e camundongos Balb/C não susceptíveis à malária cerebral infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA

Para avaliar se a pentoxifilina influencia a carga parasitária nos modelos não susceptíveis (Balb/C) e susceptíveis à malária cerebral (CBA), o sangue da ponta da cauda foi colhido para confecção de lâminas que foram coradas com panótico e analisadas ao microscópio óptico. A parasitemia foi determinada nos 4°, 9°, 15° e 21° dias da infecção malárica nos camundongos Balb/C e nos 3°, 5° e 8° dias nos camundongos CBA.

A pentoxifilina foi capaz de retardar a elevação da parasitemia no modelo Balb/C, sendo a diferença significativa entre o grupo infectado e o grupo infectado e tratado com a droga no quarto ($p=0,0005$, teste t) e nono ($p=0,034$; teste t) dias da infecção malárica. Entretanto, não houve diferença entre os grupos no décimo quinto ($p=0,806$, teste t) e vigésimo primeiro dia da infecção ($p=0,113$, teste t) (**figura 15**). Esta droga, não foi capaz de modificar a evolução da parasitemia nos camundongos CBA, susceptíveis a malária cerebral; $p>0,05$, Mann-Whitney (**figura 16**).

Os camundongos CBA infectados (Pb) apresentaram no dia em que morreram (oitavo dia) a parasitemia (7,3%) 2,3 vezes menor do que a parasitemia (16,8%) dos camundongos Balb/C no nono dia. Por outro lado, os camundongos Balb/C morreram com uma parasitemia 7,2 vezes maior (52,4%) do que os camundongos CBA. O tratamento com pentoxifilina não alterou este resultado na maioria dos animais, contudo os camundongos CBA tratados que morreram tardiamente (23%) apresentaram parasitemia elevada (41,2%).

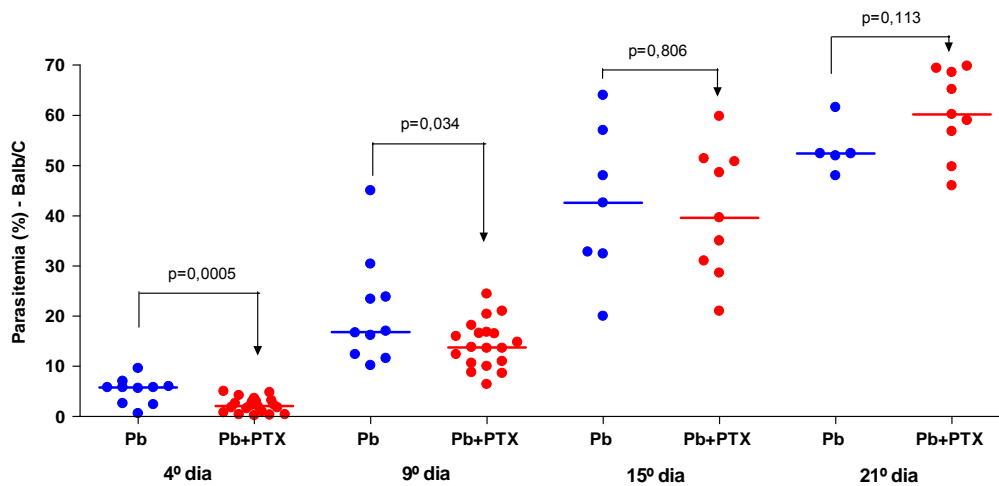


Figura 15. Influência da pentoxifilina sobre a parasitemia (%) dos camundongos Balb/C não susceptíveis à malária cerebral infectados com 10^6 hemácias parasitadas pelo *P. berghei* ANKA e tratados a partir do terceiro dia de infecção com 8mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX) ou NaCl 0,9% (Pb), nos 4º, 9º, 15º e 21º dias da infecção. No quarto ($p=0,0005$) e nono ($p=0,034$) dia de infecção, o grupo Pb+PTX apresentou um menor aumento da parasitemia em relação ao grupo Pb. No décimo quinto ($p=0,806$) e no vigésimo primeiro dia ($p=0,113$) não houve diferença estatística entre as medianas dos grupos. Análise realizada pelo teste *t*.

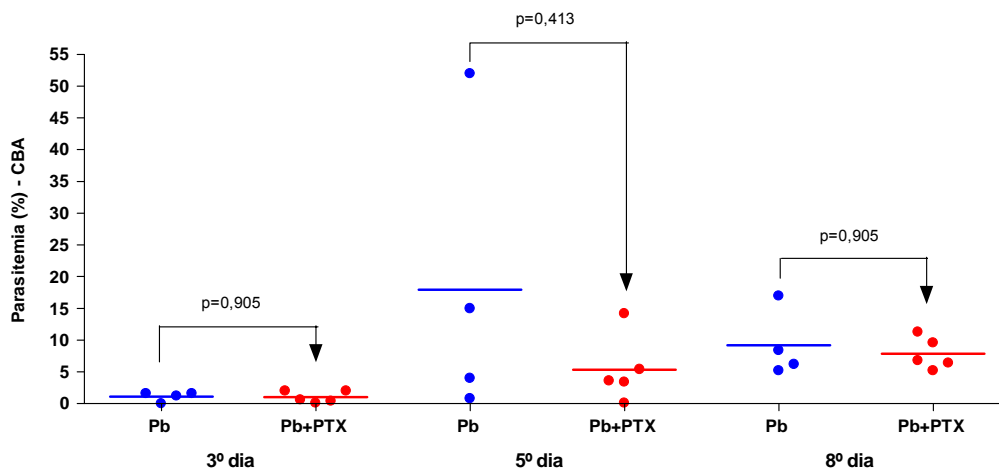


Figura 16. Influência da pentoxifilina sobre a parasitemia (%) dos camundongos CBA susceptíveis à malária cerebral infectados com 10^6 hemácias parasitadas pelo *P. berghei* ANKA e tratados a partir do terceiro dia de infecção com 8mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX) ou NaCl 0,9% (Pb), no 3º, 5º e 8º dia da infecção. Não houve diferença estatística entre as medianas dos dois grupos no terceiro ($p=0,905$), quinto ($p=0,413$) e oitavo ($p=0,905$) dia de infecção. Análise realizada pelo teste Mann-Whitney.

4.5.1 Aspectos morfológicos da parasitemia

Os aspectos morfológicos dos distendidos sangüíneos corados com panótico dos camundongos estudados encontram-se ilustrados na **figura 17**, nos quais estão representados as parasitemia dos animais CBA e Balb/C infectados com *Plasmodium berghei* ANKA no dia da morte espontânea. Observamos parasitemia alta nos camundongos Balb/C (52,4%) e parasitemia baixa (7,3%) nos camundongos CBA. O tratamento com pentoxifilina não modificou estes aspectos. Observamos também a presença de eritroblastos infectados após o décimo dia de infecção, nos camundongos Balb/C.

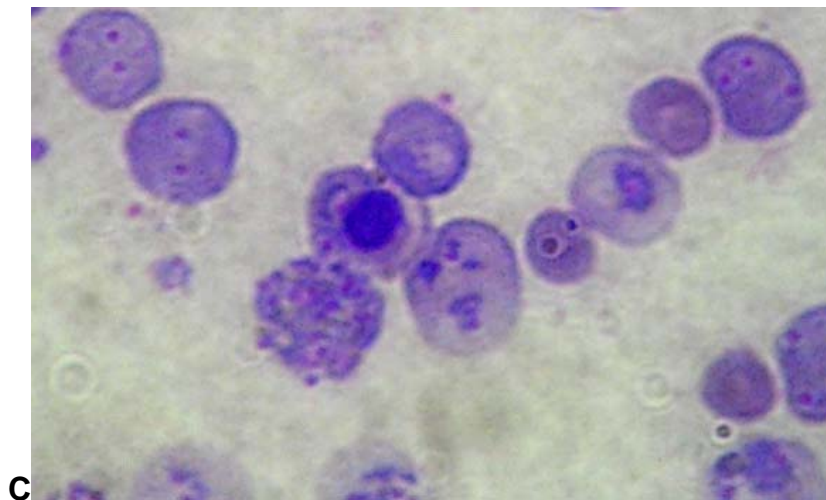
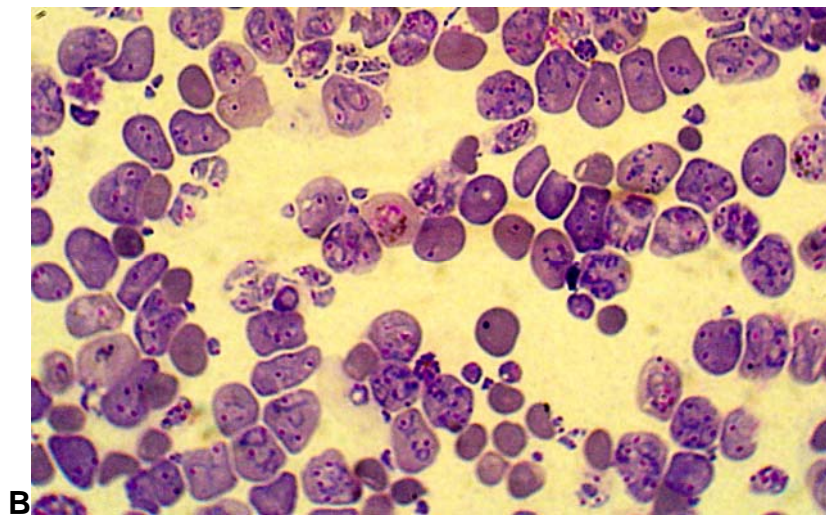
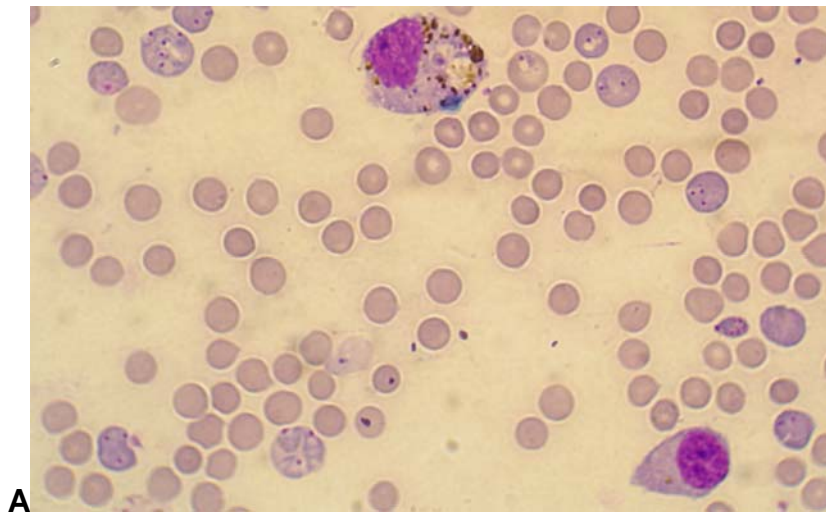


Figura 17. Parasitemia dos camundongos susceptíveis e não susceptíveis à malária cerebral, infectados com 10^6 eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA no dia da morte. A) Camundongo CBA. B) Camundongo Balb/C. C) Presença de eritroblastos infectados no camundongo Balb/C. Aumento de 1000x (Panótico).

4.6 Influência da pentoxifilina sobre a capacidade fagocitária dos macrófagos peritoneais dos camundongos CBA susceptíveis e Balb/C não susceptíveis à malária cerebral por *Plasmodium berghei* ANKA

A influência da pentoxifilina sobre a capacidade fagocitária dos macrófagos peritoneais dos camundongos não susceptíveis (Balb/C) e dos camundongos susceptíveis (CBA) infectados com *P. berghei* ANKA foi avaliada utilizando-se os parâmetros: índice fagocitário (IF), média de leveduras ingeridas/aderidas por macrófago (M) e proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose (MØ%). A avaliação da capacidade fagocitária foi realizada utilizando uma suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* sensibilizada com soro fresco de camundongo, ou não sensibilizada, na presença de soro fetal bovino inativado (SFB).

Pela fagocitose testada com leveduras sensibilizadas por opsoninas presentes no soro fresco de camundongo, principalmente proteínas do sistema complemento, procuramos avaliar a capacidade fagocitária por meio dos receptores para frações do sistema do complemento e receptores para a fração Fc das imunoglobulinas. Pela fagocitose testada na presença de soro fetal bovino inativado procuramos analisar a ingestão de leveduras pelos receptores para padrões moleculares de patógenos que reconhecem moléculas como manose e glucana presentes na superfície dos patógenos.

4.6.1 Fagocitose pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos

A avaliação da capacidade de ingerir leveduras pelos receptores para padrões de reconhecimento foi realizada utilizando 10^6 ou 4×10^6 leveduras não sensibilizadas por escavação.

Embora sem diferença estatística, a capacidade fagocitária nos camundongos CBA foi menor em todos os grupos estudados em comparação ao grupo controle, quando a proporção de 4×10^6 de leveduras não sensibilizadas foi utilizada, devido o menor envolvimento de macrófagos na fagocitose ($p > 0,05$, Kruskal-Wallis). Na proporção de 10^6 leveduras utilizada não houve diferença estatística entre as medianas dos índices fagocitários, envolvimento de macrófagos na fagocitose e quantidade de partículas ingeridas/aderidas entre os grupos estudados para os camundongos CBA (modelo susceptível à malária cerebral), $p > 0,05$, Kruskal-Wallis (**figura 18B,D,F e 19B,D,F**). Da mesma forma, não houve diferença significativa quando a capacidade fagocitária foi testada nos grupos de camundongos Balb/C (modelo não susceptível à MC), nas duas proporções de leveduras ($p > 0,05$, ANOVA; **figura 18A,C,E e 19A,C,E**).

Comparando-se a capacidade fagocitária nos dois modelos, observamos que todos os grupos dos camundongos não susceptíveis à MC (Balb/C) apresentaram a mediana do IF maior do que aquela dos animais do grupo CBA, embora somente os grupos tratados com a pentoxifilina, infectados ou não, tenham apresentado diferença estatística, nas duas proporções (10^6 ou 4×10^6) de leveduras não sensibilizadas estudadas (**figura 20A e 21A**). Isto foi devido ao maior envolvimento de macrófagos na fagocitose (**figura 20B e 21B**), pois a quantidade de leveduras ingeridas manteve-se inalterada; $p < 0,05$, Mann-Whitney (**figura 20C e 21C**).

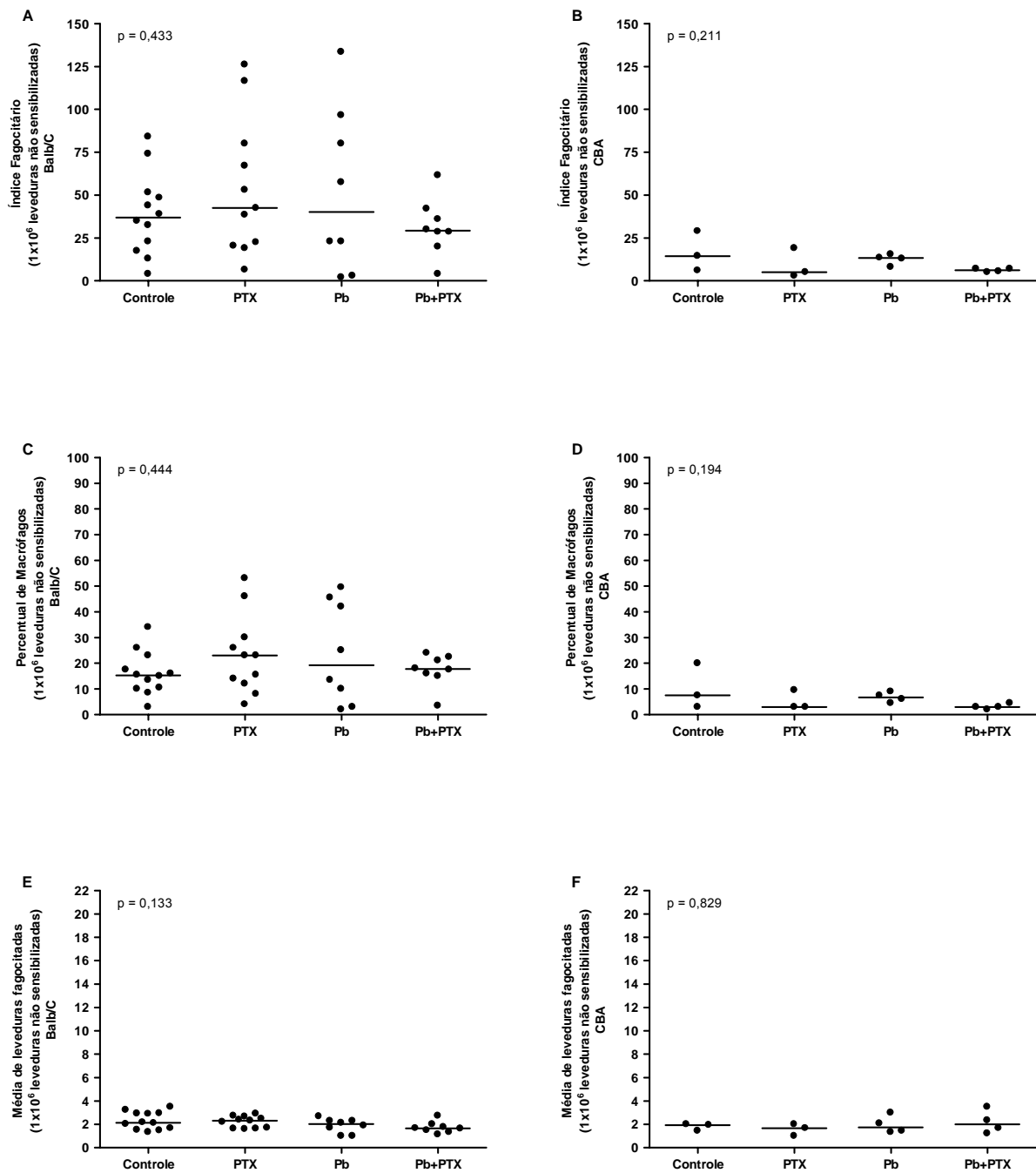


Figura 18. Influência da pentoxifilina sobre o índice fagocitário, percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose e média de leveduras ingeridas, nos modelos CBA e Balb/C de camundongos infectados ou não com *P. berghei* ANKA, nos seguintes grupos: camundongos não infectados tratados com salina 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX), animais infectados tratados com salina 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX). A fagocitose foi avaliada na presença de soro fetal bovino, utilizando 10⁶ leveduras não sensibilizadas. Teste de Kruskal-Wallis para o modelo CBA e teste de ANOVA para o modelo de camundongos Balb/C. O valor de p está descrito em cada gráfico.

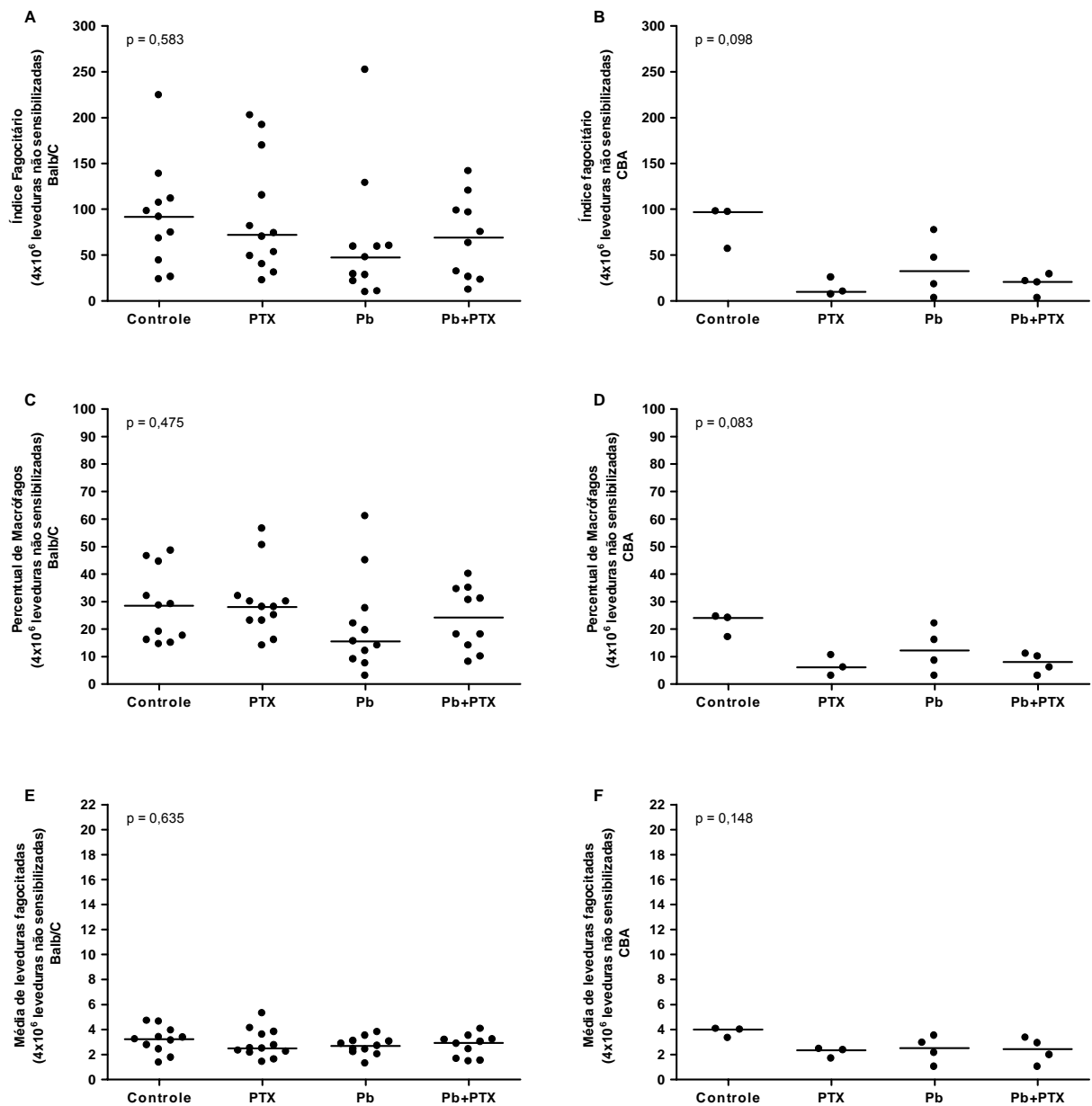


Figura 19. Influência da pentoxifilina sobre o índice fagocitário, percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose e média de leveduras ingeridas, nos modelos CBA e Balb/C de camundongos infectados ou não com *P. berghei* ANKA, nos seguintes grupos: camundongos não infectados tratados com salina 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX), animais infectados tratados com salina 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX). A fagocitose foi avaliada na presença de soro fetal bovino, utilizando 4x10⁶ leveduras não sensibilizadas. Teste de Kruskal-Wallis, para o modelo CBA e teste de ANOVA para o modelo Balb/C. O valor de p está descrito em cada gráfico.

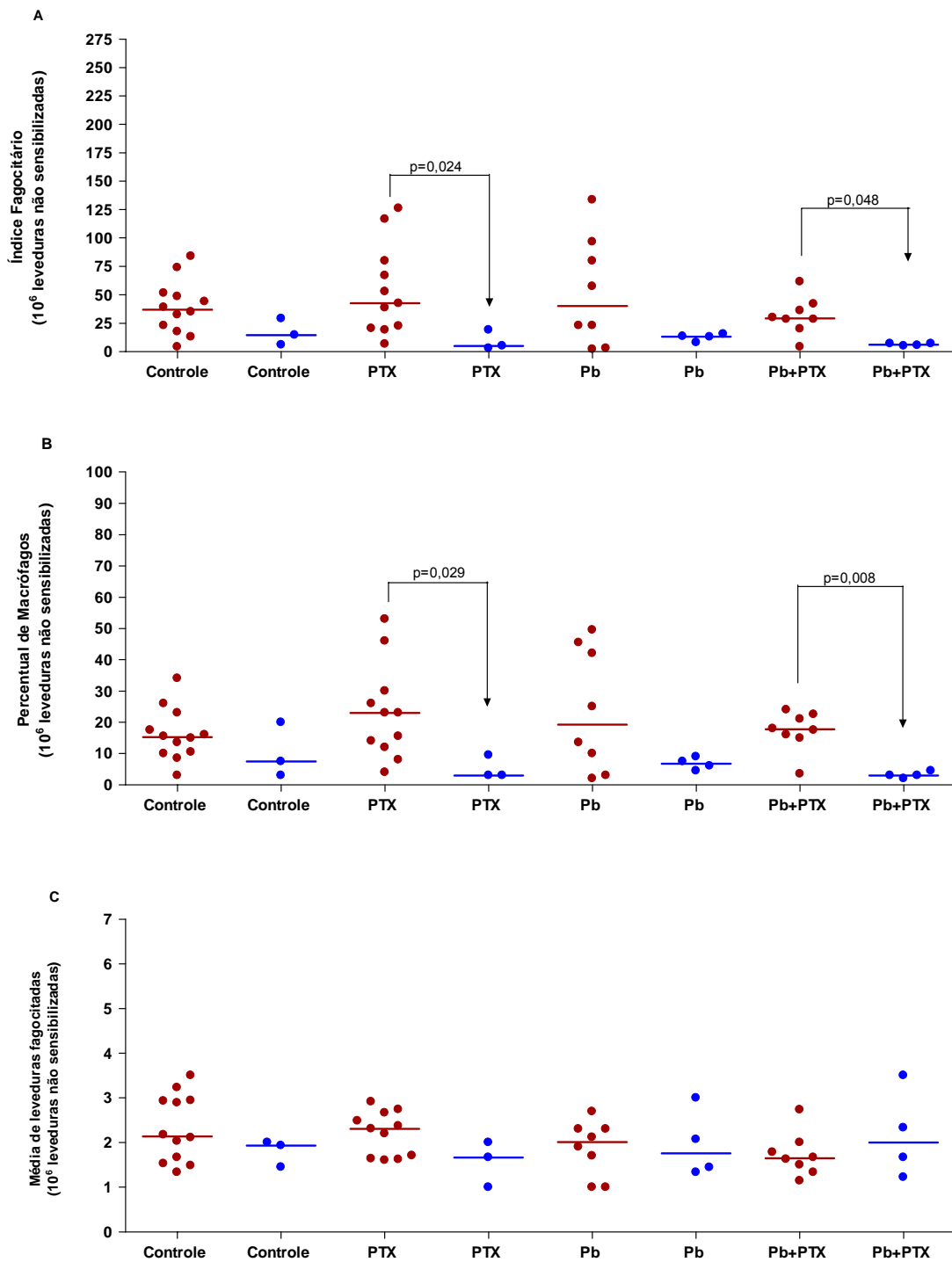


Figura 20. Análise comparativa da capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais utilizando 10⁶ leveduras não sensibilizadas entre os modelos: susceptível (CBA – ●) e não susceptível (Balb/C - ●) à malária cerebral. A) Camundongos Balb/C tratados com pentoxifilina tiveram a mediana do índice fagocitário maior em relação aos camundongos CBA. B) Camundongos Balb/C tratados com pentoxifilina apresentaram maior quantidade de macrófagos envolvidos na fagocitose do que os camundongos CBA. C) Não houve diferença na quantidade de leveduras fagocitadas entre os grupos (p>0,05). Análises realizadas pelo teste Mann-Whitney. Valores significantes de p foram apresentados nos gráficos.

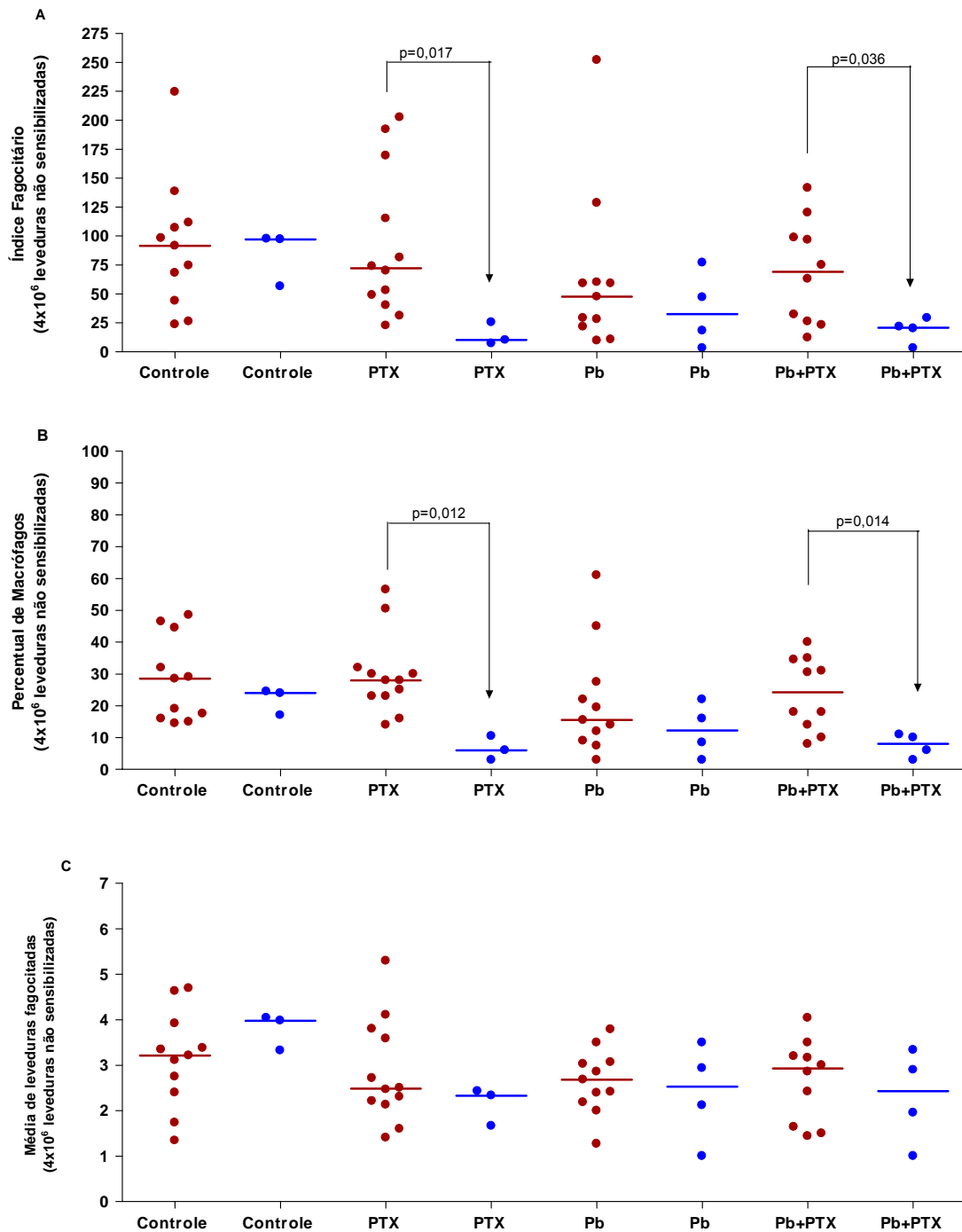


Figura 21. Análise comparativa da capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais utilizando 4×10^6 leveduras não sensibilizadas entre os modelos: susceptível (CBA – ●) e não susceptível (Balb/C – ●) à malária cerebral. A) Camundongos Balb/C tratados com pentoxifilina tiveram a mediana do índice fagocitário maior em relação aos camundongos CBA. B) Camundongos Balb/C tratados com pentoxifilina apresentaram maior quantidade de macrófagos envolvidos na fagocitose do que os camundongos CBA. C) Não houve diferença na quantidade de leveduras fagocitadas entre os grupos ($p > 0,05$). Análises realizadas pelo teste Mann-Whitney. Valores significantes de p foram apresentados nos gráficos.

4.6.2 Fagocitose pelos receptores para opsoninas

Pela fagocitose realizada na presença de soro fresco de camundongo procuramos avaliar a capacidade de fagocitar leveduras opsonizadas pelos macrófagos de camundongos susceptíveis (CBA) e não susceptíveis (Balb/C) à malária cerebral, por meio dos receptores para a fração Fc das imunoglobulinas e receptores para as proteínas do sistema complemento. Para tal, foram utilizadas duas proporções diferentes de leveduras sensibilizadas: 10^6 e 4×10^6 leveduras.

Em todos os grupos dos animais Balb/C houve aumento do índice fagocitário em relação ao grupo controle. Sendo que o grupo PTX foi capaz de aumentar a mediana do índice fagocitário (495) em relação a mediana do grupo controle (336) em 32,1%; a infecção malárica em 36,8% (532) e o tratamento com PTX dos animais infectados promoveu um aumento de 51% (686), quando utilizou-se 4×10^6 leveduras sensibilizadas ($p=0,019$, ANOVA; **figura 23A**). Isso deveu-se a um aumento discreto tanto da quantidade de macrófagos envolvidos na fagocitose ($p=0,143$, ANOVA; **figura 23B**) quanto da média de leveduras ingeridas por macrófagos ($p=0,544$, ANOVA; **figura 23C**).

Quando utilizamos 10^6 leveduras sensibilizadas, houve aumento da capacidade fagocitária nos dois grupos tratados com a pentoxifilina (PTX e PTX+Pb) ($p=0,033$, ANOVA; **figura 22C**), sendo que isto refletiu em um aumento similar no IF, embora sem significância estatística ($p=0,303$, ANOVA; **figura 22A**). Porém, não houve alteração na média de leveduras fagocitadas por macrófago ($p=0,937$, ANOVA; **figura 22E**).

No modelo CBA, não houve diferença estatística na fagocitose entre os quatro grupos estudados ($p>0,05$, Kruskal-Wallis) (**Figuras 22B,D,F e 23B,D,F**).

Comparando-se a capacidade fagocitária nos dois modelos, a pentoxifilina promoveu o aumento da mediana do índice fagocitário dos macrófagos dos

camundongos Balb/C em relação aos camundongos CBA ($p < 0,05$ para 10^6 e 4×10^6 , Mann-Whitney; **figura 24A e 25A**), por aumentar tanto a quantidade de macrófagos envolvidos na fagocitose ($p < 0,05$ para 10^6 e 4×10^6 , Mann-Whitney; **figura 24B e 25B**) quanto o número médio de partículas ingeridas por macrófago ($p < 0,05$ para 10^6 e 4×10^6 ; Mann-Whitney; **figura 24C e 25C**). Quando utilizamos 4×10^6 , esta diferença ficou evidente para todos os grupos, exceto o controle ($p < 0,05$, Mann-Whitney e **figura 25**).

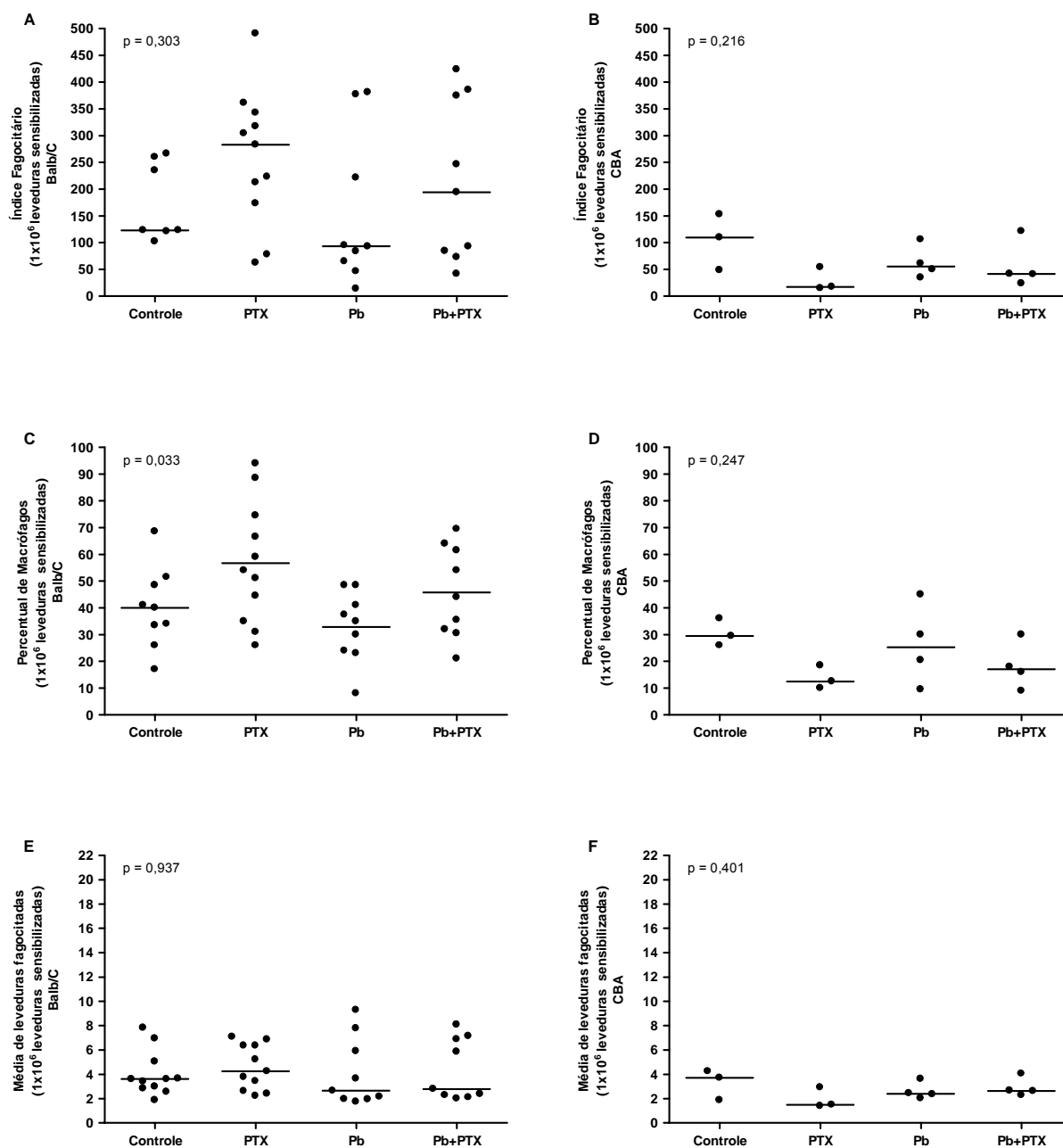


Figura 22. Influência da pentoxifilina sobre o índice fagocitário, percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose e média de leveduras ingeridas, em modelos de camundongos CBA (B, D, F) e modelos Balb/C (A, C, E) infectados ou não com *P. berghei* ANKA, nos seguintes grupos: camundongos não infectados tratados com salina 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX), animais infectados tratados com salina 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX). A fagocitose foi avaliada na presença de soro fresco murino, utilizando 10^6 leveduras sensibilizadas. A análise foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis no modelo CBA e pelo teste de ANOVA no modelo Balb/C. O valor de p está descrito em cada gráfico. Segundo o método comparativo de Student-Newman-Keuls aplicado ao teste de ANOVA, a pentoxifilina promoveu um percentual maior de macrófagos envolvidos na fagocitose nos camundongos Balb/C (p=0,033).

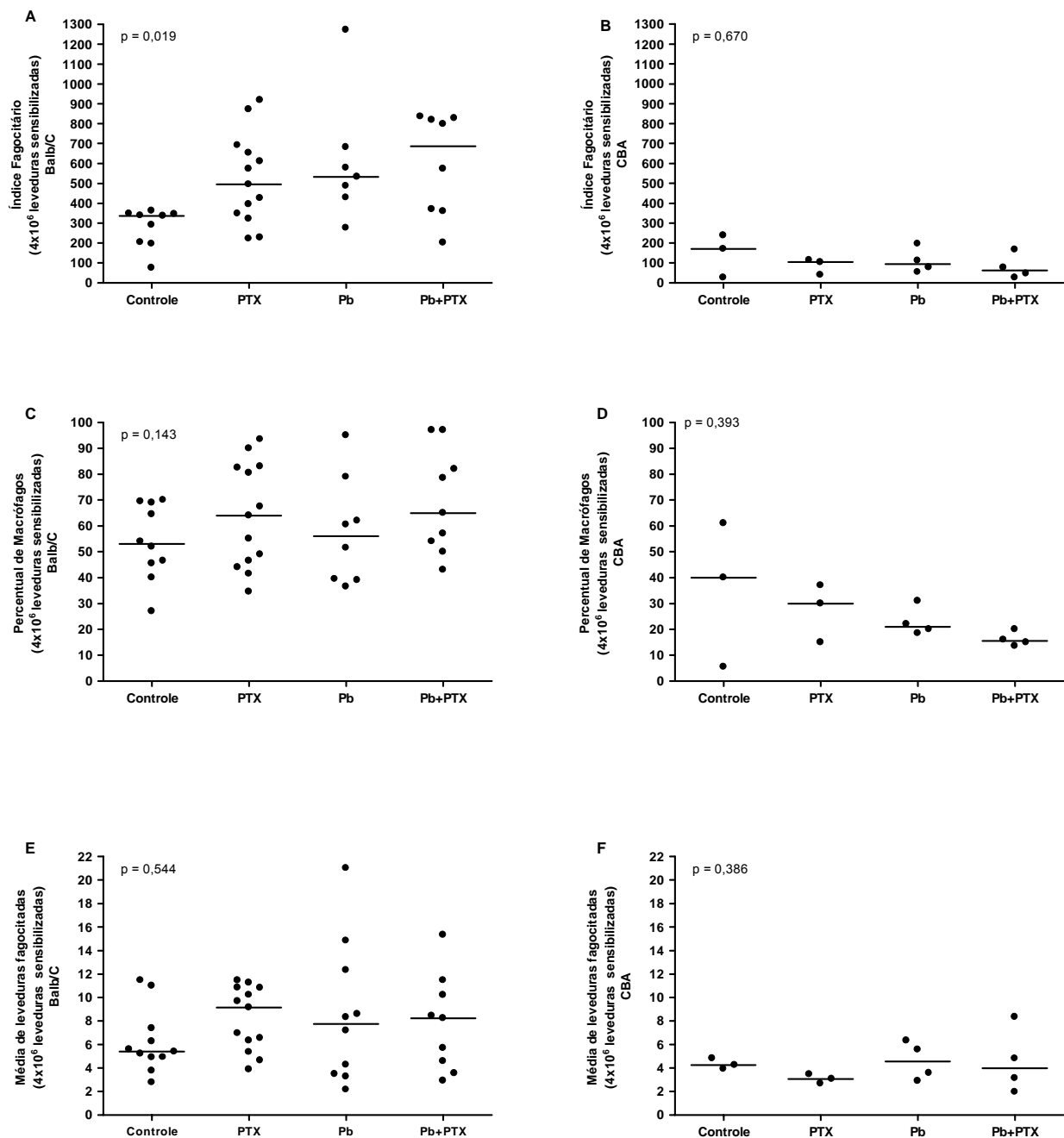


Figura 23. Influência da pentoxifilina sobre o índice fagocitário, percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose e média de leveduras ingeridas, em modelos de camundongos CBA (B, D, F) e Balb/C (A, C, E) infectados ou não com *P. berghei* ANKA, nos seguintes grupos: camundongos não infectados tratados com salina 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX), animais infectados tratados com salina 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX). A fagocitose foi avaliada na presença de soro fresco murino, utilizando 4x10⁶ leveduras sensibilizadas. A análise foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis no modelo CBA e pelo teste de ANOVA no modelo Balb/C. O valor de p está descrito em cada gráfico. Segundo o método comparativo de Student-Newman-Keuls aplicado ao teste de ANOVA, a pentoxifilina promoveu aumento do índice fagocitário nos camundongos Balb/C (p=0,019).

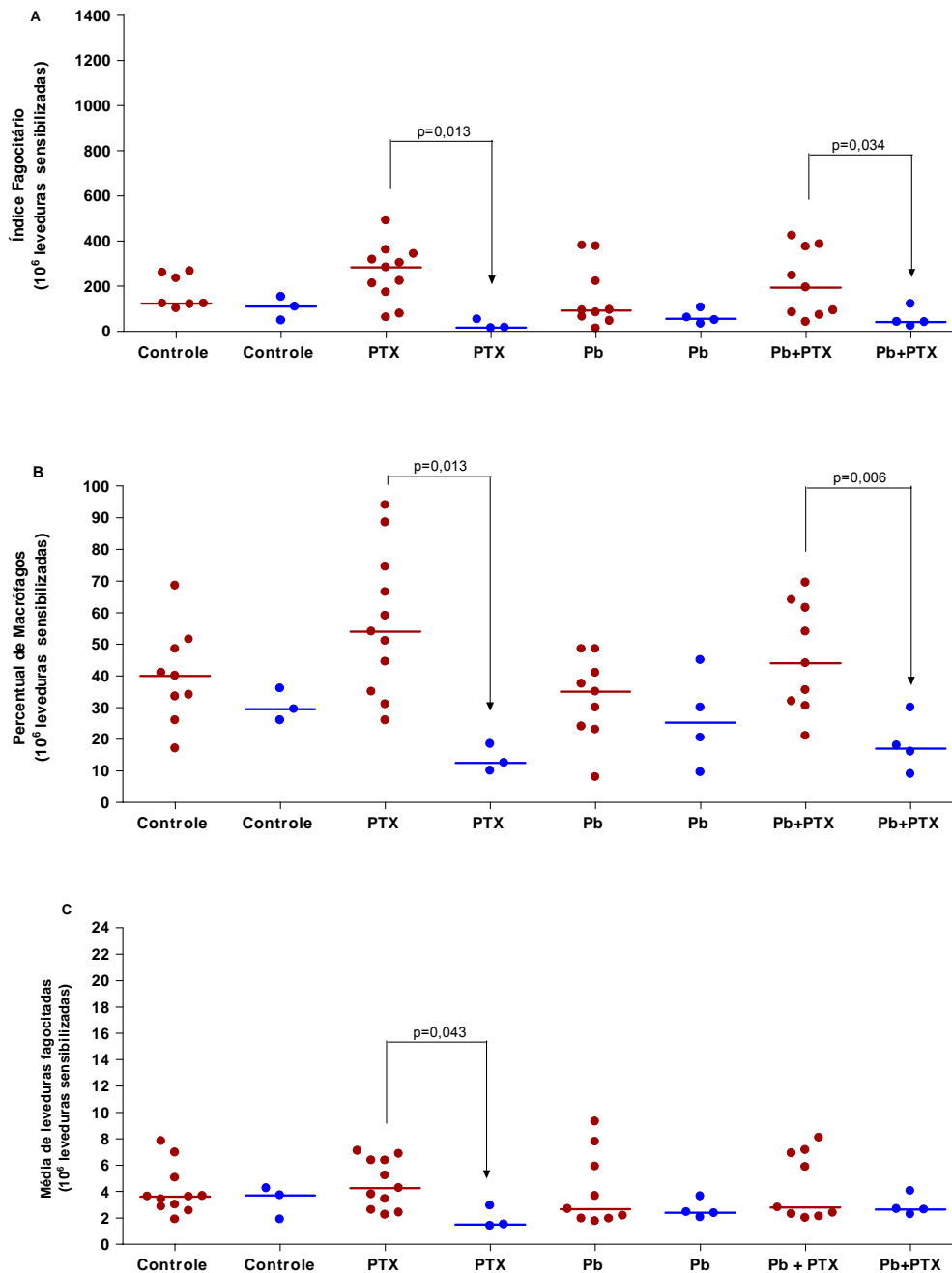


Figura 24. Análise comparativa da capacidade fagocitária dos macrófagos peritoneais utilizando 10⁶ leveduras sensibilizadas entre os modelos: susceptível (CBA – ●) e não susceptível (Balb/C - ●) à malária cerebral. A) Camundongos CBA tratados com pentoxifilina tiveram a mediana do índice fagocitário dos macrófagos menor em relação aos camundongos Balb/C; p=0,013 para o grupo PTX e p=0,034 para o grupo Pb+PTX. Não houve diferença estatística entre os demais grupos (p>0.05). B) Camundongos Balb/C apresentaram o percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose maior que os camundongos CBA, nos grupos tratados com pentoxifilina; p=0,013 para o grupo PTX e p=0,006 para o grupo Pb+PTX. Não houve diferença estatística entre os demais grupos (p>0.05). C) Não houve diferença na quantidade de leveduras fagocitadas entre os grupos (p>0,05), exceto entre os grupos PTX onde a pentoxifilina promoveu um aumento na ingestão de leveduras no modelo Balb/C; p=0,043. Análises realizadas pelo teste Mann-Whitney.

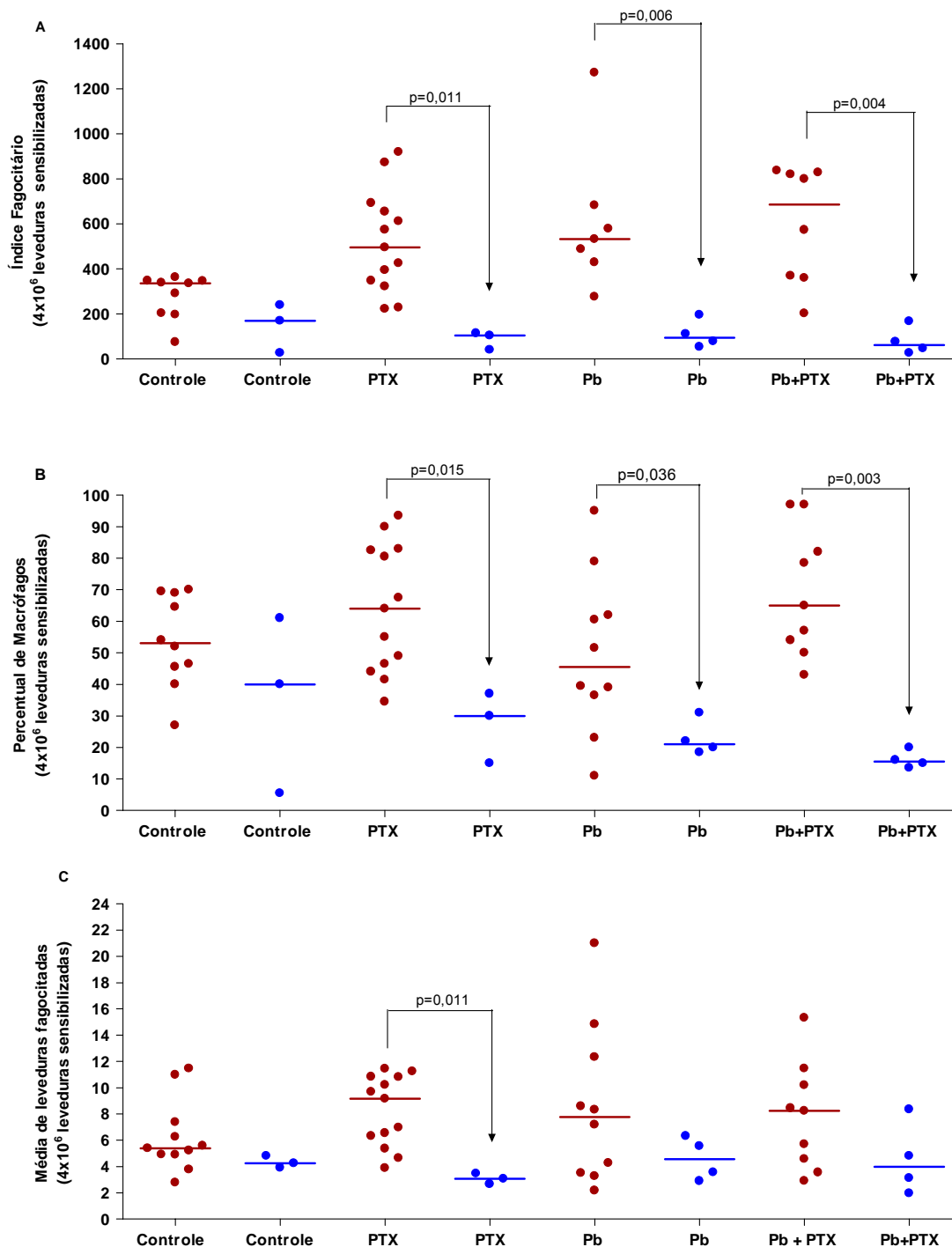


Figura 25. Análise comparativa da capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais utilizando 4×10^6 leveduras sensibilizadas entre os modelos: susceptível (CBA – ●) e não susceptível (Balb/C - ●) à malária cerebral. A) Exceto entre o grupo controle ($p < 0,05$), os camundongos CBA apresentaram a mediana do índice fagocitário menor em relação aos camundongos Balb/C ($p = 0,05$). B) Camundongos Balb/C apresentando o percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose maior que os camundongos CBA ($p < 0,05$), exceto no grupo controle. C) O modelo murino Balb/C fagocita mais leveduras que o CBA, principalmente no grupo PTX ($p = 0,011$). Análises realizadas pelo teste Mann-Whitney. Valores de p significantes foram apresentados nos gráficos.

4.6.3 Aspectos morfológicos da fagocitose

Os aspectos morfológicos da fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae* pelos macrófagos peritoneais dos animais estudados encontram-se nas **figuras 26 e 27**, nas quais estão representadas a fagocitose por meio de receptores para padrões de reconhecimento, na presença de soro fetal bovino e por receptores para opsoninas, na presença de soro fresco de camundongo.

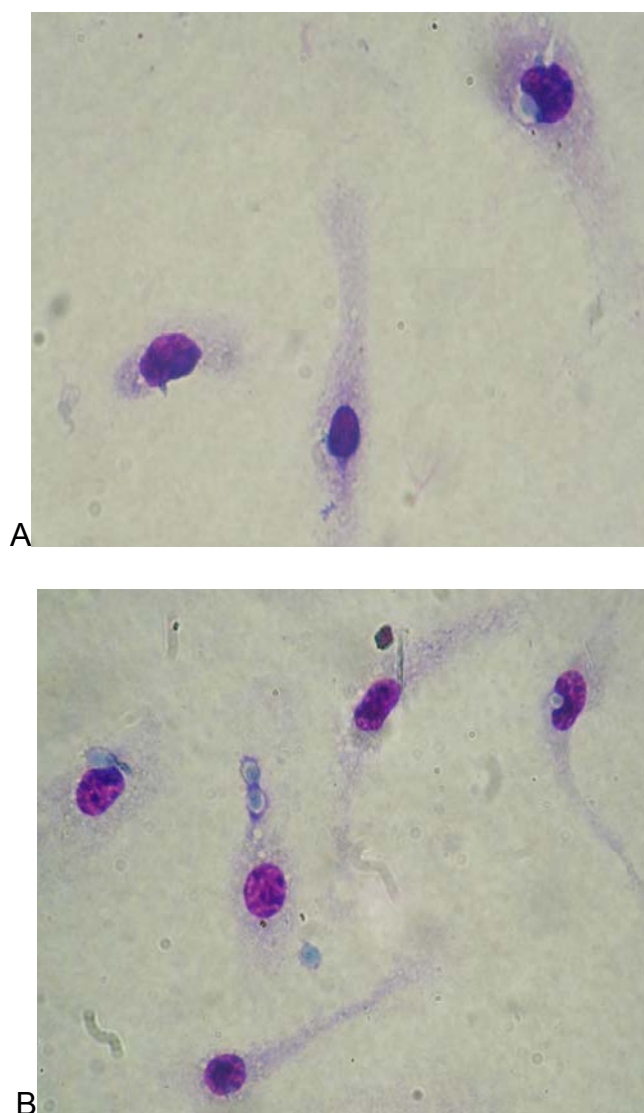


Figura 26. Fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae* por macrófagos peritoneais de camundongos infectados com *P. berghei* ANKA, testada por meio de receptores para padrão de reconhecimento, na presença de soro fetal bovino. A) Camundongos CBA. B) Camundongos Balb/C. Aumento de 1000x (Panótico).

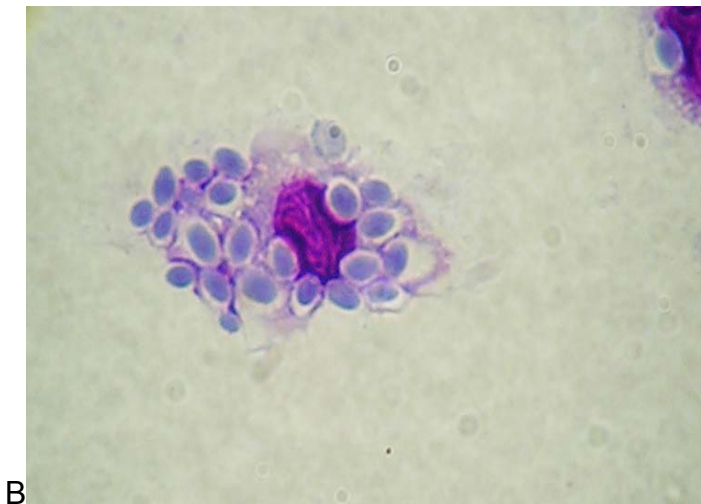
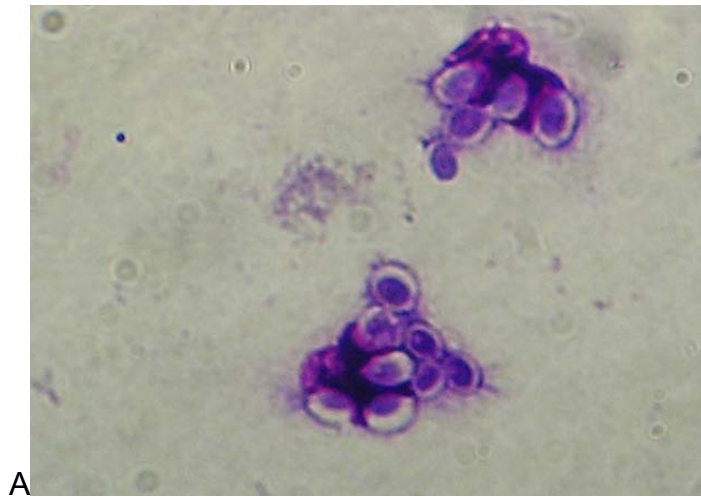


Figura 27. Fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae* por macrófagos peritoneais de camundongos infectados com *P. berghei* ANKA, testada por meio de receptores para opsoninas, na presença de soro fresco de camundongo. A) Camundongos CBA. B) Camundongos Balb/C. Aumento de 1000x (Panótico).

4.7 Produção de fator de necrose tumoral

Para avaliar se a pentoxifilina influencia a produção do fator de necrose tumoral em camundongos susceptíveis (CBA) e não susceptíveis (Balb/C) à malária cerebral, o soro e o sobrenadante das culturas de macrófagos estimulados ou não com lipopolissacarídeos foram coletados no oitavo dia de infecção malárica, sendo o FNT determinado pelo teste de ELISA.

4.7.1 Produção de fator de necrose tumoral pelos camundongos Balb/C não susceptíveis à malária cerebral

Observamos que nos camundongos Balb/C, nem a infecção malárica e nem o tratamento com a pentoxifilina influenciaram a produção de fator de necrose tumoral basal no sobrenadante das culturas de macrófagos ($p=0,436$, Kruskal-Wallis; **figura 28A**). O mesmo foi verificado quando as culturas foram estimuladas com LPS ($p=0,559$, Kruskal-Wallis; **figura 28B**). Também não houve diferença nos níveis séricos de FNT entre os quatro grupos analisados ($p=0,187$, Kruskal-Wallis; **figura 28C**). Entretanto, as concentrações de FNT foram mais elevadas no sobrenadante das culturas do que no soro dos animais ($p>0,01$, Kruskal-Wallis; **figura 29**)

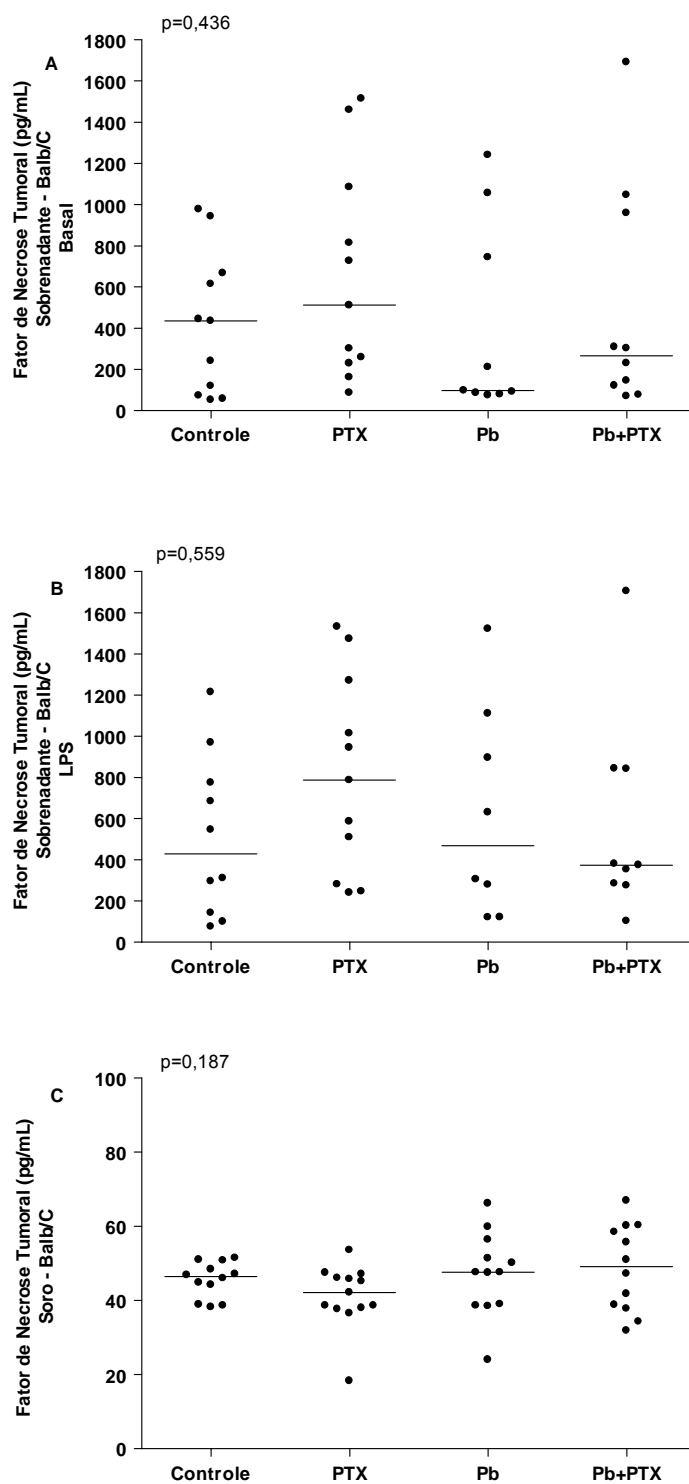


Figura 28. Influência da pentoxifilina sobre a produção basal e estimulada de fator de necrose tumoral por macrófagos peritoneais, *in vitro*, e sobre os níveis séricos desta citocina, no oitavo dia de infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA nos camundongos Balb/C. Os grupos estudados foram: camundongos não infectados tratados com NaCl 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e camundongos infectados tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com pentoxifilina (Pb+PTX). A) Produção basal de FNT quantificado no sobrenadante das culturas de macrófagos; p=0,436; B) Produção de FNT quantificado nas culturas de macrófagos após estímulo com LPS; p=0,558; C) Níveis séricos de FNT; p=0,187. Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos.

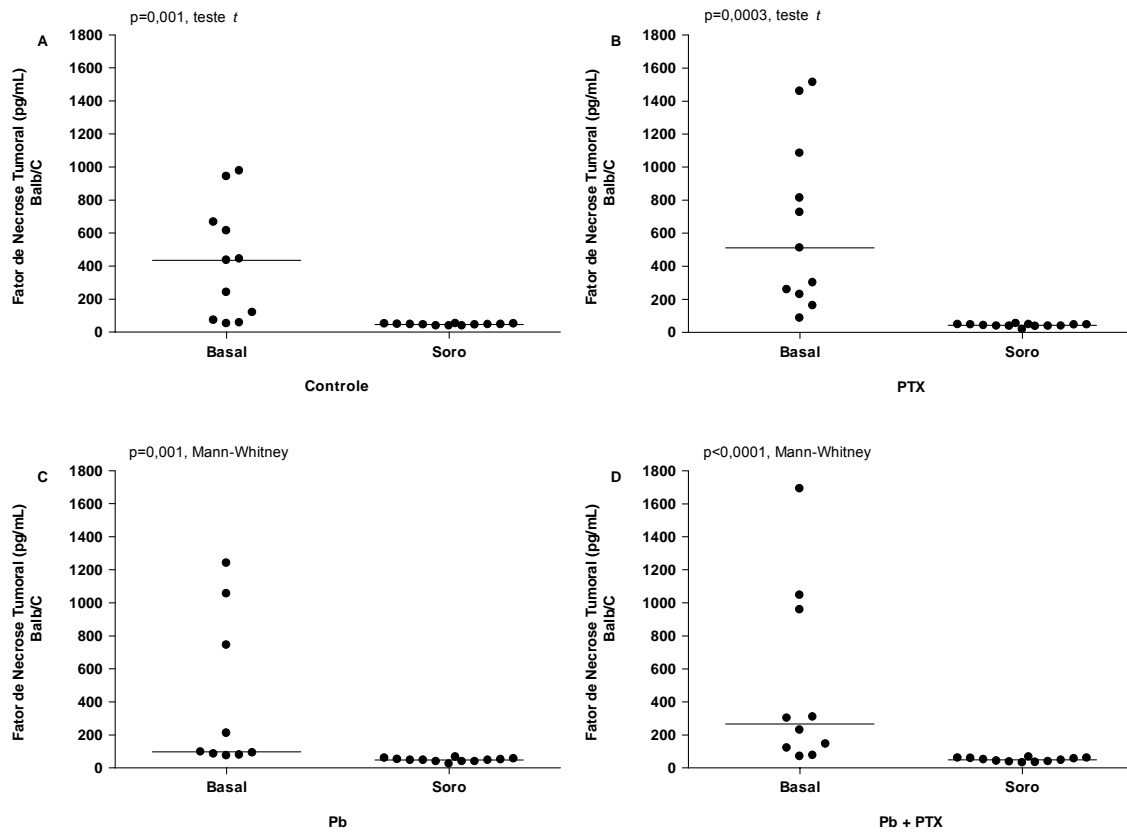


Figura 29. Análise comparativa entre os níveis de FNT no soro e no sobrenadante das culturas de macrófagos peritoneais no oitavo dia de infecção pelo *P. berghei* ANKA nos camundongos Balb/C. A) camundongos não infectados tratados com NaCl 0,9%; B) camundongos não infectados tratados com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina; C) camundongos infectados tratados com NaCl 0,9%; e D) camundongos infectados tratados com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina. Os níveis de FNT no sobrenadante das culturas dos macrófagos peritoneais foi significativamente maior do que os níveis séricos.

4.7.2 Produção de fator de necrose tumoral pelos camundongos CBA susceptíveis à malária cerebral

Nos camundongos CBA, a infecção malárica não influenciou a produção de fator de necrose tumoral basal ($p=0,127$, Kruskal-Wallis; **figura 30A**) ou estimulada por LPS ($p=0,245$, Kruskal-Wallis; **figura 30B**) pelos macrófagos peritoneais. Da mesma forma, não houve diferença estatística na concentração sérica de FNT entre os quatro grupos estudados ($p=0,101$, Kruskal-Wallis; **figura 30C**).

Entretanto, exceto para o grupo infectado e tratado com PTX, houve uma tendência para as concentrações séricas desta citocina serem menores do que os valores observados no sobrenadante das culturas ($p>0,05$; **figura 31A e 31B**), sendo esta diferença significativa para o grupo infectado tratado com NaCl 0,9% (Pb), no qual a concentração de FNT no sobrenadante foi o dobro daquela observada no soro ($p=0,029$, Mann-Whitney; **figura 31C**); Para os animais infectados e tratados com PTX, as concentrações do FNT foram menores e não houve diferença entre os dois grupos ($p=0,841$, Mann-Whitney; **figura 31D**).

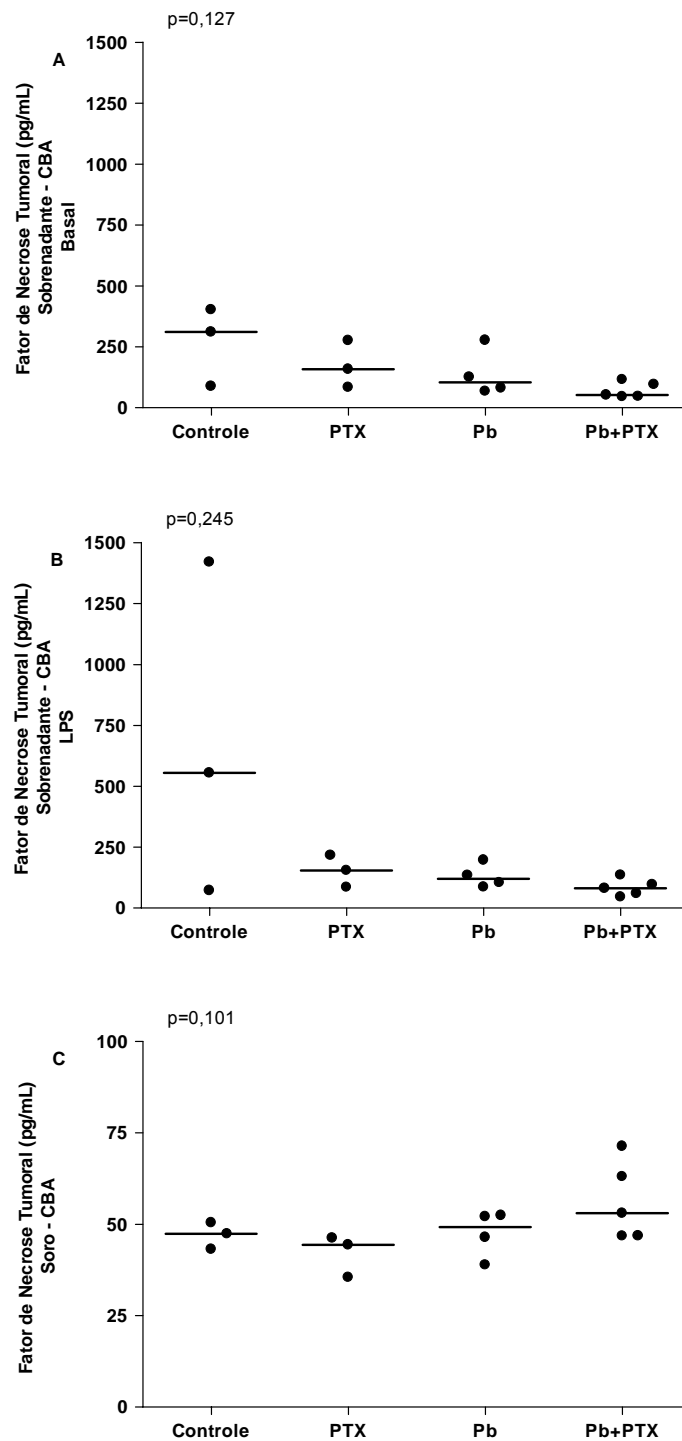


Figura 30. Influência da pentoxifilina sobre a produção basal e estimulada de fator de necrose tumoral por macrófagos peritoneais, *in vitro*, e sobre os níveis séricos desta citocina, no oitavo dia de infecção do *Plasmodium berghei* ANKA nos camundongos CBA. Os grupos estudados foram: camundongos não infectados tratados com NaCl 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e camundongos infectados tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com pentoxifilina (Pb+PTX). A) Produção basal de FNT quantificado no sobrenadante das culturas de macrófagos; p=0,127; B) Produção de FNT quantificado nas culturas de macrófagos após estímulo com LPS; p=0,245; C) Produção de FNT no soro dos animais Balb/C; p=0,101. Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos.

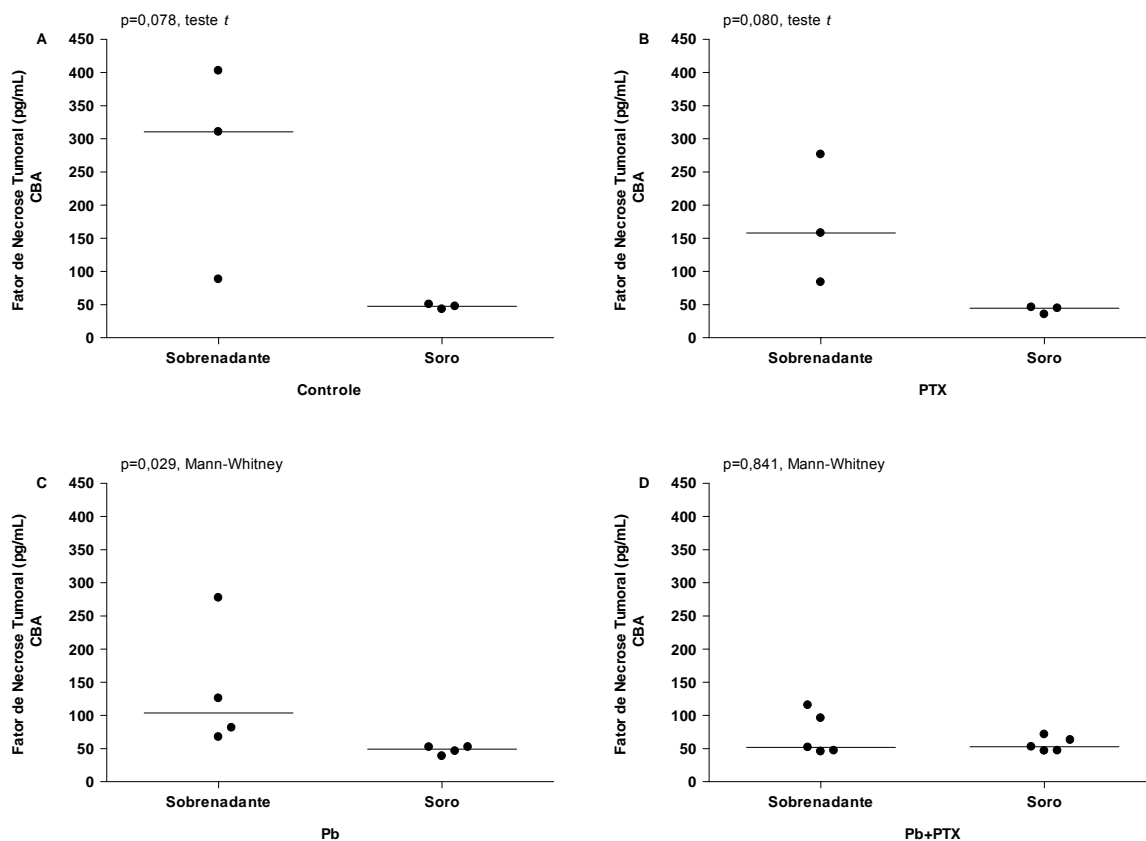


Figura 31. Níveis de FNT no soro e no sobrenadante de macrófagos peritoneais no oitavo dia de infecção pelo *P. berghei* ANKA nos camundongos CBA. A) camundongos não infectados tratados com NaCl 0,9%; B) camundongos não infectados tratados com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina; C) camundongos infectados tratados com NaCl 0,9%; e D) camundongos infectados tratados com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina. Os níveis de FNT no sobrenadante das culturas dos macrófagos peritoneais dos camundongos infectados foi significativamente maior que os níveis séricos, exceto para os animais infectados e tratados com pentoxifilina.

4.7.3 Análise comparativa da produção de fator de necrose tumoral pelos camundongos Balb/C não susceptíveis e os CBA susceptíveis à malária cerebral

Exceto para o grupo controle, observamos uma tendência a menor produção basal de FNT pelos macrófagos peritoneais dos camundongos CBA (susceptíveis à malária cerebral) do que pelos animais Balb/C (não susceptíveis) ($p > 0,05$ Mann-Whitney, **Figuras 32A, B, C**), sendo esta diferença significativa para os animais infectados e tratados com a pentoxifilina ($p = 0,008$, Mann-Whitney, **Figura 32D**). Quando o LPS foi acrescentado as culturas, não houve diferença na produção de FNT entre os dois modelos ($p > 0,05$, Mann-Whitney; **figura 33 e 34**). Com também não houve diferença na concentração sérica de FNT entre os dois modelos estudados ($p > 0,05$, Mann-Whitney, **figura 34**).

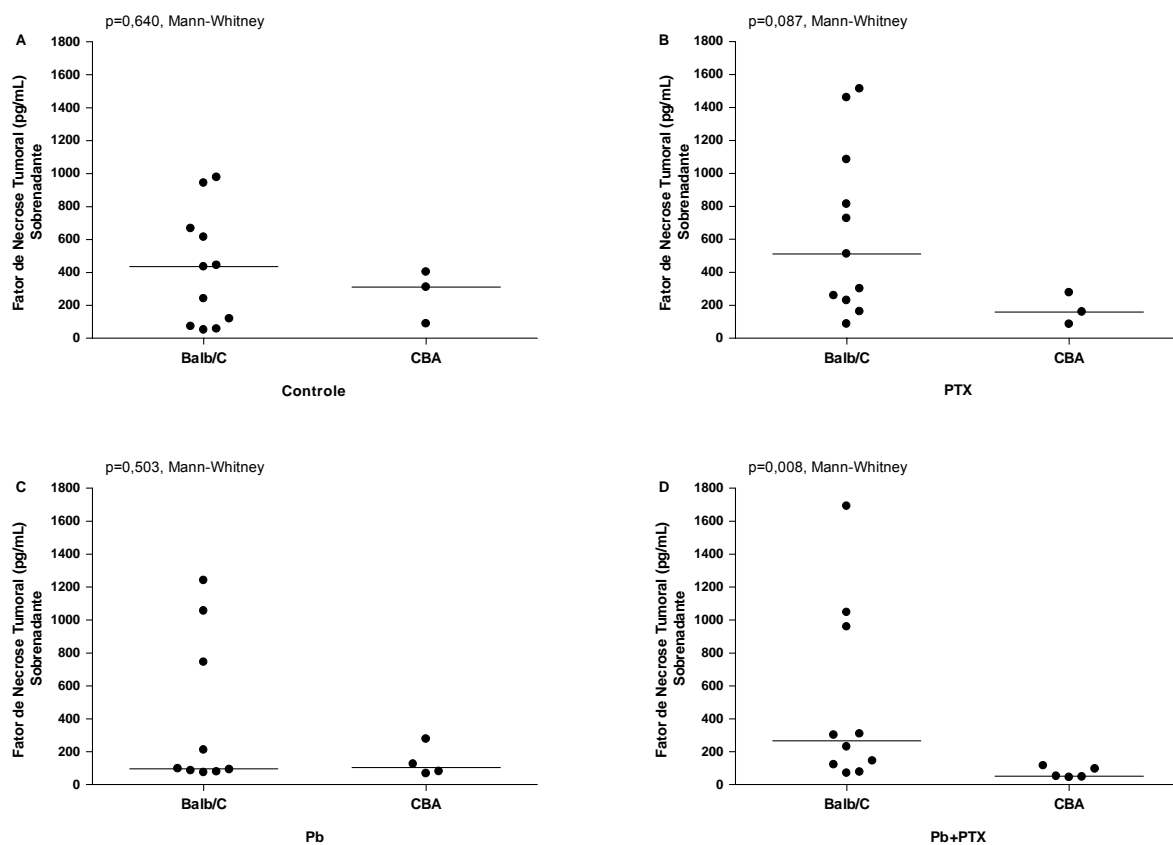


Figura 32. Análise comparativa da produção basal de FNT nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais no oitavo dia da infecção pelo *P. berghei* ANKA entre os camundongos Balb/C e CBA. A) camundongos não infectados tratados com NaCl 0,9%; B) camundongos não infectados tratados com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina; C) camundongos infectados tratados com NaCl 0,9%; e D) camundongos infectados tratados com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina.

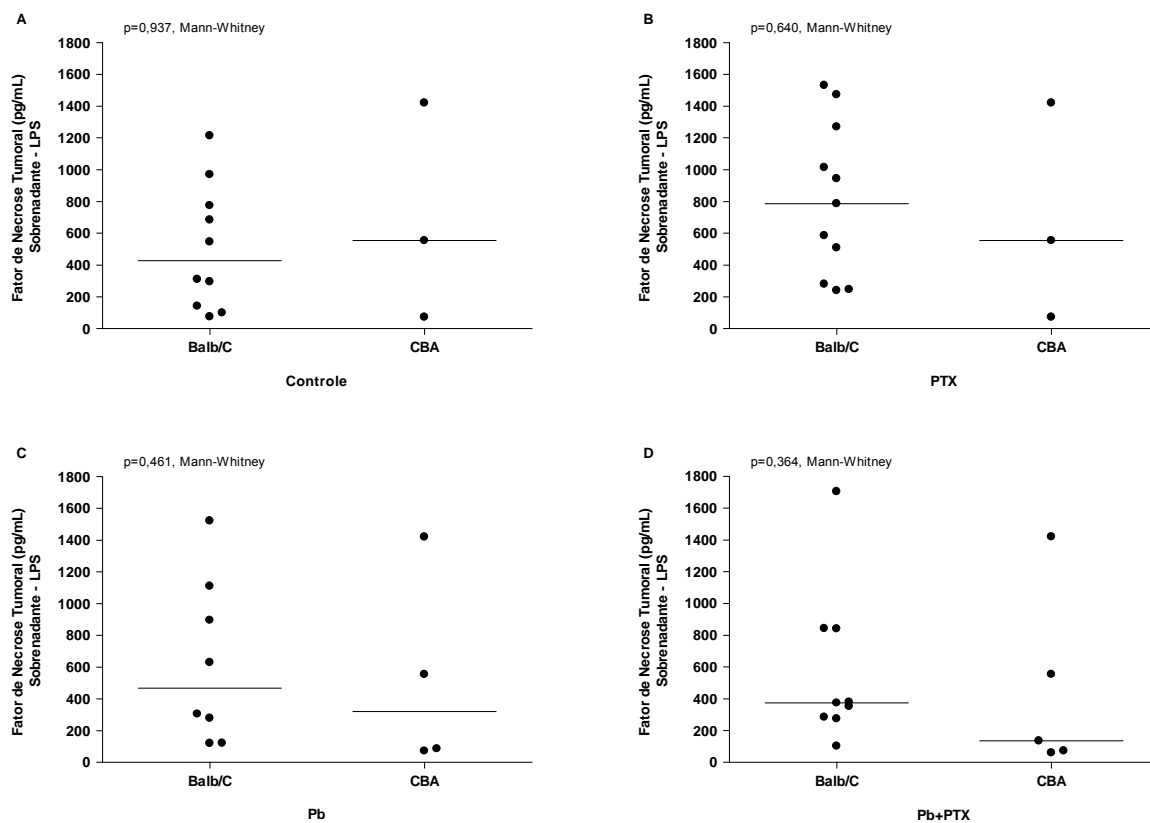


Figura 33. Análise comparativa da concentração de FNT nos sobrenadantes das culturas após estímulo com LPS, no oitavo dia de infecção pelo *P. berghei* ANKA entre os camundongos Balb/C e CBA. A) camundongos não infectados tratados com NaCl 0,9%; B) camundongos não infectados tratados com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina; C) camundongos infectados tratados com NaCl 0,9%; e D) camundongos infectados tratados com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina.

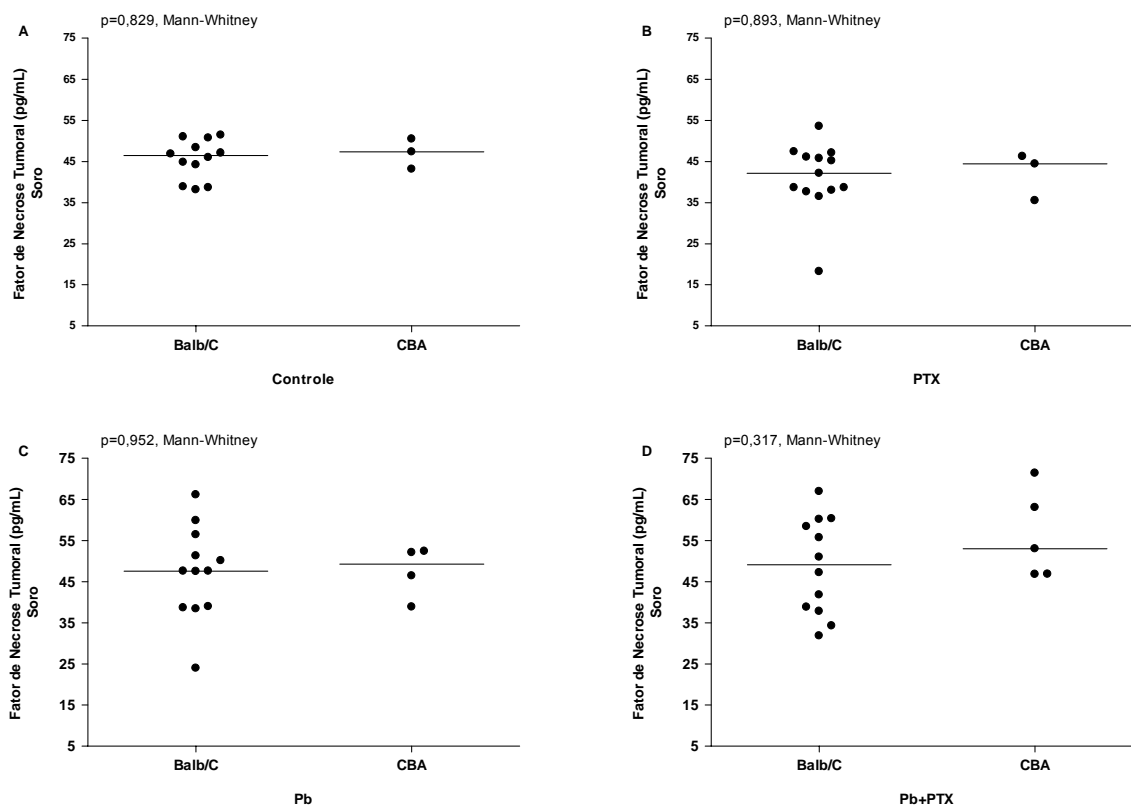


Figura 34. Análise comparativa da concentração sérica de FNT no oitavo dia de infecção pelo *P. berghei* ANKA entre os camundongos Balb/C e CBA. A) camundongos não infectados tratados com NaCl 0,9%; B) camundongos não infectados tratados com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina; C) camundongos infectados tratados com NaCl 0,9%; e D) camundongos infectados tratados com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina.

4.8 Produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais de camundongos CBA susceptíveis e Balb/C não susceptíveis à malária cerebral na infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA

Para avaliar a influência da pentoxifilina sobre a produção de peróxido de hidrogênio, basal e após estímulo com PMA, nos dois modelos murinos, o sobrenadante das culturas dos macrófagos peritoneais foram coletados no oitavo dia da infecção malárica e a produção do peróxido de hidrogênio foi avaliada, *in vitro*, pelo método de Pick e Keisari (1980) de oxidação do vermelho de fenol na presença de peroxidase, sendo a concentração expressa em $\mu\text{M}/1,5 \times 10^5 \text{ MØ}/\text{h}$.

Não houve diferença estatística na produção basal ou estimulada do peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais dos camundongos Balb/C ($p=0,998$ e $p=0,990$; respectivamente, ANOVA, **figura 35A e B**). Também não foi possível detectar diferença na produção do H_2O_2 basal ou estimulada entre os grupos de camundongos CBA estudados ($p=0,953$ e $p=0,979$, respectivamente; Kruskal-Wallis; **figuras 35C e D**).

Entretanto, embora sem significância estatística, observamos uma menor produção deste radical livre pelos macrófagos dos camundongos CBA, susceptíveis à malária cerebral, $p=0,685$, Kruskal-Wallis (**figura 36**). Após estímulo com PMA, a diferença de produção do peróxido de hidrogênio entre os dois modelos ficou menos evidente, $p=0,991$, Kruskal-Wallis (**figura 37**).

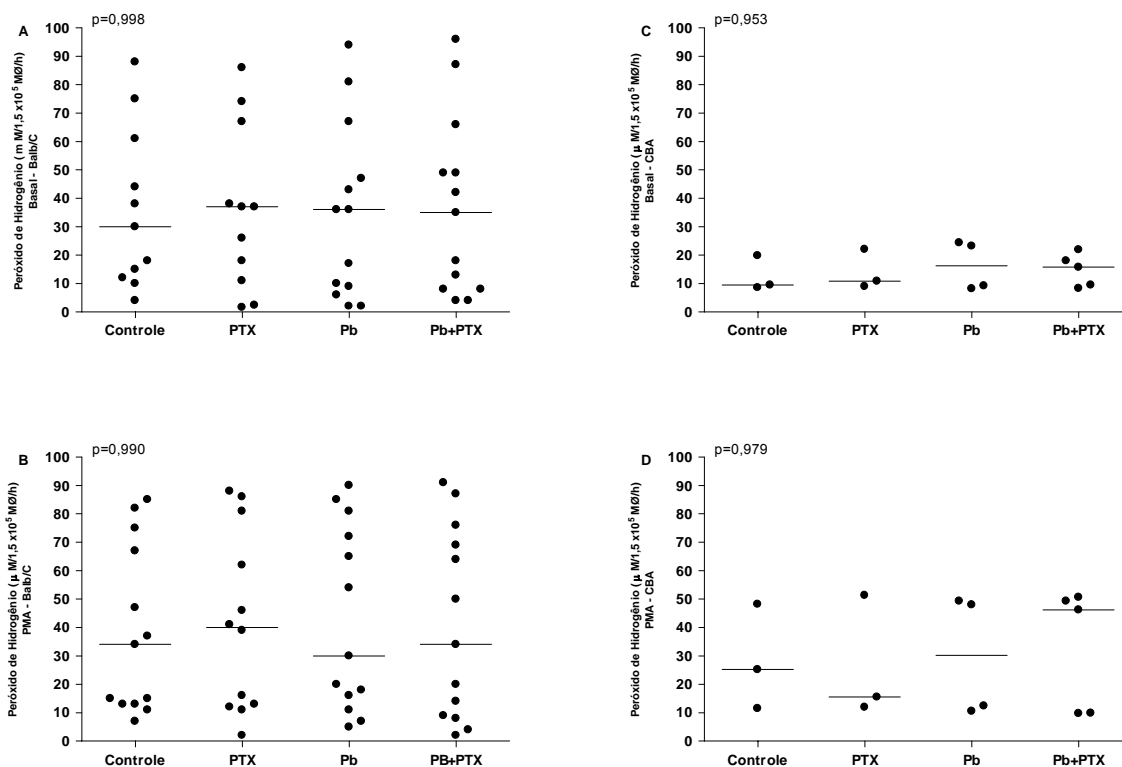


Figura 35. Influência da pentoxifilina sobre a produção, *in vitro*, de peróxido de hidrogênio nos modelos susceptíveis (CBA) ou não (Balb/C) à malária cerebral, nos grupos infectados com *P. berghei* ANKA, tratados (Pb+PTX) ou não (Pb) com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina e nos camundongos não infectados tratados (PTX) ou não com pentoxifilina (Controle). A) Produção basal de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais dos camundongos Balb/C, $p>0,05$, ANOVA. B) Produção de peróxido de hidrogênio após estímulo com PMA pelos macrófagos peritoneais dos camundongos Balb/C, $p>0,05$, ANOVA C) Produção basal de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais dos camundongos CBA, $p>0,05$, Kruskal-Wallis. D) Produção de peróxido de hidrogênio após estímulo com PMA pelos macrófagos peritoneais dos camundongos CBA $p>0,05$, Kruskal-Wallis.

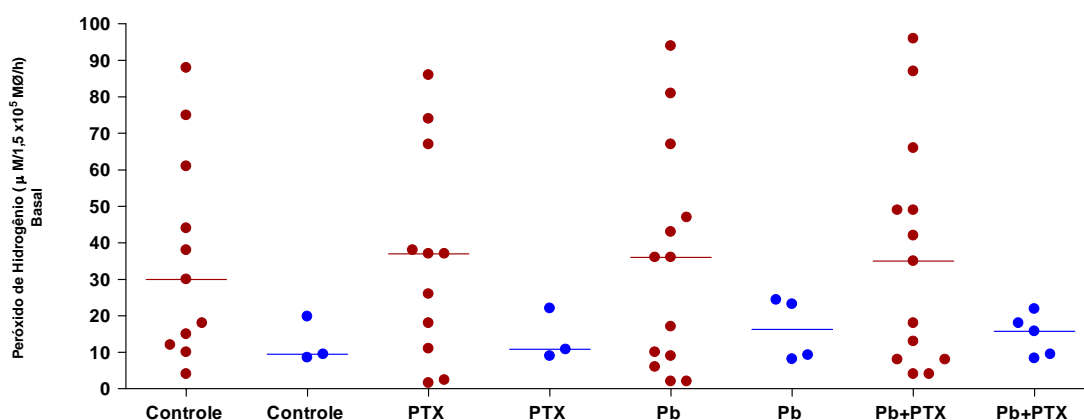


Figura 36. Análise comparativa da influência da pentoxifilina sobre a produção basal, *in vitro*, de peróxido de hidrogênio nos modelos susceptíveis (CBA – \bullet) ou não (Balb/C – \bullet) à malária cerebral. Embora sem diferença estatística, observamos uma menor concentração do peróxido de hidrogênio nos camundongos CBA. O estudo foi realizado nos seguintes grupos: Camundongos não infectados, tratados (PTX) ou não (Controle) com pentoxifilina e infectados com *P. berghei* ANKA, tratados (Pb+PTX) ou não (Pb) com pentoxifilina. $p=0,685$, Kruskal-Wallis

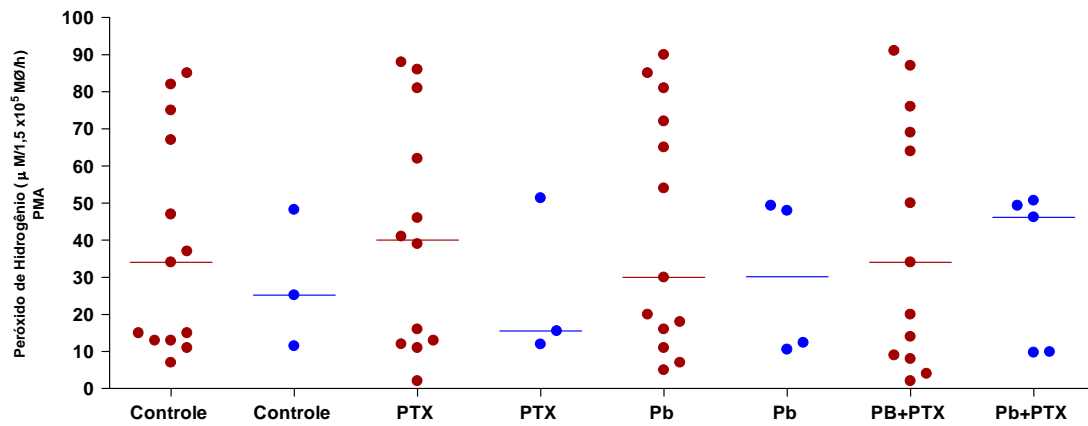


Figura 37. Análise comparativa da influência da pentoxifilina sobre a produção, *in vitro*, de peróxido de hidrogênio após estímulo com PMA nos modelos susceptíveis (CBA – ●) ou não (Balb/C - ●) à malária cerebral. Não houve diferença estatística entre os grupos. O estudo foi realizado nos seguintes grupos: camundongos não infectados, tratados (PTX) ou não (Controle) com pentoxifilina e infectados com *P. berghei* ANKA, tratados (Pb+PTX) ou não (Pb) com pentoxifilina. $p=0,991$, Kruskal-Wallis

4.9 Produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais dos camundongos CBA susceptíveis e Balb/C não susceptíveis à malária cerebral na infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA

A influência da pentoxifilina sobre a produção de óxido nítrico foi avaliada, *in vitro*, utilizando a técnica de Griess, no oitavo dia de infecção, no sobrenadante das culturas de macrófagos peritoneais dos modelos Balb/C não susceptíveis e CBA susceptíveis à malária cerebral, sem ou após estímulo com lipopolissacarídeo e/ou interferon- γ .

No modelo não susceptível à malária cerebral (Balb/C) não foi possível detectar, entre os grupos estudados, diferença estatisticamente significativa na produção basal ou estimulada de óxido nítrico nos sobrenadantes das culturas dos macrófagos ($p > 0,05$, Kruskal-Wallis; **figura 38**). Entretanto, nos camundongos susceptíveis à malária cerebral (CBA), a pentoxifilina promoveu um aumento significativo na produção basal de óxido nítrico nos animais infectados em relação aos demais grupos, sendo as medianas de 303 para o grupo controle; de 300 para o grupo PTX; de 332 para o grupo Pb e 603 no grupo Pb+PTX ($p = 0,006$, Kruskal-Wallis; **figura 39A**). O mesmo não foi observado quando a produção do óxido nítrico foi testada após estímulos ($p > 0,05$, Kruskal-Wallis; **figuras 39B, C e D**).

Quando comparados os dois modelos entre si, observamos que os animais infectados tratados com pentoxifilina do modelo CBA produzem 2,2 vezes mais óxido nítrico do que aqueles do modelo Balb/C, sendo as medianas de 603 e 282 μM , respectivamente ($p = 0,041$, Kruskal-Wallis; **figura 40D**). Não houve diferença estatística entre os outros grupos ($p > 0,05$, Kruskal-Wallis; **figuras 40A, B e C**).

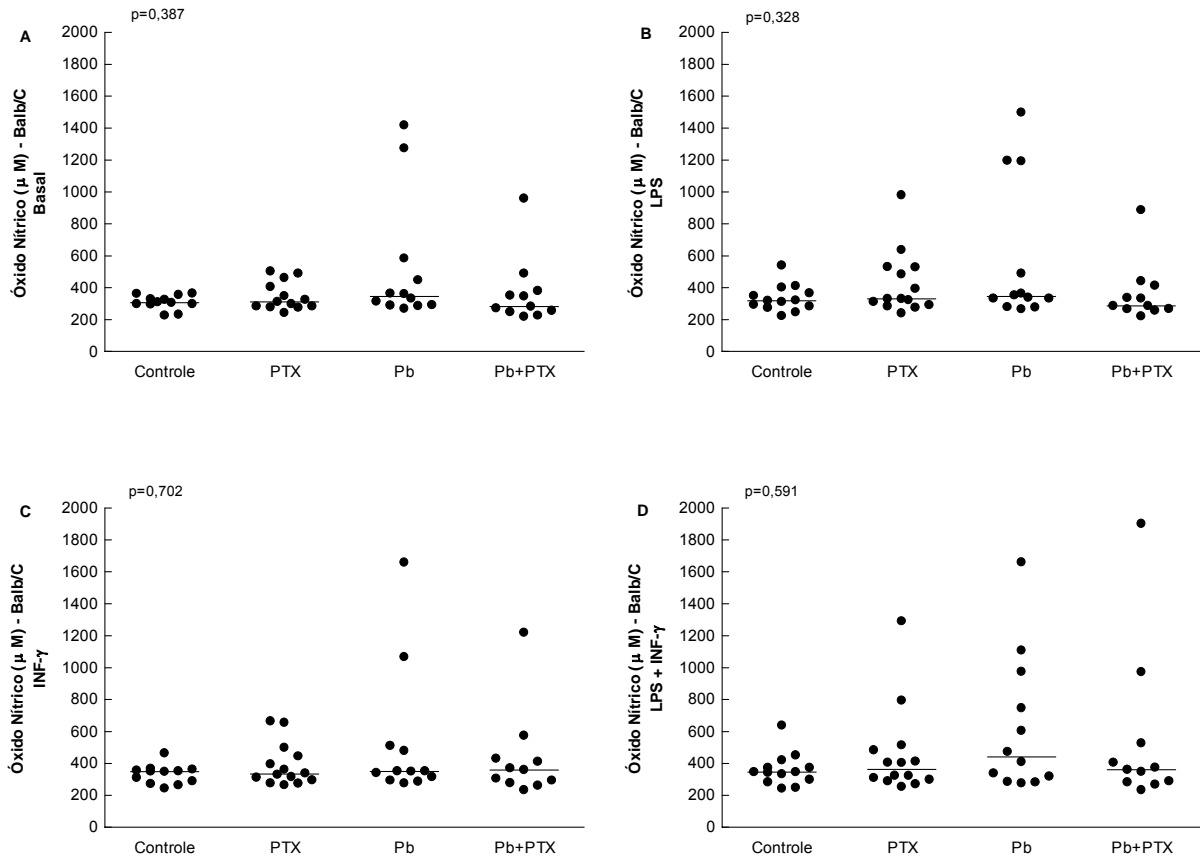


Figura 38. Influência da pentoxifilina sobre a produção de óxido nítrico basal ou estimulada com LPS e/ou $\text{INF-}\gamma$, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C, infectados ou não com *P. berghei* ANKA, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com NaCl 0,9% (Controle) ou com pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com pentoxifilina (Pb+PTX). A) Produção basal; $p=0,387$. B) Produção após estímulo com lipopolissacarídeo (LPS); $p=0,328$. C) Produção após estímulo com interferon gama ($\text{INF-}\gamma$); $p=0,702$. D) Produção após estímulo com LPS e $\text{INF-}\gamma$; $p=0,591$. Kruskal-Wallis. Não houve diferença estatística entre os grupos na produção basal ou após estímulos.

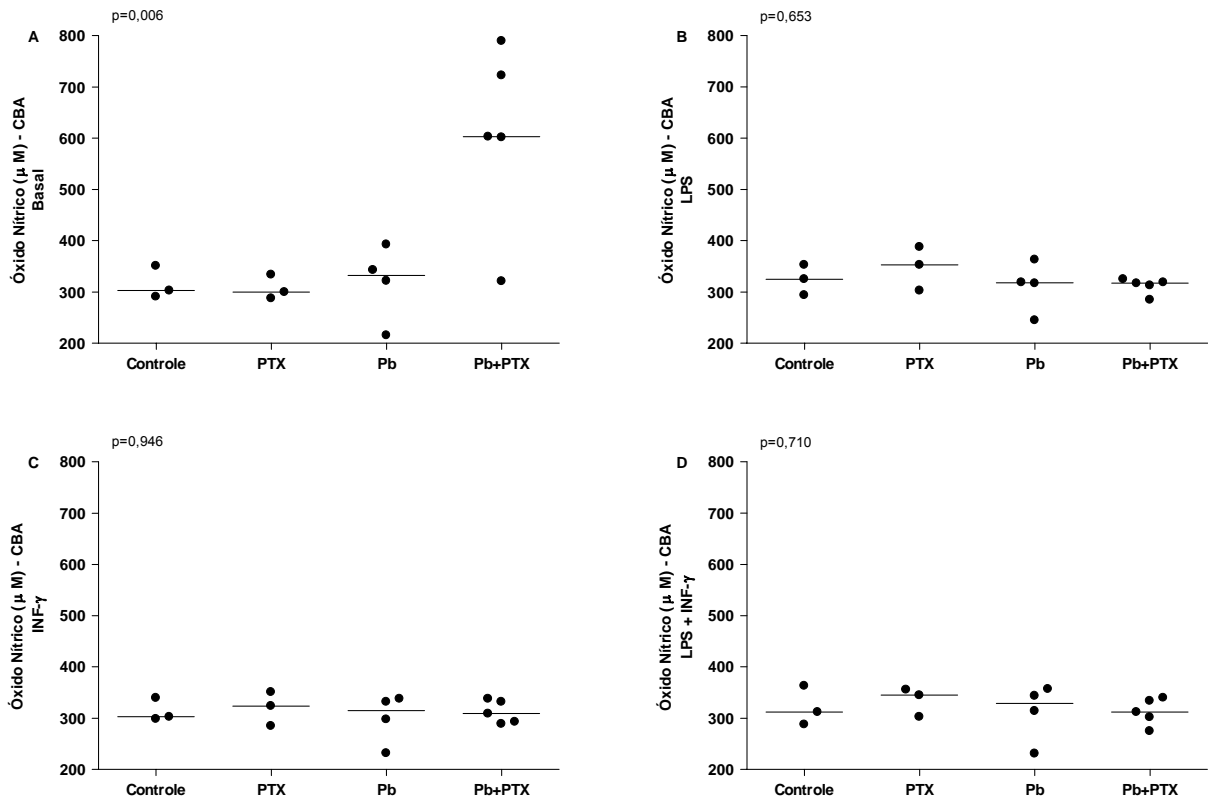


Figura 39. Influência da pentoxifilina sobre a produção de óxido nítrico basal ou estimulada com LPS e/ou $\text{INF-}\gamma$, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos CBA, infectados ou não com *P. berghei* ANKA, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com NaCl 0,9% (Controle) ou com pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com pentoxifilina (Pb+PTX). A) Os macrófagos dos animais do grupo Pb+PTX produziram significativamente mais óxido nítrico basal do que os macrófagos dos outros grupos de animais infectados tratados com pentoxifilina; $p=0,006$, Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos. B) Produção após estímulo com lipopolissacarídeo (LPS); $p=0,653$, Kruskal-Wallis. C) Produção após estímulo com interferon gama ($\text{INF-}\gamma$); $p=0,946$, Kruskal-Wallis. D) Produção após estímulo com LPS e $\text{INF-}\gamma$; $p=0,710$, Kruskal-Wallis.

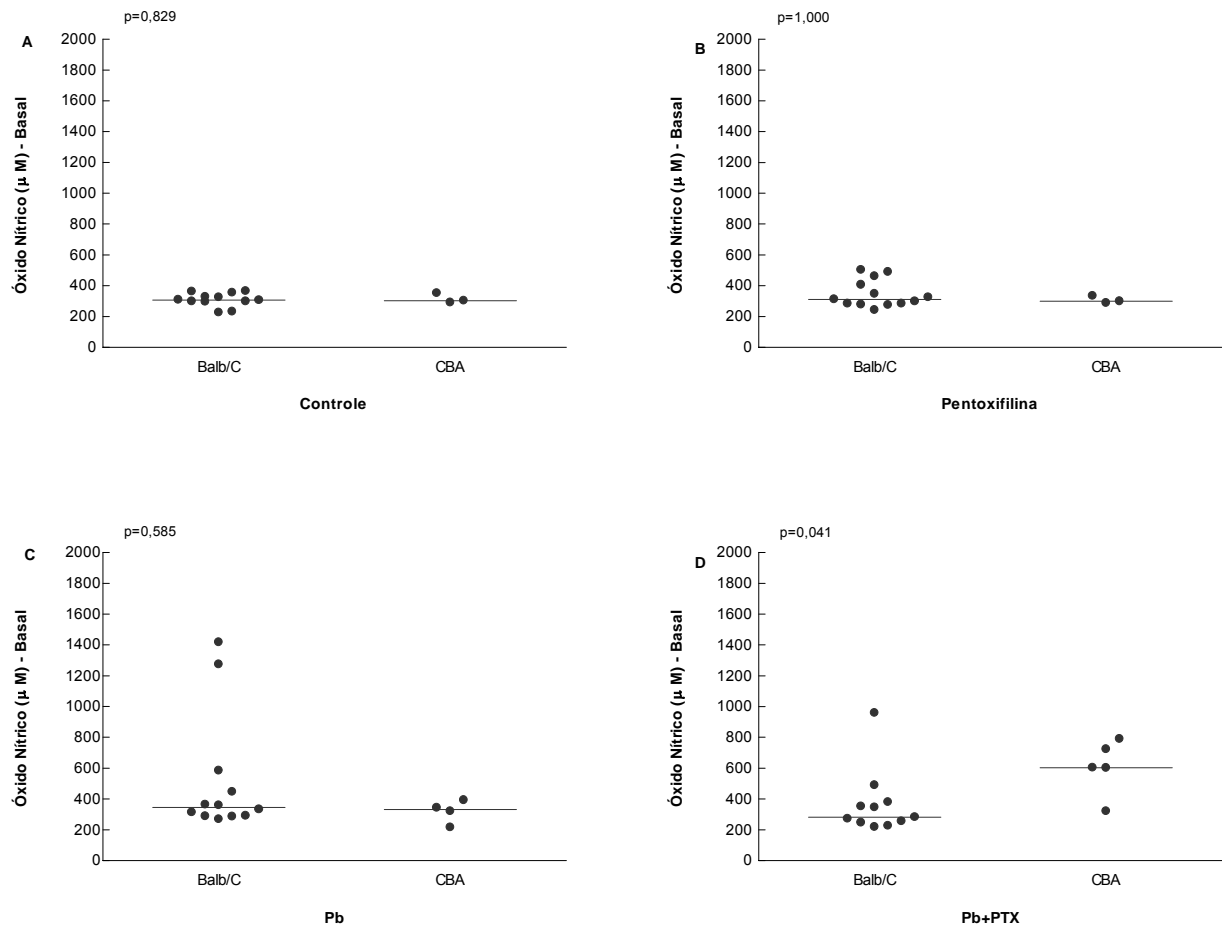


Figura 40. Análise comparativa da influência da pentoxifilina sobre a produção, *in vitro*, de óxido nítrico basal pelos macrófagos peritoneais nos modelos não susceptível (Balb/C) e susceptível (CBA) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com NaCl 0,9% (Controle) ou com pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com pentoxifilina (Pb+PTX). Os macrófagos dos camundongos CBA infectados e tratados com pentoxifilina produziram significativamente mais óxido nítrico do que os macrófagos dos animais não susceptíveis à malária cerebral (Balb/C). O teste de Mann-Whitney foi utilizado para a análise entre dois grupos.

4.10. Correlação entre o fator de necrose tumoral e o peso

O peso dos camundongos Balb/C infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA e tratados com 8mg/Kg/dia de pentoxifilina mostrou correlação inversa com os níveis de FNT após estímulo com LPS, no sobrenadante da cultura de macrófagos ($r_s = -0,929$, $p = 0,007$, Spearman). Não houve significância nas correlações entre os demais grupos (**Tabela 01**).

Tabela 01

Correlação entre peso e a produção de FNT nos camundongos susceptíveis (Balb/C) ou não (CBA) à malária cerebral, infectados com *Plasmodium berghei* ANKA

Cepa de Camundongo	Grupo	Parâmetro	r_s	p	Teste
Balb/C	Pb	FNT basal no sobrenadante x peso	0,571	0,151	Spearman
		FNT LPS no sobrenadante x peso	0,214	0,661	Spearman
		FNT no soro x peso	-0,216	0,429	Spearman
	Pb+PTX	FNT basal no sobrenadante x peso	-0,595	0,123	Spearman
		FNT LPS no sobrenadante x peso	-0,929	0,007	Spearman
		FNT no soro x peso	-0,454	0,191	Spearman
CBA	Pb	FNT basal no sobrenadante x peso	-0,827	0,172	Pearson
		FNT LPS no sobrenadante x peso	-0,887	0,112	Pearson
		FNT no soro x peso	-0,866	0,134	Pearson
	Pb+PTX	FNT basal no sobrenadante x peso	0,400	0,517	Spearman
		FNT LPS no sobrenadante x peso	0,100	0,95	Spearman
		FNT no soro x peso	-0,100	0,95	Spearman

Todos os resultados estão dispostos em tabelas no final desta dissertação no

Anexo de Tabela

DISCUSSÃO

A malária apresenta mecanismos imunopatológicos complexos e ainda pouco esclarecidos. Muito do conhecimento adquirido sobre a imunopatologia da malária é proveniente dos estudos utilizando diferentes tipos de animais, principalmente, várias linhagens de camundongos e também pela utilização de espécies e cepas diferentes de plasmódios. O modelo animal combinado com o tipo de plasmódio fornece ferramentas para o estudo dos diversos aspectos e formas da malária, pois, mimetizam alguns sintomas e respostas imunológicas do ser humano. Neste trabalho, foram utilizados dois modelos de camundongos, um da linhagem Balb/C e outro da linhagem CBA, ambos infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA, no intuito de avaliar o efeito da pentoxifilina sobre a resposta imunitária de animais que são resistentes à malária cerebral em comparação com aqueles que apresentam a forma grave cerebral da doença.

Os camundongos CBA são geneticamente susceptíveis à malária cerebral quando infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA e desenvolvem sintomas neurológicos semelhantes aos da malária cerebral humana, entre os quais, ataxia, paralisia dos membros em graus variados, convulsão e coma (Grau e cols, 1987; Neill & Hunt, 1992; Brain de Souza & Riley, 2002; Rae e cols, 2004). Estudos histopatológicos e de imagenologia funcional demonstram também a presença de alterações cerebrais estruturais, vasculares e metabólicas semelhantes às observadas em seres humanos com malária cerebral, que são provocadas principalmente pela presença de edema cerebral, hemorragia petequial, hipóxia, lesões parenquimatosas e disfunção vascular incluindo a quebra da barreira hemato-encefálica, redução do fluxo sanguíneo cerebral e perturbações graves da microvasculatura cerebral que levam a um quadro de isquemia cerebral (Neill & Hunt, 1992; Brown e cols, 1999; Medana e cols, 2000; Sanni e cols, 2001; Penet e cols, 2005). Todavia, existem algumas diferenças entre a malária cerebral do

modelo CBA e a de seres humanos, relacionadas principalmente com o tipo de seqüestro na microcirculação cerebral. Na malária cerebral humana ocorre predominantemente seqüestro de hemácias parasitadas com capacidade de agregar hemácias normais na microvasculatura, contudo, também é possível observar seqüestro de leucócitos, porém em menor quantidade. Ao contrário, no camundongo CBA, ocorre seqüestro principalmente de leucócitos e em menor quantidade de hemácias parasitadas (Grau e cols, 1987; Silamut e cols, 1999; Hearn e cols, 2000).

Camundongos Balb/C infectados pelo *P. berghei* ANKA são resistentes à malária cerebral, não apresentando manifestação neurológica nem seqüestro de hemácias parasitadas ou leucócitos na microvasculatura (Grau e cols, 1987), entretanto, apresentam anemia grave, devido ao aumento da destruição e queda na produção de hemácias. A destruição aumentada de hemácias é causada inicialmente pela maturação do esquizonte e utilização da hemoglobina pelo plasmódio e depois pelo reconhecimento imune pelo hospedeiro e pela remoção das hemácias parasitadas e não parasitadas no baço. Ademais, a produção de hemácias está comprometida na malária, principalmente devido à redução do número de precursores eritropoiético, à baixa responsividade à eritropoetina e à deseritropoese onde ocorre incorporação inadequada do ferro e maturação eritrocitária deficiente (Clark & Chaudhri, 1988; Miller e cols, 1989; Evans e cols, 2006).

Em regiões com alta densidade parasitária e vetorial, aproximadamente 2% dos indivíduos com malária apresentam a forma grave da doença e metade destas vão a óbito (Greenwood e cols, 1991). Dentre os indivíduos que apresentam as formas clínicas graves estão os primo-infectados. Porém, as maiores taxas de morbidade e mortalidade ocorrem em crianças abaixo de 5 anos que morrem freqüentemente de anemia grave ou com malária cerebral (Murphy & Brenan, 2001;

Reyburn e cols, 2005). Na malária cerebral e na anemia grave da malária, uma resposta imunitária apropriada é crítica e determinante da evolução da infecção malárica, tanto no modelo experimental quanto em humanos (Hunt & Grau, 2003; Chang & Stevenson, 2004; Wroczynska e cols, 2005). A resposta pró-inflamatória é benéfica no início da doença (Torre e cols, 2002), sendo responsável pela limitação da parasitemia e pela ativação das células efectoras do sistema imune (Muniz-Junqueira e cols, 2001; Krishnegowda e cols, 2004; Hernandez-Valladares, 2006), entretanto, é justamente a produção exacerbada de citocinas inflamatórias, principalmente o FNT, que causa o dano tecidual (Clark e cols, 1989; Grau & Lou, 1994). Conseqüentemente, no intuito de diminuir a morbi-mortalidade da doença, vários estudos avaliaram a associação de drogas anti-plasmodiais com drogas capazes de modular a resposta imunitária, como a talidomida, a pentoxifilina e drogas anti-FNT (Kwiatkowski e cols, 1993; Di Perri e cols, 1995; Muniz-Junqueira e cols, 2005; Das e cols, 2003; Muniz-Junqueira, 2006). No caso da pentoxifilina, vários estudos foram realizados utilizando modelos susceptíveis à malária cerebral (Kremsner e cols, 1991; Prada e cols, 1993), mas não tem sido estudada a utilização deste tratamento em camundongos resistentes à forma cerebral, como o Balb/C.

Neste trabalho, o tratamento dos animais infectados do modelo Balb/C e do modelo CBA foi realizado utilizando a pentoxifilina, sendo que o tratamento foi iniciado no terceiro dia da infecção para que se evitasse a inibição do efeito anti-parasitário do FNT sobre o *Plasmodium berghei* ANKA (Muniz-Junqueira e cols, 2001). Além disso, em estudos anteriores o tratamento com a pentoxifilina desde o primeiro dia de infecção promoveu uma mortalidade maior e alterações histopatológicas cerebrais e pulmonares mais graves no modelo CBA (Araújo e cols, 1995; Cunha e cols, 1996; Siqueira e cols, 1996). A dose de tratamento escolhida foi a de 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina, pois, pelas observações anteriores a pentoxifilina

em dose mais alta (40 mg/Kg/dia) produziu efeitos tóxicos enquanto a dose de 8 mg/Kg/dia apresentou melhores resultados, principalmente na parasitemia, capacidade fagocitária e produção do peróxido de hidrogênio (Paula Jr, 2003).

Com objetivo de verificar se a pentoxifilina influenciava de maneira geral a evolução da malária nos camundongos Balb/C e CBA, o peso, o hematócrito, a carga parasitária e a sobrevida, foram avaliados durante a infecção e o tratamento com pentoxifilina. Com o objetivo de avaliar se a pentoxifilina poderia influenciar a sobrevida destes animais, utilizamos duas doses de tratamento durante a curva de mortalidade. Nossos dados mostraram que o tratamento dos animais Balb/C infectados com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina aumentou em um dia o início da morte e em três dias a sobrevida dos animais, contudo na dose de 16 mg/Kg/dia, o tratamento causou a morte precoce dos animais, sugerindo um efeito tóxico nesta concentração. Quando utilizada na dose 8 mg/Kg/dia no camundongo Balb/C, a pentoxifilina também foi capaz de retardar a elevação da parasitemia até o décimo dia de infecção. Possivelmente, esta ação ocorreu de modo indireto pelo aumento dos mecanismos de defesa anti-parasitários, já que a pentoxifilina não tem ação anti-parasitária direta, nesta dose pelo menos *in vitro* (Santos-Neto e cols, 1992).

Os camundongos Balb/C não tratados começaram a morrer por volta do décimo segundo dia com a parasitemia de 52,4%, com hematócrito de 12,2%, com sinais de comprometimento geral como eriçamento de pêlo, dispnéia e apatia e sinais clínicos de anemia, como palidez de mucosas; enquanto que com os camundongos CBA ocorreu o oposto, os animais começaram a morrer a partir do sétimo dia com a parasitemia de 7,3%, o hematócrito de 43%, sinais de comprometimento geral como eriçamento de pêlo e apatia e sintomas neurológicos como ataxia, movimentos em círculo, paralisia, convulsão e coma. Nos animais CBA, o tratamento com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina, a partir do terceiro dia de

infecção, não alterou a parasitemia nem influenciou o tempo de início da morte, porém, aumentou em treze dias a sobrevivência dos animais infectados tratados. Kremsner e cols (1991), apesar de utilizarem uma dose mais alta da pentoxifilina (1mg/kg) também observaram aumento da sobrevivência em camundongos CBA infectados com *P. berghei* ANKA. No nosso estudo, os camundongos CBA que morreram tardiamente não apresentaram sintomas neurológicos; por outro lado, 23% destes animais apresentaram anemia com hematócrito de 21,3%, parasitemia de 41,2% e sintomas como dispnéia, apatia, palidez de mucosas e eriçamento do pêlo. Nossos resultados foram semelhantes aos de Carvalho e cols (2000) e Grau e cols (1989), que também observaram que 10% a 20% dos camundongos CBA morrem com outras complicações como anemia grave e hiperparasitemia, tendo sido sugerido como causa provável da evolução diferenciada uma expressão diferente de moléculas de adesão na microvasculatura dos vasos.

Os animais tanto do modelo Balb/C quanto do modelo CBA possuíam entre 10 e 12 semanas de vida, não existindo diferença na média de peso no dia da infecção entre os dois modelos, entretanto, ao longo da infecção pelo *P. berghei* ANKA, os camundongos dos dois modelos perderam peso progressivamente. Entretanto, os camundongos Balb/C perderam mais peso no sétimo dia da infecção do que os camundongos CBA. A comparação entre a perda de peso nos dois grupos foi realizada no sétimo dia de infecção porque a maioria dos animais infectados não tratados do modelo CBA morre neste dia. Diferentemente, Pierrot e cols (2003) não conseguiram detectar diferença na evolução do peso estudando camundongos Balb/C e camundongos C57BL/6, susceptíveis à malária cerebral, na vigência da infecção malárica pelo *P. berghei* ANKA, porém neste estudo a idade dos animais era maior (16 semanas).

Quando tratamos os camundongos Balb/C infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA com pentoxifilina, a partir do terceiro dia de infecção, observamos que houve uma perda de peso menor do sexto até o décimo primeiro dia de infecção, em relação ao grupo infectado e não tratado. Por outro lado, nos camundongos CBA, o tratamento com o mesmo esquema posológico não influenciou na perda de peso. É provável que esse efeito da pentoxifilina, produzindo menor perda de peso nos camundongos Balb/C, tenha ocorrido pela sua influência na produção de citocinas tais como o FNT e a interleucina 12 (Tracey, 2002). Doenças letais, tanto agudas quanto crônicas, estão associadas com depleção de peso causada pelo desequilíbrio metabólico que leva a uma grande perda das reservas protéicas e energéticas. Na malária, a caquexia é resultante da ação de vários mediadores entre eles citocinas como FNT, interleucina 1, interleucina 6 e interleucina 12. Yoshimoto e cols (1998) observaram que o tratamento com anticorpo anti-interleucina 12 diminuiu a perda de peso corporal em camundongos B57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei* NK65. Em camundongos, o tratamento prolongado com FNT promove perda de peso, anemia, anorexia e perdas protéicas e lipídicas e em vários pacientes com câncer, a presença do FNT está associada à caquexia (Tracey, 2002). De fato, nossos dados mostraram uma relação inversa entre o FNT produzido pelos macrófagos peritoneais e o peso, nos animais Balb/C infectados e tratados com pentoxifilina. O mesmo não ocorreu para os camundongos infectados não tratados do mesmo modelo ou para os camundongos do modelo CBA.

Nosso estudo procurou avaliar a influência da pentoxifilina sobre o hematócrito dos camundongos Balb/C e CBA com o objetivo de verificar a interferência desta droga na progressão da anemia. A infecção malárica *per si* diminuiu os hematócritos nos animais Balb/C e CBA e o tratamento com pentoxifilina não alterou significativamente a evolução da anemia. Entretanto, a diminuição do

hematócrito ocorreu mais precocemente nos camundongos CBA, enquanto que nos camundongos Balb/C, a anemia apareceu mais tardiamente, porém foi mais acentuada. Interessantemente, observamos também que nos distendidos sanguíneos dos camundongos Balb/C havia um número aumentado de eritroblastos infectados pelo plasmódio e reticulocitose, o que não foi observado nas lâminas dos camundongos CBA. É provável que esse fato tenha ocorrido pela estimulação de células pluripotentes hematopoiéticas pelo *Plasmodium berghei* que circula em grande quantidade pela medula, pois esta espécie tem propensão para parasitar hemácias imaturas (Silverman e cols, 1987). A anemia nos camundongos Balb/C infectados com *Plasmodium berghei* ANKA se acentuou por volta do oitavo dia da infecção sendo semelhante à de Roth & Herman (1979), que também descreveram que o camundongo Balb/C apresenta anemia progressiva iniciando em torno do sétimo dia da infecção com posterior reticulocitose. Em outro estudo realizado com várias linhagens de camundongos infectadas com *P. chabaudi*, observou-se que o camundongo CBA é mais resistente à anemia e que essa aparece em torno do quarto dia de infecção estabilizando-se nos dias posteriores (Stevenson e cols, 1982). Ressalta-se que a anemia apresentada pelo camundongo Balb/C não resulta somente da hemólise causada pelo processo de maturação do esquizonte e liberação dos merozoítas, mas também pela exaustão da medula hematopoiética e das reservas de ferro, e também pela presença de citocinas inflamatória, como o FNT que promove o declínio da produção de eritropoetina. De fato, o FNT diminui a produção da eritropoetina indiretamente por inibir a produção de IL-10, além de estimular a eritrofagocitose pelos macrófagos (Roth & Herman, 1979; Miller e cols, 1989; Chang & Stevenson, 2004).

Tem sido demonstrado um papel importante do macrófago na defesa contra o plasmódio, principalmente, no estágio sanguíneo da infecção malárica. O macrófago

é capaz de estimular tanto a resposta inata quanto a resposta imune adquirida por meio da produção de citocinas como a interleucina 18, FNT, interferon- γ , ou pela produção de moléculas capazes de destruir o parasita como óxido nítrico e peróxido de hidrogênio ou ainda pelo próprio mecanismo de fagocitose. (Baratin, 2005; Muniz-Junqueira e cols, 2006; Urban & Stevenson, 2005; Zhu e cols, 2005).

O processo de fagocitose é muito complexo e envolve uma diversidade de receptores, contudo, esse mecanismo inicia pela interação de receptores específicos na superfície do fagócito com os ligantes na superfície do patógeno (Allen & Aderen, 1996), isso leva a uma polimerização da actina no local com conseqüente internalização e desencadeamento de sinalização intracelular acompanhada de tráfico de moléculas pela membrana, ativação de mecanismos microbicidas, rearranjo do citoesqueleto, formação do fagolisossoma, ativação de mecanismos microbicidas, produção de citocinas e quimiocinas e produção de moléculas para o processo de apresentação do antígeno (Berón e cols, 1995; Underhill & Ozinsky, 2002).

Devido ao grande número de microorganismos existentes e a capacidade destes de sofrerem mutação, o complexo mecanismo de fagocitose requer vários receptores especializados no reconhecimento, que se distribuem tanto na superfície das células fagocíticas mononucleares quanto internamente no citoplasma destas células. Esses receptores reconhecem regiões conservadas nos patógenos, não existentes nas células eucarióticas superiores e são chamados de receptores de reconhecimento para padrões de patógenos (RRPP), tais como o receptor para manose (RM), receptor para lecitina, receptor para integrinas (CD11b/CD18), receptores de limpeza que reconhecem lipopolissacarídeo, receptores TOLL, entre outros. Por outro lado, tanto a ativação do sistema do complemento quanto a resposta adaptativa do sistema imune induzindo a produção de anticorpos

ocasionam a presença de componentes humorais que opsonizam o patógeno e facilitam a fagocitose por meio de receptores presentes na superfície dos fagócitos (Aderem & Underhill, 1999; Linehan e cols, 2000; Thomas e cols, 2000; Peiser & Gordon, 2001; Stuart & Ezekowitz, 2005).

Quando testamos a fagocitose na presença de soro fetal bovino, procuramos avaliar a ingestão de partículas por meio de receptores de reconhecimento de padrões. Embora sem significância estatística, a pentoxifilina causou uma discreta diminuição na capacidade fagocitária dos macrófagos no modelo CBA devido à diminuição de macrófagos envolvidos na fagocitose. Esse dado coincide com os resultados de Paula Jr (2003) que também observou uma modulação negativa da capacidade fagocitária de camundongos CBA devido ao menor envolvimento dos macrófagos na fagocitose e ao menor número de leveduras/aderidas por macrófagos. Provavelmente, nossos dados não tenham mostrado diferença estatística devido ao pequeno número de camundongos CBA na amostra estudada.

Quando comparamos os dois modelos murinos, observamos que a capacidade de fagocitar pelos receptores para padrões moleculares (PAMPs) é menor nos camundongos CBA tratados com pentoxifilina, do que nos camundongos Balb/C, devido à menor quantidade de macrófagos envolvidos na fagocitose. Entre as hipóteses para explicar a desigualdade na capacidade fagocitária entre os dois modelos, encontra-se o fato de que os PAMPs são expressos de maneira diferente nas populações de macrófagos nos diferentes tecidos e em resposta aos diversos microorganismos em diferentes modelos experimentais (Loose, 1984). Contudo, na malária, a fagocitose por meio de PAMPs ainda é alvo de estudo, mas sabe-se que a molécula glicofosfatidilinositol, presente na membrana dos plasmódios é reconhecida pela família de receptores TOLL e tem sido observado que ocorre uma expressão diferenciada destes receptores em diferentes cepas de camundongos.

Nos camundongos Balb/C, a ativação do macrófago pelos antígenos plasmodiais parece ocorrer por meio dos receptores TOLL 2, enquanto camundongos C57BL/6, que também são susceptíveis a malária cerebral, respondem por mecanismos mediados pelo TOLL 9. A ativação dos fagócitos por este último receptor estimula a produção de citocinas inflamatórias (Nebl, 2005). Não tem sido demonstrado o envolvimento de receptores TOLL na fagocitose pelos macrófagos no modelo CBA, contudo, é possível que assim como os camundongos C57BL/6, os macrófagos dos camundongos do modelo CBA realizem a fagocitose por um tipo específico de receptor TOLL.

Nossos estudos mostraram que o camundongo Balb/C tratado com pentoxifilina tem maior capacidade de fagocitar por meio de PAMPs do que o camundongo CBA submetido ao mesmo tratamento devido ao maior envolvimento de macrófagos na fagocitose, sem, contudo aumentar a capacidade de ingerir leveduras. Provavelmente, a pentoxifilina produziu efeitos contrários nos dois modelos estudados, pois sabe-se que esta droga pode interferir na expressão de receptores para padrões moleculares, como os receptores para β -glucana e receptores TOLL 4 (Coimbra e cols, 2004; Vassalo e cols, 2005). Ademais, o menor envolvimento de macrófagos na fagocitose nos camundongos CBA pode ter ocorrido pela diferença na expressão de moléculas quimiotáticas, pois tem sido observado que ocorre expressão diferenciada de RANTES nas membranas celulares dos macrófagos em cepas diferentes de camundongos (Hanum e cols, 2003). Esses autores demonstram que nos camundongos C57BL/6, a expressão de RANTES é maior que nos camundongos Balb/C e Sadakane e cols (2002) demonstraram que o camundongo CBA/JN e o C57BL/6N expressam quantidades diferentes de RANTES nas doenças alérgicas respiratórias, sendo que a pentoxifilina é capaz de diminuir a expressão não só desta molécula, mas também de outras quimiocinas como a MCP-

1, MIP α e β em monócitos (Krakauer, 1999; Hanum e cols, 2003; Chen e cols, 2004).

A fagocitose na presença de soro fresco de camundongo avaliou a ingestão de leveduras por meio dos receptores para as moléculas do sistema complemento ou receptores para a fração Fc das imunoglobulinas, presentes na superfície dos macrófagos. O soro fresco de camundongo possui proteínas do sistema complemento e imunoglobulinas que se adsorvem na superfície das leveduras facilitando a fagocitose pelo macrófago (Brandi, 1993). Nossos dados demonstram que, no camundongo Balb/C, quando uma menor quantidade de leveduras foi utilizada na fagocitose, a pentoxifilina foi capaz de aumentar biologicamente o índice fagocitário por promover um maior envolvimento dos macrófagos na fagocitose, sem contudo, alterar a quantidade de leveduras ingeridas/aderidas.

Estudos demonstram que o estresse oxidativo está elevado em pacientes com malária (Pabón e cols, 2003), principalmente nas formas graves da doença (Das e cols, 1993). O peróxido de hidrogênio e o óxido nítrico fazem parte dos mecanismos antiparasitários e são produzidos em resposta à infecção malárica, podendo ser parasiticidas para os plasmódios *in vitro* (Wozencraft e cols, 1984) e *in vivo* (Dockrell & Playfair, 1983). Paula Jr (2003) também demonstrou que ocorre aumento de peróxido de hidrogênio em culturas de macrófagos estimulados com PMA de camundongos CBA infectados com *P. berghei* ANKA e que o tratamento dos animais com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina modulou negativamente a produção de H₂O₂. Contudo, nossos resultados não mostraram aumento de produção de H₂O₂ nos camundongos CBA e Balb/C infectados com *P. berghei* ANKA em relação aos camundongos normais, mesmo após estímulo com PMA e nem o tratamento com pentoxifilina alterou esta produção. É provável que a quantidade pequena de camundongos CBA utilizados no nosso estudo tenha interferido nos nossos

resultados e que não ocorra aumento da produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos dos camundongos Balb/C na infecção malárica pelo *Plasmodium berghei* ANKA, pelo menos no oitavo dia da infecção, o que pode estar determinando que estes animais não apresentem a forma cerebral da doença.

Sugere-se que a produção de H_2O_2 é cíclica e dependente da cepa do plasmódio, do tipo de macrófago envolvido, do modelo de camundongo e há quanto tempo ocorreu a infecção. De fato, Brinkmann e cols (1984), observaram que a capacidade de produzir H_2O_2 é maior no camundongo C57BL/6 infectado pelo *P. yoelli* do que na infecção pelo *P. berghei* ANKA. Ademais, a infecção por estas cepas, no modelo C57BL/6, estimula a produção de H_2O_2 somente nos primeiros dias de infecção diminuindo progressivamente a partir do quinto dia até atingir os mesmos valores dos animais normais no oitavo dia. Já a infecção pelo *P. chabaudi* AS em camundongos A/J não alterou a produção de H_2O_2 e nos camundongos C57BL/6 estimulou uma grande produção de H_2O_2 no sétimo dia de infecção diminuindo para valores normais no décimo dia (Stevenson e cols, 1992). Nos camundongos Balb/C infectados pelo *Plasmodium yoelli*, a capacidade de produzir H_2O_2 após o terceiro dia de infecção é maior nos macrófagos peritoneais do que nos macrófagos esplênicos e nos camundongos B10/D2/n infectados pela mesma cepa de plasmódio, a produção é baixa no mesmo período (Wozencraft e cols, 1985).

Nossos resultados mostraram, embora sem significância estatística, que a produção de H_2O_2 foi diferente segundo o modelo de camundongo utilizado, sendo ligeiramente maior nos camundongos Balb/C do que nos camundongos CBA. Essa diferença na produção de H_2O_2 pode ser um dos fatores que determina apresentações clínicas diferentes por influenciar na imunopatogenia dos dois modelos, já que estudos relatam que o peróxido de hidrogênio pode causar hemólise contribuindo assim para a anemia no camundongo Balb/C (Clark & Hunt,

1993; Mohan e cols, 1995) e para a forma cerebral no camundongo CBA (Paula Jr, 2003).

O óxido nítrico parece desempenhar um papel fundamental na patogênese da malária (Clark e cols, 2003) estando elevado principalmente em pacientes em coma (Al Yaman e cols, 1996); entretanto, seu mecanismo de ação na doença ainda é controverso (Sobolewski e cols, 2005). No modelo experimental Balb/C e no modelo CBA que utilizamos, a infecção pelo *P. berghei* ANKA não foi capaz de alterar a produção de óxido nítrico nas culturas de macrófagos peritoneais no oitavo dia de infecção, mesmo após o acréscimo de lipopolissacarídeos e/ou interferon- γ às culturas, contudo a pentoxifilina estimulou a produção basal de NO nos camundongos CBA infectados.

Em seu estudo com o modelo CBA infectado pelo *P. berghei* ANKA, Paula Jr (2003) não observou aumento de NO basal ou após estímulo com LPS no sobrenadante das culturas de macrófagos no oitavo dia de infecção. Por outro lado, os macrófagos de camundongos infectados pelo *P. vinckei* foram capazes de produzir grande quantidade de NO quando estimulados com INF- γ *in vitro* (Kremsner e cols, 1993). Esses resultados controversos podem dever-se ao fato de que a produção de NO, assim como o H₂O₂, é dependente do tecido onde está sendo produzido, do dia de infecção, da parasitemia e da cepa do plasmódio utilizada. Isto é sugerido pelos estudos que mostraram não ocorrer aumento sérico, nem urinário de NO em infecções causadas por cepas de *Plasmodium berghei* (ANKA, NK65, N/13/1A/4/203) em diferentes modelos de camundongos (Swiss, CBA/J, Balb/C, C57BL/6) ou no modelo CBA/J infectado pelo *P. chabaudi*. Ao contrário do camundongo C57BL/6 infectado pelo *P. chabaudi chabaudi*, no qual ocorrem níveis aumentados de NO no plasma (Nahrevanian & Dascombe, 2001). Além disso, a produção de NO parece ser local, ocorrendo no cérebro de camundongos Swiss e

no baço, no fígado e no cérebro de camundongos C57BL/6, nas infecções pelo *P. berghei*; já na infecção pelo *P. chabaudi chabaudi* a produção aumentada deste radical ocorre no baço do camundongo C57BL/6. Acrescenta-se ainda que o *P. berghei* é capaz de estimular a produção de NO somente nas fases intermediárias e tardias da infecção no camundongo C57BL/6, quando a parasitemia já se encontra elevada; enquanto, que nas infecções por *P. chabaudi chabaudi*, a produção de NO é observada logo no início da infecção, quando a parasitemia está baixa (Asensio e cols, 1993; Buguet e cols, 1999; Nahrevanian & Dascombe, 2001).

Em seres humanos, os achados de hipoargeninemia e concentrações baixas de nitratos e nitritos no plasma em pacientes com malária grave sugerem que a produção de NO deve ser baixa durante a infecção (Lopansri e cols, 2003). Contudo, este dado ainda é controverso, haja vista que Keller e cols (2004) observaram produção aumentada de NO *in vitro* e *in vivo* em crianças infectadas com *Plasmodium falciparum* apresentando anemia grave.

Segundo Stevenson e cols (1995) e Jacobs e cols (1996), a produção de óxido nítrico na fase eritrocitária da infecção malárica pode ser regulada tanto pelo IFN- γ quanto pelo FNT e é possível que as diferenças observadas possam ser explicadas pela ativação de vias diferentes em cada modelo experimental. Nos nossos experimentos, não está esclarecido porque o acréscimo de interferon gama às culturas não estimulou a produção de NO, mesmo após a adição de um segundo estímulo como o LPS. Uma possível explicação seria que a produção do NO estaria relacionada com o estado de ativação destas células no momento em que foram estudadas, causado pela própria infecção malárica e talvez os dois estímulos juntos ou separados tenham causado uma depressão da resposta dos macrófagos, *in vitro*. Por outro lado, é possível que nos modelos de animais que utilizamos, a produção de NO não ocorra via estímulo com interferon- γ , porém, em resposta ao estímulo

com FNT dependente da via do iNOS. O iNOS é expresso pelos macrófagos nos diferentes modelos murinos e por diferentes tipos celulares (Nahrevanian & Dascombe, 2002) e alguns estudos relatam que a presença de polimorfismos nos genes que codificam a enzima óxido nítrico sintase induzível pode contribuir para a produção diferenciada de óxido nítrico colaborando assim para diferentes evoluções clínicas na malária (Al Yaman e cols, 1996; Boutlis e cols, 2003).

Embora nossos estudos não tenham revelado aumento de óxido nítrico na infecção pelo *P. berghei* ANKA nos dois modelos estudados, observamos que a pentoxifilina promoveu um aumento basal significativo de NO no sobrenadante das culturas de macrófagos dos camundongos CBA mas não no modelo Balb/C. Kremsner e cols (1993) trabalhando com o *Plasmodium vinckei*, demonstraram que macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C também não produzem óxido nítrico. Contudo, poucos estudos procuraram analisar o efeito da pentoxifilina sobre a produção de óxido nítrico e provavelmente nosso resultado tenha ocorrido por mecanismos ainda pouco esclarecidos, provavelmente pela aumento de iNOS estimulado pela via de ativação do NF- κ B dependente de cAMP e independente do estímulo de FNT (Trajkovic, 2001).

Provavelmente a produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio durante a infecção malárica pelo *Plasmodium berghei* ANKA nos camundongos CBA e Balb/C no oitavo dia de infecção possam refletir a diferença na produção de citocinas. As citocinas desempenham um papel determinante na evolução das formas clínicas da malária, tanto em humanos quanto em camundongos (Kossodo & Grau, 1993; Jason e cols, 2001; Musumeci e cols, 2003; Hunt & Grau, 2003). Entre elas, sugere-se que o fator de necrose tumoral seja um dos principais mediadores das duas causas mais freqüentes de óbito associadas às formas graves da malária: a anemia e a malária cerebral. Contudo, seu papel na malária ainda é controverso

sendo dependente da sua concentração, do tempo em que fica bioativo, do tecido onde é produzido e da presença de citocinas reguladoras como o TGF- β (Jacobs e cols, 1996; Gimenez, 2003).

Tem sido sugerido que a pentoxifilina é capaz de diminuir a produção de fator de necrose tumoral pelos macrófagos. Neste trabalho avaliamos a influência da pentoxifilina sobre produção desta citocina em cultura de macrófagos peritoneais e no soro dos camundongos infectados com *P. berghei* ANKA. Observamos que na dose de 8 mg/Kg/dia a pentoxifilina não alterou a produção de fator de necrose tumoral no sobrenadante das culturas de macrófagos peritoneais dos camundongos Balb/C e CBA, no oitavo dia de infecção. Nossos resultados diferem das observações de Kremsner e cols (1991), que verificaram que o tratamento com 1mg/dia de pentoxifilina promoveu uma inibição da expressão de mRNA do FNT nos macrófagos peritoneais de camundongos CBA infectados com *P. berghei* ANKA. Esta diferença pode ter sido devida ao fato de que a dose de pentoxifilina usada por estes autores, que correspondeu a 40 mg/kg/dia, foi 5 vezes maior do que a dose que utilizamos em nosso trabalho. De fato, como tem sido demonstrado que os efeitos da pentoxifilina são dose-dependentes; adultos com malária grave causada pelo *P. falciparum* que receberam 40 mg/Kg/dia tiveram os níveis séricos de FNT diminuídos em relação aos pacientes que receberam 20 mg/kg/dia. Entretanto, optamos em nosso trabalho por utilizar a dose mais baixa da pentoxifilina, pois tem sido observado que esta droga pode ter efeitos tóxicos quando utilizada em concentrações mais elevadas (Paula Jr, 2003), dificultando sua utilização clínica, o que já tem sido demonstrado, pois o tratamento de pacientes com malária com 20mg/kg/dia de PTX associado com cloroquina teve que ser suspenso pelos efeitos colaterais causados por esta droga (Hemmer e cols, 1997).

Ademais, utilizamos a via intramuscular e iniciamos o tratamento no terceiro dia de infecção, enquanto Kremsner e cols (1991) utilizaram a via intraperitoneal com o tratamento iniciando no primeiro dia. Optamos por utilizar a via intramuscular, pois se a droga fosse administrada intraperitonealmente, diariamente, até o dia dos experimentos, não poderíamos excluir a influência sobre os parâmetros que analisamos da ativação dos macrófagos pela irritação da cavidade peritoneal, independentemente da ação da droga *per si*. O tratamento com a PTX foi iniciado mais tardiamente pelo fato do FNT participar da defesa antiparasitária (Muniz-Junqueira e cols, 2001, Paula Jr, 2003).

Tem sido observado que o FNT está envolvido nos mecanismos imunopatológico da malária, estando em níveis elevados nas formas graves, principalmente na forma cerebral, tanto em camundongos (Lou e cols, 2001; Engwerda e cols, 2005) quanto em humanos (Clark & Cowden, 2003), contudo não observamos aumento do FNT no sobrenadante das culturas de macrófagos peritoneais nos camundongos Balb/C ou CBA no oitavo dia de infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA. É possível que neste dia, a produção de citocinas anti-inflamatórias tenha contribuído para diminuir a produção de FNT pelos macrófagos. De fato, tem sido observado que a evolução da malária murina é influenciada pela presença de TGF- β que inibe a resposta inflamatória diminuindo a produção do FNT (Omer e cols, 2003, Musumeci e cols, 2003). Entretanto, comparando-se os modelos Balb/C e CBA, observamos uma produção maior de FNT pelos macrófagos peritoneais da cepa de camundongo resistente do que da cepa susceptível à malária cerebral pelo *Plasmodium berghei* ANKA. Kossodo & Grau (1993) relataram que os macrófagos de camundongos CBA infectados com *P. berghei* ANKA não aumentam a produção de FNT em cultura em relação aos animais normais e Hanum e cols (2003) sugerem que a produção de FNT é maior em cepas de camundongos

resistentes à malária cerebral pelo *P. berghei* ANKA do que em cepas susceptíveis. Essa produção diferenciada entre os dois modelos deve ser um fator determinante para a evolução da doença. Provavelmente, o FNT no modelo Balb/C contribua para uma maior sobrevivência dos animais por retardar o aumento da parasitemia, por outro lado, promove uma anemia maior por diminuir indiretamente a produção da eritropoetina e estimular a eritrofagocitose (Clark & Chaudhri, 1988; Miller e cols, 1989; Nussenblatt e cols, 2001). Ao contrário, no modelo CBA, embora o FNT encontre-se em níveis mais baixos, esta citocina deve estimular o seqüestro de leucócitos por aumentar a expressão de moléculas de aderência no endotélio vascular, estimulando a liberação de moléculas neurotóxicas locais, como o NO e H₂O₂, que contribuem para o estabelecimento da forma cerebral da malária (Lou e cols, 1998; Hanum e cols, 2003; Hunt & Grau, 2003; Golenser, 2006).

No nosso estudo, a quantidade de FNT no sobrenadante das culturas de macrófagos peritoneais dos camundongos CBA tratados com pentoxifilina foi menor do que nos camundongos Balb/C, no oitavo dia de infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA. É plausível que a influência da pentoxifilina sobre a produção de FNT pelos macrófagos peritoneais esteja relacionada com as características genéticas de cada cepa de camundongo, além disso, a própria ativação dos macrófagos é dependente do FNT e está condicionada à presença dos receptores para o FNT na superfície das células (Lou e cols, 1998). Existem dois receptores para o FNT (R1FNT e R2FNT), sendo que o receptor 1 (p55) ocasiona citotoxicidade e o receptor 2 (p75) estimula a proliferação celular e a inflamação por ativar a via de sinalização do NF-κB que transcreve a produção de moléculas de aderência, quimiocinas, fatores co-estimulatórios e FNT entre outros. A presença destes receptores na superfície das células depende do tipo celular e do estado de ativação da célula. Alguns estudos demonstraram que nas células endoteliais da

microvasculatura do cérebro de camundongos CBA ocorre maior expressão de R2FNT do que R1FNT e provavelmente este fato promova uma maior responsividade da célula ao FNT, o que pode contribuir para o desenvolvimento da forma cerebral (Lucas e cols, 1997; Lou e cols, 1998). A pentoxifilina demonstrou ter capacidade de deprimir a produção do R2FNT sem causar nenhuma alteração na expressão do R1FNT (Bemelman e cols, 1994), assim diminuindo a sinalização pela via de ativação do NF- κ B e, conseqüentemente, este mecanismo pode ter contribuído para uma menor produção FNT nos camundongos CBA que estudamos. Como a pentoxifilina não modificou a produção de FNT pelos macrófagos dos camundongos não susceptíveis à malária cerebral, é possível que esta droga se utilizada em seres humanos não altere a evolução da doença naqueles indivíduos que não evoluiriam para a forma grave cerebral.

Não houve alteração dos níveis séricos de FNT no oitavo dia de infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA. Além disso, tanto os camundongos Balb/C quanto os CBA produziram níveis séricos semelhantes de FNT. Nosso resultado difere de observações prévias de níveis séricos elevados de FNT nas formas graves da malária (Kwiatkowski e cols, 1990; Mshana e cols, 1991; Grau & Lou, 1994; Gimenez, 2003). Contudo, Carvalho e cols (2000) demonstraram que os níveis séricos de FNT não estão intimamente relacionados ao desenvolvimento da malária cerebral em camundongos CBA, sendo que a produção desta citocina é variável em cada animal desta cepa. Uma possível explicação para os nossos resultados seria a presença de citocinas anti-inflamatórias inibindo a produção de FNT. Alternativamente, não se pode excluir a possibilidade de que a elevação do FNT tenha ocorrido nos momentos em que se sucederam a ruptura dos esquizontes (Kwiatkowski e cols, 1989) e quando se processou a coleta do sangue o FNT já havia diminuído pelos mecanismos homeostáticos de controle (Fong e cols, 1989;

Harpaz e cols, 1992). De fato, Kwiatkowski e cols (1989) demonstraram aumento do FNT em cultura após a ruptura dos esquizontes, além disso, Hanum e cols (2003) descreveram que camundongos C57BL/6, também susceptíveis à malária cerebral por *P. berghei* ANKA, produzem quantidade aumentada de FNT no quarto dia pós-infecção, enquanto que, entre o sexto e sétimo dia, somente metade destes animais tinham valores detectáveis de FNT. Já o modelo Balb/C neste estudo só produziu níveis significativamente elevados nos estágios mais tardios da doença, iniciando o aumento a partir do oitavo dia após a infecção. Contudo, observamos que a quantidade de FNT presente no soro dos dois modelos estudados era menor do que nas culturas de macrófagos no oitavo dia de infecção. Provavelmente, esse fato esteja relacionado a produção local do FNT nas áreas de seqüestro sem correspondente expressão sérica (Clark e cols, 1990; Armah e cols, 2005).

A pentoxifilina, na dose de 8mg/Kg/dia, também não influenciou a produção sérica do FNT nos dois modelos estudados. Ainda é controverso o efeito da pentoxifilina sobre a produção de FNT. Alguns estudos mostraram que a droga não diminui a produção de FNT em camundongos (Stoltenburg-Didinger, 1995) e humanos (Looareesuwan e cols, 1998) ou somente o faz quando a droga é administrada em doses mais altas (Wenisch e cols, 1998); já em outros estudos, a pentoxifilina diminuiu a produção sérica do FNT tanto em murinos (Kremsner e cols, 1991; Prada e cols, 1993) quanto em humanos (Di Perri e cols, 1995; Das e cols, 2003). Contudo, vale ressaltar que nesses vários estudos o delineamento experimental foi diferente do nosso, pois variaram a dose da pentoxifilina, o início do tratamento, os modelos utilizados e a cepa de plasmódio.

Nossos dados mostram que existem semelhanças e diferenças entre os dois modelos. Eles diferem em relação ao tempo de sobrevivência, a evolução da parasitemia e do hematócrito, na capacidade fagocitária e na produção de FNT

pelos macrófagos em cultura. Porém, assemelham-se em relação à perda de peso durante a infecção, aos níveis séricos de FNT e na capacidade de produzir NO e H₂O₂. Nossos resultados demonstraram que os camundongos Balb/C morrem a partir do décimo primeiro dia com parasitemia elevada e hematócrito baixo, enquanto os camundongos CBA morrem a partir do oitavo dia com uma parasitemia baixa. A anemia aparece primeiro nos camundongos CBA do que nos camundongos Balb/C. Em relação ao peso, a perda progressiva é menor nos camundongos Balb/C do que nos camundongos CBA. A capacidade fagocitária dos macrófagos peritoneais por meio de receptores para padrões de reconhecimento e receptores para opsoninas é discretamente maior nos camundongos Balb/C infectados do que nos camundongos CBA estando relacionado com a maior percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose. Nos dois modelos utilizados, a infecção malárica não promoveu aumento de FNT, contudo, a produção basal de FNT no sobrenadante das culturas de macrófagos peritoneais foi maior no modelo Balb/C do que no modelo CBA, mas após o acréscimo de LPS às culturas essa diferença não foi evidente e os níveis séricos de FNT foram semelhantes nos dois. A produção de óxido nítrico basal ou após estímulo com interferon gama e/ou lipolissacarídeo foi semelhante entre os dois modelos e a produção de peróxido de hidrogênio foi discretamente menor nos camundongos CBA em relação aos camundongos Balb/C. Ressalta-se que estes resultados podem estar relacionados com a cepa do plasmódio, a presença de citocinas anti-inflamatórias, com as características genéticas de ambos os modelos e o período de infecção malárica. Além disso, o pequeno número amostral de camundongos CBA pode ter influenciado nos resultados estatísticos.

Nossos dados analisaram, pela primeira vez, a influência do tratamento com pentoxifilina sobre a evolução da infecção malárica em modelo não susceptível a

forma cerebral, e particularmente sobre a função dos macrófagos, em uma fase precoce, porém não muito inicial para não impedir o estabelecimento da defesa anti-parasitária. Além de procurar entender a fisiopatogenia das formas graves da malária, nossos dados têm também aplicação prática, pois a indicação da pentoxifilina como uma terapia complementar aos anti-parasitários deve levar em consideração que a maioria dos indivíduos infectados não evoluem para forma grave e destes, poucos apresentam a malária cerebral, e que a medicação para ser eficiente deve ser utilizada antes dos sintomas de gravidade da doença.

Pelo conjunto de nossas observações nos camundongos Balb/C, a pentoxifilina na dose de 16 mg/Kg/dia mostrou toxicidade adiantando a morte em dois dias; enquanto, que na dose de 8 mg/Kg/dia diminuiu a perda de peso, retardou a elevação da parasitemia em quinze dias, o início da morte em um dia, aumentou a sobrevida em três dias e estimulou a capacidade fagocitária por meio de receptores para opsoninas; porém não alterou a capacidade fagocitária por meio de receptores para padrões de reconhecimento, não alterou a produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, provavelmente por não ter influenciado na produção de FNT, mas promoveu um início precoce da anemia. Nos camundongos CBA, a pentoxifilina na dose de 8 mg/Kg/dia não alterou a parasitemia, a progressão da anemia, não influenciou no início da morte nem na perda de peso, porém, aumentou a sobrevida em treze dias, promoveu uma capacidade fagocitária menor do que nos camundongos Balb/C tanto por receptores para padrões de reconhecimento quanto por receptores para opsoninas. Não alterou a produção de peróxido de hidrogênio, mas promoveu um aumento basal da produção de óxido nítrico. A pentoxifilina estimulou uma produção menor de FNT no camundongo CBA do que no Balb/C.

Nossos dados sugerem que as duas cepas de camundongos apresentam mecanismos imunopatogênicos diferentes e que a hiperativação do sistema

imunitário que ocorre nas formas graves da malária está relacionado provavelmente com as características genéticas do indivíduo, que determinarão o tipo de evolução da doença. Sugerem também que a pentoxifilina provavelmente não interferirá na evolução da doença em indivíduos que não desenvolveriam a forma grave, haja vista que a droga não modificou de modo significativo a resposta do sistema imunitário envolvida na imunopatogenia nos camundongos Balb/C, não susceptíveis a forma cerebral, melhorando inclusive alguns aspectos evolutivos da doença como a sobrevida e o retardo da parasitemia. Sugerem, portanto, que a utilização da pentoxifilina como terapêutica complementar às drogas antiplasmodiais, na dose de 8mg/kg/dia, antes das manifestações clínicas de gravidade, deve ser avaliada em seres humanos, com o objetivo de diminuir a grande morbidade e mortalidade da malária.

CONCLUSÃO

1. O tratamento com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina, iniciada a partir do terceiro dia de infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA, retardou em um dia o início da morte e aumentou em três dias a sobrevivência dos camundongos Balb/C; por outro lado, o tratamento com 16 mg/kg/dia de pentoxifilina apresentou possivelmente toxicidade pois aumentou a mortalidade nas fases iniciais da infecção, embora tenha aumentado também a sobrevivência dos animais tratados em dias. Nos camundongos CBA, a pentoxifilina não influenciou no início da morte, porém, aumentou em treze dias a sobrevivência. Os camundongos Balb/C tratados com pentoxifilina começaram a morrer com 12 dias de infecção sendo que o último animal morreu com 23 dias e os camundongos CBA começaram a morrer no sétimo dia com os últimos animais morrendo no vigésimo primeiro dia.
2. O tratamento com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina, iniciada a partir do terceiro dia de infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA ocasionou, até o décimo primeiro dia de infecção, menor perda de peso nos camundongos Balb/C, mas não alterou o peso dos camundongos CBA.
3. O tratamento com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina, iniciada a partir do terceiro dia da infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA, retardou o aumento da parasitemia em dez dias nos camundongos Balb/C, mas não alterou a parasitemia nos camundongos CBA infectados. Os camundongos Balb/C morreram com parasitemia elevada, enquanto os camundongos CBA morreram com baixa parasitemia.
4. Os camundongos Balb/C infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA e tratados com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina apresentaram uma redução do hematócrito

precocemente, por outro lado, o tratamento não alterou a evolução da anemia nos camundongos CBA infectados. Estes apresentaram anemia mais precocemente do que os camundongos Balb/C e morreram com o hematócrito ainda elevado, possivelmente de malária cerebral. Os camundongos Balb/C morrem mais tardiamente com hematócrito muito baixo, possivelmente da anemia.

5. O tratamento com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina não alterou a capacidade fagocitária por meio dos receptores de reconhecimento de padrões, na presença de soro fetal bovino, nos camundongos Balb/C e CBA infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA, contudo, os camundongos Balb/c tratados com pentoxifilina apresentaram a mediana da capacidade fagocitária mais elevada do que os camundongos CBA.
6. O tratamento com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina, iniciada a partir do terceiro dia de infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA promoveu o aumento da fagocitose por meio dos receptores para opsoninas nos camundongos Balb/C por aumentar o envolvimento dos macrófagos na fagocitose, contudo não alterou a capacidade fagocitária nos camundongos CBA. A capacidade fagocitária foi maior nos camundongos Balb/C tratados com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina do que nos camundongos CBA.
7. O tratamento com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina não alterou a produção sérica de FNT, nem as concentrações no sobrenadante das culturas dos macrófagos peritoneais nos camundongos Balb/C e CBA infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA. Porém, as concentrações de FNT foram mais elevadas nos

sobrenadantes das culturas do que no soro nos dois modelos, exceto nos camundongos CBA infectados e tratados. A produção basal de FNT pelos macrófagos peritoneais dos camundongos Balb/C infectados e tratados com pentoxifilina foi maior do que os valores para os camundongos CBA.

8. O tratamento com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina não alterou a produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais dos camundongos Balb/C e CBA infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, entretanto, os camundongos CBA produziram uma quantidade discretamente menor do que os camundongos Balb/C.
9. O tratamento com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina não alterou a produção basal ou estimulada de óxido nítrico nos camundongos Balb/C; mas promoveu um aumento significativo na produção basal de óxido nítrico nos camundongos CBA infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA.
10. Nossos dados sugerem que as duas cepas de camundongos apresentam mecanismos imunopatogênicos diferentes e que a hiperativação do sistema imunitário que ocorre nas formas graves da malária está relacionado provavelmente com as características genéticas do indivíduo, que determinarão o tipo de evolução da doença. Sugerem também que a pentoxifilina provavelmente não interferirá na evolução da doença em indivíduos que não desenvolveriam a forma grave, haja vista que a droga não modificou de modo significativo a resposta do sistema imunitário envolvida na imunopatogenia nos camundongos Balb/C, não susceptíveis a forma cerebral, melhorando inclusive alguns aspectos evolutivos da doença como a sobrevida e retardou a elevação

da parasitemia. Sugerem, portanto, que a utilização da pentoxifilina como terapêutica complementar às drogas antiplasmodiais, na dose de 8mg/kg/dia, antes das manifestações clínicas de gravidade, deve ser avaliada em seres humanos, com o objetivo de diminuir a grande morbidade e mortalidade da malária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 593-623.

Adhikari N, Burns KE, Meade MO. Pharmacologic therapies for adults with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; 8: CD004477.

Agina AA, Abd-Allah SH. Plasma levels of nitric oxide in association with severe *Plasmodium falciparum* in Yemen. *J Egypt Soc Parasitol* 1999; 29: 215-222.

Al Yaman FM, Mokela D, Genton B, Rockett KA, Alpers MP, Clark IA. Association between serum levels of reactive nitrogen intermediates and coma in children with cerebral malaria in Papua New Guinea. *Trans R Soc Trop Hyg* 1996; 90: 270-273.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem Journal* 2001; 357: 593-615.

Allen LA, Aderem A. Mechanisms of phagocytosis. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 36-40.

Anstey NM, Jacups SP, Cain T, Pearson T, Ziesing PJ, Fisher DA, Currie BJ, Marks PJ, Maguire GP. Pulmonary manifestations of uncomplicated *falciparum* and *vivax* malaria: cough, small airways obstruction, impaired gas transfer, and increased pulmonary phagocytic activity. *J Infect Dis Soc Am* 2002; 185: 1326-1334.

Araújo MOG, Bambilra EA, Muniz-Junqueira MI, Lopes CB, Cunha D, Cavalcante I, Santos-Neto L, Tosta CE. Ação diferenciada da pentoxifilina sobre as lesões pulmonares e renais de camundongos CBA/J infectados com *Plasmodium berghei* ANKA. *Rev Soc Bras Med Trop* 1995; 28 (Supl 1): 6.

Araújo MOG, Pittella JEH, Muniz-Junqueira MI, Siqueira BG, Magalhães C, Santos-Neto L, Tosta CE. A pentoxifilina agrava as lesões cerebrais de camundongos CBA/J infectados com *Plasmodium berghei* ANKA. *Rev Soc Bras Med Trop* 1995; 28 (Supl 1): 6.

Armah H, Wired EK, Doodoo AK, Adjei AA, Tettey Y, Gyasi R. Cytokines and adhesion molecules expression in the brain in human cerebral malaria. *Int J Environ Res Public Health* 2005; 2: 123-131.

¹ A citação bibliográfica no texto seguiu o sistema de Harvard e a estruturação das referências na listagem da bibliografia seguiu o estilo de Vancouver. International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *BMJ* 1991; 302: 338-341. Halsey MJ. References. In: Hall GM, ed. How to write a paper. London *BMJ*; 1994: 49-50.

Asensio VC, Oshima H, Falanga PB. *Plasmodium berghei*: is oxide involved in the pathogenesis of mouse cerebral malaria? *Exp Parasitol* 1993; 77: 111-117.

Asiedu DK, Sherman CB. Adult respiratory distress syndrome complicating *Plasmodium falciparum* malaria. *Heart Lung* 2000; 29: 294-297.

Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999; 93: 1464-1476.

Baratin M, Roetync S, Le´ polard C, Falk C, Sawadogo S, Uematsu S, Akira S, Ryffel R, Tiraby JG, Alexopoulou L, Kirschning CJ, Gysin J, Vivier E, Ugolini S. Natural killer cell and macrophage cooperation in MyD88-dependent innate responses to *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102: 14747–14752.

Barsoum RS. Malarial acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 2147-2154.

Becker K, Tilley L, Vennerstrom JL, Roberts D, Rogerson S, Ginsburg H. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host–parasite interactions. *Int J Parasitol* 2004; 34: 163-189.

Bemelmans MH, Abramowicz D, Gouma DJ, Goldman M, Buurman WA. *In vivo* T cell activation by anti-CD3 monoclonal antibody induces soluble TNF receptor release in mice. Effects of pentoxifylline, methylprednisolone, anti-TNF, and anti-IFN-gamma antibodies. *J Immunol* 1994; 153: 499-506.

Berón W, Alvarez-Dominguez C, Mayorga L, Stahl PD. Membrane trafficking along the phagocytic pathway. *Trends Cell Biol* 1995; 5: 100-104.

Bértoli M, Moitinho MLR. Malária no estado do Paraná, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34: 185.

Beshay E, Croze F, Prud'homme GJ. The phosphodiesterase inhibitors pentoxifylline and rolipram suppress macrophage activation and nitric oxide production *in vitro* and *in vivo*. *Clin Immunol* 2001; 98: 272-279.

Böhm L, Roos WP, Serafin AM. Inhibition of DNA repair by pentoxifylline and related methylxanthine derivatives. *Toxicology* 2003; 193: 153-160.

Boutlis CS, Hobbs MR, Marsh RL, Misukonis MA, Tkachuk AN, Lagog M, Booth J, Granger DL, Bockarie MJ, Mgone CS, Levesque MC, Weinberg JB, Anstey NM. Inducible nitric oxide synthase (NOS2) promoter CCTTT repeat polymorphism: relationship to *in vivo* nitric oxide production/NOS activity in an asymptomatic malaria-endemic population. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 69: 569-573.

Brandi MCAC. Padronização de um método de obtenção de fagócitos do sangue periférico para avaliação funcional. *Tese de Mestrado*. Brasília (DF). Univ Brasília - UNB 1993.

Breman JG, Alilio MS, Mills A. Conquering the intolerable burden of malaria: what's new, what's needed: a summary. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71(2): 1-15.

Brian de Souza J, Riley EM. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes Infect* 2002; 4: 291-300.

Brinkmann V, Kaufmann SH, Simon MM, Fischer H. Role of macrophages in malaria: O₂ metabolite production and phagocytosis by splenic macrophages during lethal *Plasmodium berghei* and self-limiting *Plasmodium yoelii* infection in mice. *Infect Immun* 1984; 44: 743-746.

Brown H, Hien TT, Day N, Mai NT, Chuong LV, Chaut TTH, Loc PP, Phu NH, Belhell D, Farrar J, Gatter K, White N, Turner G. Evidence of blood-brain barrier dysfunction in human cerebral malaria. *Neuropat Appl Neurobiol* 1999; 25: 331-340.

Brunet LR. Nitric oxide in parasitic infections. *Int Immunoph* 2001; 1: 1457-1467.

Buguet A, Vincendeau P, Bouteille B, Burlet S, Cespuglio R. Nitric oxide in murine malaria: divergent roles in blood and brain suggested by voltametric measures. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93: 663-664.

Burgner D, Xu W, Rockett K, Gravenor M, Charles IG, Hill AV, Kwiatkowski D. Inducible nitric oxide synthase polymorphism and fatal cerebral malaria. *Lancet* 1998; 352: 1193-1194.

Butcher GA, Garland T, Ajdukiewicz AB, Clark IA. Serum tumor necrosis factor associated with malaria in patients in the Solomon Islands. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; 84: 658-661.

Caamaño J, Hunter C. NFκB family of transcription factors: central regulation of innate and adaptive immune functions. *Clin Microb Rev* 2002; 5(3): 414-429.

Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms, and consequences. *Card Res* 2005; 68: 26-36.

Carvalho LJM, Lenzi HL, Pelajo-Machado M, Oliveira DN, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz MF. *Plasmodium berghei*: Cerebral malaria in CBA mice is not clearly related to plasma TNF levels or intensity of histopathological changes. *Exp Parasit* 2000; 95: 1-7.

Cavalcante CH, Cunha D, Siqueira BG, Araújo MOG, Santos-Neto L, Tosta CE, Muniz-Junqueira MI. Análise quantitativa das alterações hepáticas em camundongos CBA/J infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, tratados com pentoxifilina. *Rev Soc Bras Med Trop* 1996; 29 (Supl 1): 185.

Cavalcante ICH, Siqueira B, Cunha D, Araújo MOG, Tosta CE, Muniz-Junqueira MI. A pentoxifilina iniciada precoce ou tardiamente não previne as alterações pulmonares e hepáticas na malária murina. *Rev Soc Bras Med Trop* 1997; 30 (Supl 1): 36.

Chang KH, Stevenson MM. Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. *Inter J Parasitol* 2004; 34: 1501–1516.

Chen L, Sendo F. Cytokine and chemokine mRNA expression in neutrophils from CBA/NSIc mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA that induces experimental cerebral malaria. *Parasitol Int* 2001; 50: 139-143.

Chen YM, Yung Y, Lin SL, Chiang WC, Lan HY, Tsai TJ. Pentoxifylline suppresses renal tumour necrosis factor-alpha and ameliorates experimental crescentic glomerulonephritis in rats. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 1106-1115.

Clark IA, Chaudhri G. TNF may contribute to the anaemia of malaria by causing dyserythropoiesis and erythrophagocytosis. *Br J Haematol* 1988; 70: 99-103.

Clark IA, Cowden WB. The pathophysiology of *falciparum* malaria. *Pharmacol Ther* 2003; 99: 221–260.

Clark IA, Hunt NH. Evidence for reactive oxygen intermediates causing hemolysis and parasite death in malaria. *Infect Immun* 1993; 39: 1-6.

Clark IA, Ilschner S, Macmimicking JD, Cowden WB. TNF and *Plasmodium berghei* ANKA-induced cerebral malaria. *Immunol Lett* 1990; 25: 195-198.

Clark IA, Rockett K, Burgner D. Genes, nitric oxide and malaria in African children. *Trends in Parasitol* 2003; 19: 335-337.

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Disponível em: <http://www.meusite.com.br/COBEA>, 1990.

Coelho VNPD. Influência do tratamento, in vitro, de fagócitos humanos e murinos com antimoniato de meglumina sobre a fagocitose, produção de radicais de oxigênio e nitrogênio e fator de necrose tumoral- α . *Tese de Mestrado*. Brasília (DF). Univ Brasília - UNB 2003.

Coimbra R, Loomis W, Melbostad H, Tobar M, Porcides RD, Hoyt DB. LPS-stimulated PMN activation and proinflammatory mediator synthesis is downregulated by phosphodiesterase inhibition: role of pentoxifylline. *J Trauma* 2004; 57: 1157-1163.

Cunha D, Siqueira BG, Cavalcante ICH, Araújo MOG, Santos-Neto L, Tosta CE, Muniz-Junqueira MI. Quantificação das lesões cerebrais em camundongos CBA/J infectados com *Plasmodium berghei* ANKA após inibição do fator de necrose tumoral. *Rev Soc Bras Med Trop* 1996; 29 (Supl I): 186-197.

Cunha D, Siqueira BG, Cavalcante ICH, Araújo MOG, Tosta CE, Muniz-Junqueira MI. Influência da utilização tardia da pentoxifilina sobre as alterações cerebrais na malária experimental. *Anais do 3º Congresso de Iniciação Científica da UNB* 1997; 252.

Das BK, Mirshra S, Padhi PK, Manish R, Tripathy R, Sahoo PK, Ravidran B. Pentoxifylline adjunct improves prognosis of human cerebral malaria in adults. *Trop Med Int Health* 2003; 8: 680-684.

Das BS, Nanda NK. Evidence for erythrocyte lipid peroxidation in acute *falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93: 58-62.

Das BS, Patnaid JK, Mohanty S, Mirsha SK, Mohanty D, Satpathy SK, Bose TK. Plasma antioxidants and lipid peroxidation products in *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 49: 720-725.

Day NPJ, Hien TT, Scollaardt T, Loc PP, Chuong LV, Chau TTH. The prognostic and pathophysiology role of pro- and anti-inflammatory cytokines in severe malaria. *J Infect Dis* 1999; 180: 1288-1297.

Di Perri G, Di Perri IG, Monteiro GB, Bonora S, Henning C, Cassatella M, Micciolo R, Vento S, Dusi S, Bassetti D, Concia E. Pentoxifylline as a supportative agent in the treatment of cerebral malaria in children. *J Infect Dis* 1995; 171: 1317-1321.

Dockrell HM, Playfair JHL. Killing of *Plasmodium yoelii* by enzyme-induced products of the oxidative burst. *Infect Immun* 1984; 43: 451-456.

Eck MJ, Sprang SP. The structure of tumor necrosis factor- α at 2.6 Å resolution. Implication for receptor binding. *J Biol Chemistry* 1989; 264: 17595-17605.

Engwerda CR, Belnoue E, Gruner AC, Renia L. Experimental models of cerebral malaria. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 297: 103–143.

Evans KJ, Hansen DSD, van Rooijen N, Buckingham LA, Schofield L. Severe malarial anemia of low parasite burden in rodent models results from accelerated clearance of uninfected erythrocytes. *Blood* 2006; 107: 1192-1199.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil* 1997; 43: 61-68.

Fong Y, Tracey KJ, Lowry SF, Cerami A. Biology of cachectin: macrophage-derived cell regulatory factors. *Cytokines* 1989; 1: 74-88.

Forman HJ, Torres M. Redox signaling in macrophages. *Mol Asp Med* 2001; 22: 189-216.

Frevert U, Sinnis P, Cerami C, Shreffler W, Takacs B, Nussenzweig V. Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. *J Exp Med* 1993; 177: 1287-1298.

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde. *Guia de vigilância epidemiológica*. Brasília 2002.

Gimenez E, Lagerie SB, Fernandez C, Pino P, Mazier D. Tumor necrosis factor in the pathogenesis of cerebral malaria. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 1623-1635.

Goetz FW, Planasb JV, MacKenzie S. Tumor necrosis factors. *Develop Compar Immunology* 2004; 28: 487–497.

Golenser J, McQuillan J, Hee L, Mitchell AJ, Hunt NH. Conventional and experimental treatment of cerebral malaria. *Inter J Parasitol* 2006; 36: 583–593.

Grau GE, Fajardo LF, Piguet PF, Allet B, Lambert PH, Vassalli P. Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science* 1987; 237: 1210-1212.

Grau GE, Lou JN. TNF-induced microvascular pathology in the Th1-mediated lesions of mouse cerebral malaria—possible new mechanisms. In S.

Romagnani, Del Prete G, Abbas AK. Cytokines: basic principles and clinical applications Ares-Serono Symposia, Rome, Italy. 1994; 265-299.

Grau GE, Taylor TE, Molyneux ME, Wirimi JJ, Vassali P, Hommel M, Lambert PH. Tumor necrosis factor and disease severity in children with *falciparum* malaria. *N Engl J Med* 1989; 320: 1586–1591.

Green LC, De Luzuriaga KR, Wagner DA, Rant W, Istfan N, Young VR. Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 7764-7768.

Greenwood B, Marsh K, Snow R. Why do some African children develop severe malaria? *Parasitol Today* 1991; 7: 277-281.

Guinovart C, Navia MM, Tanner M, Alonso PL. Malaria: burden of disease. *Curr Mol Med* 2006; 6: 137-140.

Gyan B, Kurtzhals JAL, Akanmori BD, Ofori M, Goka BQ, Hviid L, Behr C. Elevated levels of nitric oxide and low levels of haptoglobin are associated with severe malarial anaemia in African children. *Acta Trop* 2002; 83: 133-140.

Han J, T Brown T, Beutler B. Endotoxin-responsive sequences control cachectin/tumor necrosis factor biosynthesis at the translational level. *J Exp Med* 1990; 171: 465-475.

Han J, Thompson P, Beutler B. Dexamethasone and pentoxifylline inhibit endotoxin induced cachectin/tumor necrosis factor synthesis at separate points in the signaling pathways. *J Exp Med* 1990; 172: 391-394.

Hanum PS, Hayano M, Kojima S. Cytokine and chemokine responses in a cerebral malaria-susceptible or -resistant strain of mice to *Plasmodium berghei* ANKA infection: early chemokine expression in the brain. *Int Immunol* 2003; 15: 633-640.

Harpaz R, Edelman R, Wasserman SS, Levine MM, Davis JR, Sztein MB. Serum cytokine profiles in experimental human malaria. Relationship to protection and disease course after challenge. *J Clin Inv* 1992; 90: 515-523.

Hearn J, Rayment N, Landon DN, Katz DR, Brian de Souza J. Immunopathology of cerebral malaria: morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature. *Infect Immun* 2000; 68: 5364–5376.

Hemmer CJ, Hort G, Chiwakata CB, Seitz R, Egbring R, Gaus W, Hogel J, Hassemer M, Nawroth PP, Kern P, Dietrich M. Supportive pentoxifylline in *falciparum* malaria: no effect on tumor necrosis factor alpha levels or clinical

outcome: a prospective, randomized, placebo-controlled study. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56: 397-403.

Hermesen C, Bennink E, Sauerwein FT, Eling W. The role of reactive oxygen intermediates in the development of *Plasmodium berghei* induced cerebral malaria. *Immun Letters* 1997; 56: 27-28.

Hernandez-Valladares M, Naessens J, Musoke AJ, Sekikawa K, Rihet P, Ole-Moiyoi OK, Busher P, Iraqi FA. Pathology of Tnf-deficient mice infected with *Plasmodium chabaudi adami* 408XZ. *Exp Parasitol* 2006 (In press)

Hobbs MR, Udhayakumar V, Levesque MC, Booth J, Roberts JM, Tkachuk AN, Pole A, Coon H, Kariuki S, Nahlen BL, Mwaikambo ED, Lal AL, Granger DL, Anstey NM, Weinberg JB. A new NOS2 promoter polymorphism associated with increased nitric oxide production and protection from severe malaria in Tanzanian and Kenyan children. *Lancet* 2002; 360: 1468-1475. *Erratum in: Lancet* 2003; 361: 438.

Hunt NH, Grau GE. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends in Immunol* 2003; 24: 491-499.

Jacobs P, Radzioch D, Stevenson MM. *In vivo* regulation of nitric oxide production by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon, but not by interleukin-4, during blood stage malaria mice. *Infect Immun* 1996; 64: 44-49.

Jacobs P, Radziocii D, Stevenson MM. A Th1-associated increase in tumor necrosis factor alpha expression in the spleen correlates with resistance to blood-stage malaria in mice. *Infect Immun* 1996; 64: 535-541.

Jakeman GN, Saul A, Hogarth WL, Collins WE. Anaemia of acute malaria infections in non-immune patients primarily results from destruction of uninfected erythrocytes. *Parasitol* 1999; 119: 127-133.

Jason J, Archibald LK, Nwanyanwu OC, Bell M, Buchanan I, Larned J, Kazembe PN, Dobbie H, Parekh B, Martha GB, Eick A, Han A, Jarvis WR. Cytokines and Malaria Parasitemia. *Clin Immun* 2001; 100: 208-218.

Ji Q, Zhang L, Jia H, Xu J. Pentoxifylline inhibits endotoxin-induced NF-kappa B activation and associated production of proinflammatory cytokines. *Ann Clin Lab Sci* 2004; 34: 427-436.

Jones COH, Willians HA. The social burden of malaria: what we are measuring? *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71: 156-161.

Keller CC, Kremsner PG, Hittner JB, Misukonis MA, Weinberg JB, Douglas J, Perkins DJ. Elevated nitric oxide production in children with malarial

anemia: hemozoin-induced nitric oxide synthase type 2 transcripts and nitric oxide in blood mononuclear cells. *Infect Immun* 2004; 72: 4868–4873.

Kossodo S, Grau GE. Profiles of cytokine in relation with susceptibility to cerebral malaria. *J Immunol* 1993; 151: 4811-4820.

Krakauer T. Induction of CC chemokines in human peripheral blood mononuclear cells by staphylococcal exotoxins and its prevention by pentoxifylline. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 158-164.

Kremsner PG, Greve B, Lell B, Luckner D, Schmid D. Malarial anaemia in African children associated with high oxygen-radical production. *The Lancet* 2000; 355: 40-41.

Kremsner PG, Grudmann H, Neifer S, Sliwa K, Sahlmüller G, Hegenscheid B, Bienzle U. Pentoxifylline prevents murine cerebral malaria. *J Infect Diseases* 1991; 164: 605-608.

Kremsner PG, Nussler A, Neifer S, Chaves MS, Bienzle U, Senaldi G, Grau GE. Malaria antigen and cytokine-induced production of reactive nitrogen intermediates by murine macrophages: no relevance to the development of experimental cerebral malaria. *Immunol* 1993; 78: 286-290.

Krishnegowda G, Hajjar AM, Zhu J, Douglas EJ, Uematsu S, Akira S, Woods AS, Gowda DC. Induction of Proinflammatory Responses in Macrophages by the glycosylphosphatidylinositols (GPIs) of *Plasmodium falciparum*: Cell signaling receptors, GPI structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem* 2005; 280: 8606-8616.

Kurtzhals JAL, Addae MM, Akanmori BD, Dunyol S, Koram KA, Appawu MA, Nkrumah FK, Hviid L. Anaemia caused by asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune African schoolchildren. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93: 623-627.

Kwiatkowski D, Cannon JG, Manogue KR, Cerami A, Dinarello CA, Greenwood BM. Tumor necrosis factor production in falciparum malaria and its association with schizont rupture. *Clin Exp Immunol* 1989; 77: 361-366.

Kwiatkowski D, Hill AV, Sambou I, Twumasi P, Castracane J, Manogue KR, Cerami A, Brewster DR, Greenwood BM. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *The Lancet* 1990; 336: 1201–1204.

Kwiatkowski D. Cytokines and anti-disease immunity to malaria. *Res Immunol* 1991; 142: 707-712.

Kyes S, Harrocks P, Newbold C. Antigenic variation at the infected red cell surface in malaria. *Annu Rev Microbiol* 2001; 55: 673-707.

Lachman PJ, Hobart MJ. Complement technology. Handbook of Experimental Immunology. *Immunochem* 1978: 1-5.

Lenoble Giovannangeli M. New aspects of the pharmacology of pentoxifylline. *J Mal Vasc* 1989; 14: 35-41.

Lin HI, Chu SJ, Wang D, Feng NH. Pharmacological modulation of TNF production in macrophages. *J Microbiol Immunol Infect* 2004; 37: 8-15.

Linehan AS, Pomares-Martinez L, Gordon S. Macrophages lectins in host defence. *Microbes Infect* 2000; 2: 279-288.

Looareesuwan S, Wilairatana P, Vannaphan S, Wanaratana V, Wenisch C, Aikawa M, Brittenham G, Graninger W, Wernsdorfer WH. Pentoxifylline as an ancillary treatment for severe *falciparum* malaria in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58: 348-353.

Loose LD. Characterization of macrophage dysfunction in rodent malaria. *J Leukoc Biol* 1984; 36: 703-718.

Lopansri BK, Anstey NM, Weinberg JB, Stoddard GJ, Hobbs MR, Levesque MC, Mwaikambo ED, Granger DL. Low plasma arginine concentrations in children with cerebral malaria and decreased nitric oxide production. *Lancet* 2003; 361: 676-678.

Lou J, Gasche Y, Zheng L, Critico B, Monso-Hinard C, Juillard P, Morel P, Buurman WA, Grau GE. Differential reactivity of brain microvascular endothelial cells to TNF reflects the genetic susceptibility to cerebral malaria. *Eur J Immunol* 1998; 28: 3989-4000.

Lou J, Lucas R, Grau GE. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clin Microb Rev* 2001; 14: 810-820.

Lucas R, Lou JN, Juillard P, Moore M, Bluethmann H, Grau GE. Respective role of TNF receptors in the development of experimental cerebral malaria. *J Neuroimmunol* 1997; 72: 143-148.

Lyons RC. The role of nitric oxide in inflammation. *Adv Immunol* 1995; 60: 323-371.

MacEwan DJ. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal* 2002; 14: 477-492.

MacPherson GG, Warrel MJ, White NJ, Looareesuwan S, Warrel DA. Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am J Pathology* 1985; 119: 385-401.

Maitland K, Marsh K. Pathophysiology of severe malaria in children. *Acta Trop* 2004; 90: 131-140.

Malaguarnera L, Musumeci S. The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 472-478.

Malhotra K, Salmon D, Le Bras J, Vilde JL. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to a peroxidase-mediated oxygen-dependent microbicidal system. *Infect Immun* 1988; 56: 3305-3309.

Mansuy D, Boucher JL. Alternative nitric oxide-producing substrates for NO synthases. *Free Rad Biol Med* 2004; 37: 1105-1121.

Marcinkiewicz J, Grobowska A, Lauterbach R, Bobek M. Differential effects of pentoxifylline, a non-specific phosphodiesterase inhibitor, on the production of IL-10, IL-12 p40 and p35 subunits by murine peritoneal macrophages. *Immunopharm* 2000; 49: 335-343.

Matic M, Simon SR. Tumor necrosis factor release from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes: lipopolysaccharide tolerance *in vitro*. *Cytokine* 1991; 3: 576-583.

McGuire W, Alessandro UD, Stephens S, Olaleye BO, Langerock P, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Levels of tumour necrosis factor and soluble TNF receptors during malaria fever episodes in the community. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92: 50-53.

Medana IM, Chaudhri G, Chan-Ling T, Hunt NH. Central nervous system in cerebral malaria: 'Innocent Bystander' or active participant in the induction of immunopathology? *Immunol Cell Biol* 2001; 79: 101-120.

Meera S, Rao Av, D'Souza V, Rao SB. *In vitro* studies on peroxidative changes leading to hemolysis of erythrocytes infested with malarial parasite *Plasmodium vivax*. *Indian J Exp Biol* 1999; 37: 729-730.

Menendez C, Fleming AF, Alonso PL. Malaria-related anaemia. *Parasit Today* 2000; 16: 469-476.

Miller KL, Silverman PH, Kullgren B, Mahlmann LJ. Tumor necrosis factor alpha and the anemia associated with murine malaria. *Infect Immun* 1989; 57: 1542-1546.

Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The Pathogenic basis of malaria. *Nature* 2002; 415: 673-679.

Mohan K, Dubey ML, Ganguly NK, Mahajan RC. *Plasmodium falciparum*: role of activated blood monocytes in erythrocyte membrane damage and red cell loss during malaria. *Exp Parasitol* 1995; 80: 54-63.

Mota MM, Hafalla JCR, Rodriguez A. Migration through host cells activates *Plasmodium* sporozoites for infection. *Nat Medicine* 2002; 8: 1318-1322.

Mota MM, Rodriguez A. Migration through host cells: the first steps of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. *Cel Microbiol* 2004; 6: 1113-1118.

Mshana RN, Boulandi J, Mshana NM, Mayombo J, Mendome G. Cytokines in the pathogenesis of malaria: levels of IL-1 beta, IL-4, IL-6, TNF-alpha and IFN-gamma in plasma of healthy individuals and malaria patients in a holoendemic area. *J Clin Lab Immunol* 1991; 34: 131-139.

Muniz-Junqueira MI, Prata A, Tosta CE. Phagocytic and bactericidal function of mouse macrophages to *Salmonella typhimurium* in human shistosomiasis mansoni. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 46: 132-136.

Muniz-Junqueira MI, Santos-Neto LL, Tosta CE. Influence of tumor necrosis factor- α on the ability of monocytes and lymphocytes to destroy intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Cel Immunol* 2001; 208: 73-79.

Muniz-Junqueira MI, Silva FO, de Paula-Junior MR, Tosta CE. Thalidomide influences the function of macrophages and increases the survival of *Plasmodium berghei*-infected CBA mice. *Acta Trop* 2005; 94(2):128-138.

Muniz-Junqueira MI. Immunomodulatory therapy associated to anti-parasite drugs as a way to prevent severe forms of malaria. *Curr Clin Pharmacol* 2006 (In Press).

Murphy SC, Breman JG. Gaps in the childhood malaria burden in Africa: cerebral malaria, neurological sequelae, anemia, respiratory distress, hypoglycemia, and complications of pregnancy. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 64(1-2 Suppl): 57-67.

Musumeci M, Malaguarnera L, Simpore J, Messina A, Musumeci S. Modulation of immune response in *Plasmodium falciparum* malaria: role of IL-12, IL-18 and TGF-beta. *Cytokine* 2003; 21: 172-178.

Nahrevanian H, Dascombe MJ. Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA in target organs of lethal and non-lethal strains of murine malaria. *Parasit Immunol* 2002; 24: 471-478.

Nahrevanian H, Dascombe MJ. Nitric oxide and reactive nitrogen intermediates during lethal and nonlethal strains of murine malaria. *Parasit Immunol* 2001; 23: 491-501.

Naqvi R, Ahmad E, Akhtar F, Naqvi A, Rizvi A. Outcome in severe acute renal failure associated with malaria. *Nephrol Dial Transpl* 2003; 18: 1820-1823.

Nathan C, Xie Q. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1994; 269: 13725-13728.

Nebl T, De Veer MJ, Schofield L. Stimulation of innate immune responses by malarial glycosylphosphatidylinositol via pattern recognition receptors. *Parasitology* 2005; 130 (Suppl 1): S45-S62.

Neill AJ, Hunt NH. Pathology of fatal and resolving *Plasmodium berghei* cerebral malaria in mice. *Parasitology* 1992; 105: 165-175.

Newton CRJC, Warn PA, Winstanley PA, Peshu N, Snow RW, Pasvol G, Marsh K. Severe anaemia in children living in a malaria endemic area of Kenya. *Trop Med Int Health* 1997; 2: 165-178.

Nieder C, Zimmermann FB, Adam M, Molls M. The role of pentoxifylline as a modifier of radiation therapy. *Cancer Treat Rev* 2005; 31: 448 - 455.

Nussenblatt V, Mukasa G, Metzger A, Ndeezi G, Garrett E, Semba RD. Anemia and Interleukin-10, Tumor necrosis factor alpha, and erythropoietin levels among children with acute, uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Diag Lab Immun* 2001; 8: 1164-1170.

Ockenhouse CF, Shear HL. Oxidative killing of the intraerythrocytic malaria parasite *Plasmodium yoelli* by activated macrophages. *J Immunol* 1984; 132: 424-431.

Ockenhouse CF, Schulman S, Shear HL. Induction of crisis form in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by gamma-interferon-activated, monocyte-derived macrophages. *J Immunol* 1984; 133: 1601-1608.

Odeh M. The role of tumor necrosis factor in the pathogenesis of complicated *falciparum* malaria. *Cytokine* 2001; 14: 11-18.

Ohno T, Nishimura M. Detection of a new cerebral malaria susceptibility locus, using CBA mice. *Immunogenet* 2004; 56: 675-678.

Omer FM, Brian de Souza J, Curran PH, Sultan AA, Riley EM. Activation of transforming growth factor beta by malaria parasite-derived metalloproteinases and a trosspondin-like molecule. *J Exp Med* 2003; 198: 1817-1827.

Omer FM, Brian de Souza J, Riley EM. Differential induction of TGF- β regulates proinflammatory cytokine production and determines the outcome of lethal and nonlethal *Plasmodium yoelii* infections. *J Immunol* 2003; 171: 5430-5436.

Otterlei M, Ostgaard K, Skjåk-Braek G, Smidsrod O, Soon-Shiong P, Espevik T. Induction of cytokine from human monocytes stimulated with alginate. *J Immunother* 1991; 10: 286-291.

Pabón A, Carmona J, Burgos LC, Blair S. Oxidative stress in patients with non-complicated malaria. *Clin Biochem* 2003; 36: 71–78.

Paradowski PT, Zeman K, Pietruszyński R. Pentoxifylline inhibits tumor necrosis factor alpha-induced priming of human neutrophils. *Immunol Letters* 1996; 53: 131-134.

Paula-Jr MR. Influência do tratamento de camundongos CBA infectados com *Plasmodium berghei* ANKA com pentoxifilina sobre a capacidade fagocitária, produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico por macrófagos peritoneais, *in vitro*. *Tese de Mestrado*. Brasília (DF). Univ Brasília 2003.

Peiser L, Gordon S. The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. *Microbes Infect* 2001; 3: 149-159.

Penet MF, Viola A, Confort-Gouny S, Le Fur Y, Duhamel G, Kober F, Ibarrola D, Izquierdo M, Coltel N, Gharib B, Grau GE, Cozzone PJ. Imaging experimental cerebral malaria *in vivo*: significant role of ischemic brain edema. *J Neurosci* 2005; 25: 7352–7358.

Pick E, Mizel D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J Immunol Methods* 1981; 46: 211-226.

Pierrot C, Adam E, Lafitte S, Godin C, Dive D, Capron M, Khalife J. Age-related susceptibility and resistance to *Plasmodium berghei* in mice and rats. *Exp Parasit* 2003; 104: 81–85.

Piguet PF, Kan CD, Vesin C. Role of the tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) in cerebral malaria in mice. *Lab Invest* 2002; 9: 1155-1166.

Pimenta PF, Touray M, Miller L. The journey of malaria sporozoites in the mosquito salivary gland. *J Euk Microbiol* 1994; 41: 608-624.

Prada J, Prager C, Neifer S, Bienzle U, Kremsner PG. Production of interleukin-6 by human and murine mononuclear leukocytes stimulated with *Plasmodium* antigens is enhanced by pentoxifylline, and tumor necrosis factor secretion is reduced. *Infect Immun* 1993; 61(6): 2737-2740.

Promega. Griess Reagent System. Instruction for use of product – Technical Bulletin [on line] 2006; In: <http://www.promega.com/tbs> [acesso em 24 de janeiro de 2006].

Rae C, Mcquillan JA, Parekh SB, Bubb WA, Weiser S, Balcar VJ, Hansen AM, Ball HJ, Hunt NH. Brain gene expression, metabolism, and bioenergetics: interrelationships in murine models of cerebral and noncerebral malaria. *Faseb J* 2004; 18: 499-510.

Reyburn H, Mbatia R, Drakeley C, Bruce J, Carneiro I, Olomi R, Cox J, Nkya WM, Lemnge M, Greenwood BM, Riley EM. Association of transmission intensity and age with clinical manifestations and case fatality of severe *Plasmodium falciparum* malaria. *J Am Med Assoc* 2005; 293: 1461-1470.

Riley EM. Is T cell priming required for initiation of pathology in malaria infection. *Immunol Today* 1999; 180: 1288-1297.

Rockett KA, Awburn MM, Aggarwal BB, Cowden WB, Clark IA. *In vivo* induction of nitrite and nitrate by tumor necrosis factor, lymphotoxin, and interleukin-1: possible roles in malaria. *Infect Immun* 1992; 60: 3725-3730.

Rockett KA, Awburn MM, Cowden WB, Clark IA. Killing of *Plasmodium falciparum in vitro* by derivatives. *Infect Immun* 1991; 59: 3280-3283.

Roth RL, Herman R. *Plasmodium berghei*: correlation of *in vitro* erythrophagocytosis with the dynamics of early-onset anemia and reticulocytosis in mice. *Exp Parasitol* 1979; 47: 169-179.

Sachs J, Malaney P. The economic and social burden of malaria. *Nature* 2002; 415: 680-685.

Sadakane K, Ichinose T, Takano H, Yanagisawa R, Sagai M, Yoshikawa T, Shibamoto T. Murine strain differences in airway inflammation induced by diesel exhaust particles and house dust mite allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 128: 220-228.

Sanni LA, Rae C, Maitland A, Stocker R, Hunt NH. Is ischemia involved in the pathogenesis of murine cerebral malaria? *Am J Pathol* 2001; 159: 1015-1012.

Sansanee CC, Rutta ASM, Muenthaisong K, Watkins P, Na Ubol M, Looareesuwan S. Reduced levels of transforming growth factor- β 1, interleukin-12 and increased migration inhibitory factor are associated with severe malaria. *Acta Trop* 2004; 89: 319-327.

Santos-Neto L, Muniz-Junqueira MI, Brandi MCC, Tosta CE. Has pentoxifylline a place in the therapy of malaria? *Rev Soc Bras Med Trop* 1992; 25 (Suppl II): 66-67.

Sein KK, Maeno Y, Tuc HV, Anh TK, Aikawa M. Differential sequestration of parasitized erythrocyte in *cerebrum* and *cerebellum* in human cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48: 504- 551.

Shaw DR, Griffin Jr FM. Antibody dependent and antibody independent phagocytosis. In: Adams DO, Edelson PJ, Koren H, editors. *Methods for studying mononuclear phagocytes*. New York: Academic Press; 1981; 511-527.

Silamut K, Phu NH, Whitty C, Turner GDH, Louwrier K, Mai NTH, Simpson JA, Hien TT, White N. A quantitative analysis of the microvascular sequestration of malaria parasites in the human brain. *Am J Pathol* 1999; 155: 395-410.

Silva-Junior JB, A malaria no Brasil. Situação epidemiológica da malária no Brasil. Brasil: Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde 2005. Silverman PH, Schooley JC, Mahlmann LJ. Murine malaria decreases hemopoietic stem cells. *Blood* 1987; 69: 408-413.

Silvie O, Rubinstein E, Franetich JF, Prenant M, Belnoue E, Renia L, Hannoun L, Eling W, Levy S, Mazier D. Hepatocyte CD81 is required for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelli* sporozoite infectivity. *Nat Med* 2003; 9: 03-96.

Siqueira BG, Cavalcante ICH, Cunha D, Araújo MOG, Santos-Neto L, Tosta CE, Muniz-Junqueira MI. A inibição do fator de necrose tumoral-alfa agrava a lesão pulmonar em camundongos CBA/J infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA. *Rev Soc Bras Med Trop* 1996; 29 (Supl I): 186.

Sobolewski P, Gramaglia I, Frangos J, Intaglietta M, Van der Hayde HC. Nitric oxide bioavailability in malaria. *Trends Parasitol* 2005; 21: 415-422 (a).

Sobolewski P, Gramaglia I, Frangos J, Intaglietta M, van der Heyde HC. *Plasmodium berghei* resists killing by reactive oxygen species. *Infect Immun* 2005; 73: 6704-6710 (b).

Souza JB, Riley EM. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes Infect* 2002; 4: 291-300.

Stevenson MM, Huang DY, Podoba JE, Nowotarski ME. Macrophage activation during *Plasmodium chabaudi* AS infection in resistant C57BL/6 and susceptible A/J mice. *Infect Immun* 1992; 60: 1193-1201.

Stevenson MM, Lyanga JJ, Skamene E. Murine malaria: genetic control of resistance to *Plasmodium chabaudi*. *Infect Immun* 1982; 38: 80-88.

Stevenson MM, Tam MF, Wolf SF, Sher A. IL-12 induced protection against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS requires IFN- γ and TNF- α and occurs via nitric oxide-dependent mechanism. *J Immunol* 1995; 155: 2545-2556.

Stoltenburg-Didinger G, Neifer S, Bienzle S, Eling WMC, Kremsner PG. Selective damage of hippocampal neurons in murine cerebral malaria prevented by pentoxifylline. *J Neurol Sci* 1993; 114: 20-24.

Stosic-Grujicic SD, Maksimovic DD, Stojkovic MB, Lukic ML. Pentoxifylline prevents autoimmune mediated inflammation in low dose streptozotocin induced diabetes. *Dev Immunol* 2001; 8: 213-221

Stuart LM, Ezekowitz RAB. Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity* 2005; 22: 539-550.

Suh KN, Kain KC, Keystone JS. Malaria. *Canadian Med Ass J* 2004; 170: 1693-1702.

Sun X, Martinez JR, Zhang GH. Inhibition of Ca_2^+ influx by pentoxifylline in NR8383 alveolar macrophages. *Immunopharm* 1999; 43: 47-58.

SVS - Brasil. Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária – PNCM. [online] Brasil: Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde 2002. [capturado em 2004, fev 24] disponível em <http://www.saude.gov.br/svs/epi/malaria/pncm.htm>.

Tachado SD, Gerold P, McConville MJ, Baldwin T, Quilici D, Schwarz RT, Schofield L. Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a

protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase C-dependent signalling pathway. *J Immunol* 1997; 156: 1897–1907.

Tadei WP, Dutary Thatcher B. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2000; 42: 87-94.

Talman MT, Domarle O, McKenzie FE, Arie F, Robert V. Gametocytogenesis: the puberty of *Plasmodium falciparum*. *Malar J* 2004; 3: 24-38.

Taylor-Robinson AW, Looker M. Sensitivity of malaria parasites to nitric oxide at low oxygen tensions. *The Lancet* 1998; 35: 1630.

Taylor-Robinson AW, Smith EC. A dichotomous role for nitric oxide in protection against blood stage malaria infection. *Immunol Letters* 1999; 67: 1–9.

Taylor-Robinson AW. Antimalarial activity of nitric oxide: cytostasis and cytotoxicity towards *Plasmodium falciparum*. *Biochem Soc Trans* 1997; 25: 262S.

Thomas CA, Li Y, Kodama T, Suzuki H, Silverstein SC, Krouy JE. Protection from lethal gram-positive infection by macrophages scavengers receptor-dependent phagocytosis. *J Exp Med* 2000; 191: 147-155.

Torre D, Speranza F, Giola M, Matteelli A, Tambini R, Biondi G. Role of Th1 and Th2 cytokines in immune response to uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Diag Lab Immun* 2002; 9: 348–351.

Tracey JL, Douglas E, Brown DE, Potocnik AJ, Langhorne J. Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. *Rev Mol Med* 2006; 8(6): 1-22.

Tracey KJ. Lethal weight loss: the focus shifts to signal transduction. *Sci Stke* 2002; 130: 1-3.

Trajkovic V. Modulation of inducible nitric oxide synthase activation by immunosuppressive drugs. *Curr Drug Metab* 2001; 2: 315-329.

Turner GDH, Morrison H, Jones M, Davis TME, Loowareesuwan S, Buley ID, Gatter KC, Newbold CI, Pukritayakamee S, Nagachinta B, White NJ, Berendt AR. An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. *Am J Pathol* 1994; 145: 1057-1069.

Turrens JF. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Mol Aspects of Med* 2004; 25: 211–220.

Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annual Rev Immunol* 2002; 20: 825-852.

Urban BC, Ing R, Stevenson MM. Early interactions between blood-stage *Plasmodium* parasites and the immune system. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 297: 25-70.

Vassallo R, Standing JE, Limper AH. Isolated *Pneumocystis carinii* cell wall glucan provokes lower respiratory tract inflammatory responses. *J Immunol* 2000; 164: 3755-3763.

Vijaykumar M, Naik RS, Gowda DC. *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositol-induced TNF-alpha secretion by macrophages is mediated without membrane insertion or endocytosis. *J Biol Chem* 2001; 276: 6909-6912.

Warrel DA. Pathophysiology of severe *falciparum* malaria in man. *Parasitol* 1987; 94: 53-76.

Wenisch C, Looareesuwan S, Wilairatana P, Parschalk B, Vannapann S, Wanaratana V, Wernsdorfer W, Graninger W. Effect of pentoxifylline on cytokine patterns in the therapy of complicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58: 343-347.

Wenisch C, Spitzauer S, Florris-Linau K, Rumpold H, Vannaphan S, Parschalk B, Graninger W, Looareesuwan S. Complement activation in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 85: 166–171.

WHO - World Health Organization. Malaria and Children. [online] 2006: [capturado em 2006, Jan 28] disponível em http://www.rbm.who.int/cmc_upload/0/000/015/367/RBMInfosheet_6.htm.

WHO - World Health Organization. Malaria. Fact Sheet 94, [online] 2002: Washingtton: [capturado em 2005, out 31] disponível em <http://who.int/inf-fs/enfact094.html>.

Wozencraft A, Dockrell HM, Taverne J, Target GAT, Playfair JHL. Killing of human malaria parasites by macrophage secretory products. *Infec and Immun* 1984; 43: 664-669.

Wozencraft AO, Croft SL, Sayers G. Oxygen radical release by adherent cell populations during the initial stages of a lethal rodent malarial infection. *Immunology*. 1985; 56: 523-531.

Wroczynska A, Nahorski W, Bakowska A, Pietkiewicz H. Cytokines and clinical manifestations of malaria in adults with severe and uncomplicated disease. *Int Marit Health* 2005; 56: 103-114.

Wu CC, Liao MH, Chen SJ, Yen MH. Pentoxifylline improves circulatory failure and survival in murine models of endotoxemia. *Eur J Pharmacol* 1999; 373: 41-49.

Yoshimoto T, Takahama Y, Wang CR, Yoneto T, Waki S, Nariuchi H. A pathogenic role of IL-12 in blood-stage murine malaria lethal strain *Plasmodium berghei* NK65 infection. *J Immun* 1998; 160: 5500-5505.

Yuda M, Ishino T. Liver invasion by malarial parasites – how do malarial parasites break through the host barrier? *Cel Microbiol* 2004; 6: 1119-1125.

Zhang G. Tumor necrosis factor family ligand–receptor binding. *Curr Opin Struct Biol* 2004; 14: 154–160.

ANEXO TABELAS

Tabela 01

Análise comparativa entre os pesos do sétimo dia de infecção malárica pelo *Plasmodium berghei* ANKA, nos camundongos dos grupos tratados (Pb+PTX) ou não (Pb) com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina, nos dois modelos murinos CBA e Balb/C.

Modelo murino	Grupos	Média e DP	$\Delta\%$	Varição percentual em relação ao peso inicial
Balb/C	Pb	23,48g \pm 0,57g	-0,153	15,3
	Pb+PTX	26,67g \pm 0,67g	-0,057	4,06
CBA	Pb	25,48g \pm 0,64g	-0,09	9,2
	Pb+PTX	27,99g \pm 0,77g	-0,073	7,26

$\Delta\%$ entre Pb e Pb+PTX nos camundongos Balb/C: p=0,002. Mann-Whitney.

$\Delta\%$ entre Pb e Pb+PTX nos camundongos CBA: p=0,182. Mann-Whitney.

$\Delta\%$ entre os grupos Pb dos camundongos Balb/C e CBA: p=0,007. Mann-Whitney.

$\Delta\%$ entre os grupos Pb+PTX dos camundongos Balb/C e CBA: p=0,426. Mann-Whitney.

Tabela 02

Influência da pentoxifilina sobre o hematócrito de camundongos Balb/C, não susceptíveis à malária cerebral, infectados com *Plasmodium berghei* ANKA no terceiro dia de infecção, antes do início do tratamento. Os grupos estudados foram: animais não infectados tratados com NaCl 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Hematócrito (%) – Balb/C			
	Terceiro dia			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	13	58	55 – 60	52 – 68
PTX	13	58	53 – 62	50 – 66
Pb	13	58	53 – 62	49 – 70
Pb+PTX	13	57	54 – 60	48 – 62

p=0,737, ANOVA.

Tabela 03

Influência da pentoxifilina sobre o hematócrito de camundongos Balb/C, não susceptíveis à malária cerebral, infectados com *Plasmodium berghei* ANKA no quinto dia de infecção. Os grupos estudados foram: animais não infectados tratados com NaCl 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Hematócrito (%) – Balb/C			
	Quinto dia			
	N	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	13	59	56 – 65	51 – 70
PTX	13	60	57 – 61	55 – 66
Pb	13	57	51 – 60	40 – 64
Pb+PTX	13	50	41 – 54	39 – 59

$p < 0,0001$, ANOVA seguido do método de Student-Newman-Keuls para comparação entre os grupo: Pb+PTX x Pb, Pb+PTX x PTX, Pb+PTX x Controle ($p < 0,05$)

Tabela 04

Influência da pentoxifilina sobre o hematócrito de camundongos Balb/C, não susceptíveis à malária cerebral, infectados com *Plasmodium berghei* ANKA no oitavo dia de infecção. Os grupos estudados foram: animais não infectados tratados com NaCl 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Hematócrito (%) – Balb/C			
	Oitavo dia			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	13	57	52 – 59	50 – 65
PTX	11	54	48 – 58	44 – 59
Pb	10	39	31 – 47	29 – 49
Pb+PTX	09	33	31 – 37	30 – 41

$p < 0,001$, ANOVA. Pelo método de Student-Newman-Keuls O grupo Pb e Pb+PTX são significativamente menores que o grupo controle e PTX ($p < 0,05$), porém, não há diferença entre Pb x Pb+PTX ($p > 0,05$)

Tabela 05

Influência da pentoxifilina sobre o hematócrito de camundongos CBA, susceptíveis à malária cerebral, infectados com *Plasmodium berghei* ANKA no terceiro dia de infecção. Os grupos estudados foram: animais não infectados tratados com NaCl 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Hematócrito (%) – CBA			
	Terceiro dia			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	03	62	–	57 – 65
PTX	03	59	–	58 – 60
Pb	04	58	53 – 61	50 – 62
Pb+PTX	05	59	57 – 62	57 – 63

p=0,662, Kruskal-Wallis.

Tabela 06

Influência da pentoxifilina sobre o hematócrito de camundongos CBA, susceptíveis à malária cerebral, infectados com *Plasmodium berghei* ANKA no quinto dia de infecção. Os grupos estudados foram: animais não infectados tratados com NaCl 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Hematócrito (%) – CBA			
	Quinto dia			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	03	55	–	50 – 55
PTX	03	48	–	43 – 53
Pb	04	45	39 – 48	37 – 48
Pb+PTX	05	37	33 – 47	32 – 48

p=0,037, Kruskal-Wallis. Pelo método de Dunn, o grupo Pb+PTX é significativamente menor que os outros grupos (p<0,05).

Tabela 07

Influência da pentoxifilina sobre o hematócrito de camundongos CBA, susceptíveis à malária cerebral, infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, no oitavo dia de infecção. Os grupos estudados foram: animais não infectados tratados com NaCl 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Hematócrito (%) – CBA			
	Oitavo dia			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	03	54	–	51 – 59
PTX	03	48	–	44 – 51
Pb	04	44	39 – 47	35 – 49
Pb+PTX	05	35	31 – 46	30 – 47

p=0,035, Kruskal-Wallis. Pelo método de Dunn, o grupo Pb+PTX e Pb são significativamente menor es que os outros grupos (p<0,05).

Tabela 08

Influência da pentoxifilina sobre a parasitemia (%) de camundongos Balb/C infectados com 10⁶ eritrócitos parasitados com *P. berghei* ANKA e tratados, por via intramuscular, com NaCl 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX), no quarto (4), nono (9) e décimo quinto (15) e vigésimo primeiro (21) dias após infecção.

GRUPOS	Parasitemia (%)				
	Camundongos Balb/C				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Pb 4	10	5,8	2,5 – 6,5	0,6 – 9,6	5,1 ± 0,8
Pb+PTX 4	20	2,1	0,9 – 3,1	0,2 – 5,0	2,2 ± 0,3
Pb 9	10	16,8	12,0 – 27,1	10,2 – 45,0	20,7 ± 3,4
Pb+PTX 9	19	13,8	10,6 – 16,8	6,4 – 24,4	14,4 ± 1,1
Pb 15	07	42,6	32,4 – 57,0	20,0 – 64,0	42,4 ± 5,7
Pb+PTX 15	09	39,6	29,8 – 51,1	21,0 – 59,6	40,4 ± 4,3
Pb 21	05	52,4	50,0 – 57,0	48,0 – 61,6	53,0 ± 2,2
Pb+PTX 21	09	60,2	53,3 – 69,0	46,0 – 69,8	60,5 ± 2,9

Análise entre Pb x Pb+PTX, no quarto dia: p=0,0005; Pb x Pb+PTX, no nono dia: p=0,034; Pb x Pb+PTX, no décimo quinto dia: p=0,806; no vigésimo primeiro dia: p=0,113. Teste t.

Tabela 09

Influência da pentoxifilina sobre a parasitemia (%) de camundongos CBA infectados com 10^6 eritrócitos parasitados com *P. berghei* ANKA e tratados, por via intramuscular, com NaCl 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX), no terceiro (3), quinto (5) e oitavo (8) dias após infecção.

GRUPOS	Parasitemia (%)				
	Camundongos CBA				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Pb 3	04	1,4	0,6 – 1,6	0,0 – 1,6	1,1 ± 0,4
Pb+PTX 3	05	0,6	0,2 – 2,0	0,1 – 2,0	1,0 ± 0,4
Pb 5	04	9,5	2,4 – 33,5	0,8 – 52,0	17,9 ± 11,7
Pb+PTX 5	05	3,6	1,7 – 9,8	0,1 – 14,2	5,3 ± 2,4
Pb 8	04	7,3	5,7 – 12,7	5,2 – 17,2	9,2 ± 2,7
Pb+PTX 8	05	6,8	5,8 – 10,4	5,2 – 11,3	7,9 ± 1,1

Análise entre Pb x Pb+PTX, no terceiro dia: $p=0,905$; Pb x Pb+PTX, no quinto dia: $p=0,413$; Pb x Pb+PTX, no oitavo dia: $p=0,905$. Mann-Whitney

Tabela 10

Influência do tratamento com pentoxifilina sobre o índice fagocitário de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando 1×10^6 leveduras não sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com salina 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com salina 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Índice Fagocitário – Balb/C			
	1×10^6 leveduras não sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	12	37	20 – 50	4 – 84
PTX	11	42	20 – 80	6 – 126
Pb	08	40	13 – 88	2 – 133
Pb+PTX	08	29	24 – 39	4 – 61

$p=0,433$, ANOVA.

Tabela 11

Influência do tratamento com pentoxifilina sobre o percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose em camundongos Balb/C infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando 1×10^6 leveduras não sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com salina 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com salina 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	% de macrófagos envolvidos na fagocitose – Balb/C			
	1×10^6 leveduras não sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	12	15	10 – 20	3 – 34
PTX	11	23	12 – 30	4 – 53
Pb	08	19	6 – 44	2 – 49
Pb+PTX	08	18	15 – 22	3 – 24

p=0,444, ANOVA.

Tabela 12

Influência do tratamento com pentoxifilina sobre a quantidade de leveduras fagocitadas/aderidas nos macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando 1×10^6 leveduras não sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com salina 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com salina 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Leveduras fagocitadas/aderidas – Balb/C			
	1×10^6 leveduras não sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	12	2,1	1,6 – 2,9	1,3 – 3,5
PTX	11	2,3	1,6 – 2,7	1,6 – 2,9
Pb	08	2,0	1,3 – 2,3	1,0 – 2,7
Pb+PTX	08	1,6	1,4 – 1,9	1,1 – 2,7

p=0,133, ANOVA.

Tabela 13

Influência do tratamento com pentoxifilina sobre o índice fagocitário de macrófagos peritoneais de camundongos CBA infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando 1×10^6 leveduras não sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com salina 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com salina 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Índice Fagocitário – CBA			
	1x10 ⁶ leveduras não sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	03	14	–	6 – 29
PTX	03	5	–	3 – 19
Pb	04	13	10 – 14	8 – 15
Pb+PTX	04	6	5 – 7	5 – 7

p=0,211, Kruskal-Wallis.

Tabela 14

Influência do tratamento com pentoxifilina sobre o percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose em camundongos CBA infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando 1×10^6 leveduras não sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com salina 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com salina 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	% de macrófagos envolvidos na fagocitose – CBA			
	1x10 ⁶ leveduras não sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	03	7	–	3 – 20
PTX	03	3	–	3 – 9
Pb	04	7	5 – 8	4 – 9
Pb+PTX	04	3	2 – 4	2 – 4

p=0,194, Kruskal-Wallis.

Tabela 15

Influência do tratamento com pentoxifilina sobre a quantidade de leveduras fagocitadas/aderidas pelos macrófagos peritoneais de camundongos CBA infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando 1×10^6 leveduras não sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com salina 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com salina 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Leveduras fagocitadas/aderidas – CBA			
	1×10^6 leveduras não sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	03	1,9	–	1,4 – 2,0
PTX	03	2,7	–	1,0 – 2,0
Pb	04	1,8	1,4 – 2,5	1,3 – 3,0
Pb+PTX	04	2,0	1,4 – 2,9	1,2 – 3,5

p=0,829, Kruskal-Wallis,.

Tabela 16

Influência do tratamento com pentoxifilina sobre o índice fagocitário de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando 4×10^6 leveduras não sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com salina 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com salina 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Índice Fagocitário - Balb/C			
	4×10^6 leveduras não sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	11	91	44 – 111	23 – 224
PTX	12	72	44 – 142	22 – 202
Pb	11	47	21 – 60	9 – 252
Pb+PTX	10	69	24 – 109	12 – 141

p=0,583, ANOVA.

Tabela 17

Influência do tratamento com pentoxifilina sobre o percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose em camundongos Balb/C infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando 4×10^6 leveduras não sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com salina 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com salina 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	% de macrófagos envolvidos na fagocitose – Balb/C			
	4x10 ⁶ leveduras não sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	12	28	16 – 44	14 – 48
PTX	12	28	23 – 31	14 – 56
Pb	11	15	9 – 27	3 – 61
Pb+PTX	11	24	12 – 35	8 – 40

p=0,475, ANOVA.

Tabela 18

Influência do tratamento com pentoxifilina sobre a quantidade de leveduras fagocitadas/aderidas nos macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando 4×10^6 leveduras não sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com salina 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com salina 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Leveduras fagocitadas/aderidas – Balb/C			
	4x10 ⁶ leveduras não sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	11	3,2	2,4 – 3,9	1,3 – 4,7
PTX	12	2,4	2,2 – 3,7	1,4 – 5,3
Pb	11	2,7	2,2 – 3,1	1,3 – 3,8
Pb+PTX	10	2,9	1,6 – 3,3	1,4 – 4,0

p=0,635, ANOVA.

Tabela 19

Influência do tratamento com pentoxifilina sobre o índice fagocitário de macrófagos peritoneais de camundongos CBA infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando 4×10^6 leveduras não sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com salina 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com salina 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Índice Fagocitário – CBA			
	4x10 ⁶ leveduras não sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	03	97	–	56 – 97
PTX	03	10	–	7 – 25
Pb	04	32	10 – 62	3 – 77
Pb+PTX	04	21	11 – 25	3 – 29

p=0,098, Kruskal-Wallis.

Tabela 20

Influência do tratamento com pentoxifilina sobre o percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose em camundongos CBA infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando 4×10^6 leveduras não sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com salina 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com salina 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	% de macrófagos envolvidos na fagocitose – CBA			
	4x10 ⁶ leveduras não sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	03	24	–	17 – 24
PTX	03	6	–	3 – 10
Pb	04	12	6 – 19	3 – 22
Pb+PTX	04	8	4 – 10	3 – 11

p=0,083, Kruskal-Wallis.

Tabela 21

Influência do tratamento com pentoxifilina sobre a quantidade de leveduras fagocitadas/aderidas pelos macrófagos peritoneais de camundongos CBA infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando 4×10^6 leveduras não sensibilizadas, na presença de soro fetal bovino inativado, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com salina 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com salina 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Leveduras fagocitadas/aderidas – CBA			
	4×10^6 leveduras não sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	03	4,0	–	3,3 – 4,0
PTX	03	2,3	–	1,7 – 2,4
Pb	04	2,5	1,6 – 3,1	1,0 – 3,5
Pb+PTX	04	2,4	1,5 – 3,1	1,0 – 3,3

p=0,148, Kruskal-Wallis.

Tabela 22

Influência do tratamento com pentoxifilina sobre o índice fagocitário de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando 1×10^6 leveduras sensibilizadas com soro fresco de camundongo Balb/C, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com salina 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com salina 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Índice Fagocitário – Balb/C			
	1×10^6 leveduras sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	07	123	121 – 260	102 – 266
PTX	11	283	173 – 343	62 – 490
Pb	09	93	56 – 299	14 – 381
Pb+PTX	09	194	79 – 380	42 – 423

p=0,303, ANOVA.

Tabela 23

Influência do tratamento com pentoxifilina sobre o percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose em camundongos Balb/C infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando 1×10^6 leveduras sensibilizadas com soro fresco de camundongo Balb/C, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com salina 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com salina 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	% de macrófagos envolvidos na fagocitose – Balb/C			
	1×10^6 leveduras sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	09	40	30 – 50	17 – 68
PTX	11	54	35 – 74	26 – 94
Pb	09	35	23 – 45	8 – 48
Pb+PTX	09	44	31 – 63	21 – 69

$p=0,033$, ANOVA. Pelo método de Student-Newman-Keuls, os grupos tratados com pentoxifilina apresentaram maior quantidade de macrófagos envolvidos na fagocitose ($p<0,05$)

Tabela 24

Influência do tratamento com pentoxifilina sobre a quantidade de leveduras fagocitadas/aderidas nos macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando 1×10^6 leveduras sensibilizadas com de soro fresco de camundongo Balb/C, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com salina 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com salina 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Leveduras fagocitadas/aderidas – Balb/C			
	1×10^6 leveduras sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	11	3,6	2,8 – 5,0	1,9 – 7,8
PTX	11	4,2	2,6 – 6,4	2,2 – 7,1
Pb	09	2,7	1,9 – 6,8	1,7 – 9,3
Pb+PTX	09	2,8	2,2 – 7,0	2,0 – 8,1

$p=0,937$, ANOVA.

Tabela 25

Influência do tratamento com pentoxifilina sobre o índice fagocitário de macrófagos peritoneais de camundongos CBA infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando 1×10^6 leveduras sensibilizadas com soro fresco de camundongo CBA, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com salina 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com salina 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Índice Fagocitário - CBA			
	1x10 ⁶ leveduras sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	03	109	–	49 – 153
PTX	03	17	–	15 – 54
Pb	04	55	42 – 83	34 – 106
Pb+PTX	04	41	32 – 82	24 – 121

p=0,216, Kruskal-Wallis.

Tabela 26

Influência do tratamento com pentoxifilina sobre o percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose em camundongos CBA infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando 1×10^6 leveduras sensibilizadas com soro fresco de camundongo CBA, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com salina 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com salina 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	% de macrófagos envolvidos na fagocitose – CBA			
	1x10 ⁶ leveduras sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	03	29	–	26 – 36
PTX	03	12	–	10 – 18
Pb	04	25	15 – 37	9 – 45
Pb+PTX	04	17	12 – 24	9 – 30

p=0,247, Kruskal-Wallis.

Tabela 27

Influência do tratamento com pentoxifilina sobre a quantidade de leveduras fagocitadas/aderidas nos macrófagos peritoneais de camundongos CBA infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando 1×10^6 leveduras sensibilizadas com soro fresco de camundongo CBA, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com salina 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com salina 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Leveduras fagocitadas/ingeridas – CBA			
	1×10^6 leveduras sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	03	3,7	–	1,9 – 4,2
PTX	03	1,5	–	1,4 – 2,9
Pb	04	2,4	2,2 – 3,0	2,0 – 3,6
Pb+PTX	04	2,6	2,4 – 3,6	2,3 – 4,0

p=0,401, Kruskal-Wallis.

Tabela 28

Influência do tratamento com pentoxifilina sobre o índice fagocitário de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando 4×10^6 leveduras sensibilizadas com soro fresco de camundongo Balb/C, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com salina 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com salina 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Índice Fagocitário – Balb/C			
	4×10^6 leveduras sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	10	336	200 – 347	75 – 362
PTX	13	495	335 – 673	222 – 919
Pb	10	532	429 – 682	276 – 1271
Pb+PTX	09	686	364 – 823	202 – 836

p=0,019, ANOVA, seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparação entre os grupos. Houve diferença estatística do controle em relação aos animais com infecção malárica e também em relação aos animais infectados tratados com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina. A mediana dos grupos PTX, Pb e Pb+PTX foi significativamente maior em relação ao controle.

Tabela 29

Influência do tratamento com pentoxifilina sobre o percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose em camundongos Balb/C infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando 4×10^6 leveduras sensibilizadas com soro fresco de camundongo Balb/C, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com salina 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com salina 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	% de macrófagos envolvidos na fagocitose – Balb/C			
	4×10^6 leveduras sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	10	53	43 – 69	27 – 70
PTX	13	64	45 – 83	34 – 93
Pb	10	45	30 – 70	11 – 95
Pb+PTX	09	65	52 – 89	43 – 97

p=0,143, ANOVA.

Tabela 30

Influência do tratamento com pentoxifilina sobre a quantidade de leveduras fagocitadas/aderidas nos macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando 4×10^6 leveduras sensibilizadas com soro fresco de camundongo Balb/C, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com salina 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com salina 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Leveduras fagocitadas/aderidas – Balb/C			
	4×10^6 leveduras sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	10	5,4	4,9 – 7,4	2,8 – 11,5
PTX	13	9,1	5,8 – 10,8	3,9 – 10,8
Pb	10	7,8	3,4 – 13,6	2,2 – 21,0
Pb+PTX	09	8,2	4,1 – 10,8	2,9 – 15,3

p=0,544, ANOVA.

Tabela 31

Influência do tratamento com pentoxifilina sobre o índice fagocitário de macrófagos peritoneais de camundongos CBA infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando 4×10^6 leveduras sensibilizadas com soro fresco de camundongo CBA, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com salina 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com salina 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Índice Fagocitário – Camundongos CBA			
	4x10 ⁶ leveduras sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	03	170	–	26 – 239
PTX	03	104	–	40 – 113
Pb	04	95	66 – 153	53 – 196
Pb+PTX	04	62	37 – 122	26 – 167

p=0,670, Kruskal-Wallis.

Tabela 32

Influência do tratamento com pentoxifilina sobre o percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose em camundongos CBA infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando 4×10^6 leveduras sensibilizadas com soro fresco de camundongo CBA, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com salina 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com salina 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	% de macrófagos envolvidos na fagocitose – CBA			
	4x10 ⁶ leveduras sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	03	40	–	5 – 61
PTX	03	30	–	15 – 37
Pb	04	21	19 – 26	18 – 31
Pb+PTX	04	15	14 – 18	13 – 20

p=0,393, Kruskal-Wallis.

Tabela 33

Influência do tratamento com pentoxifilina sobre a quantidade de leveduras fagocitadas/aderidas pelos macrófagos peritoneais de camundongos CBA infectados ou não com *P. berghei* ANKA, utilizando 4×10^6 leveduras sensibilizadas com soro fresco de camundongo CBA, nos seguintes grupos: animais não infectados e tratados com salina 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com salina 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Leveduras fagocitadas/aderidas – CBA			
	4×10^6 leveduras sensibilizadas			
	n	Mediana	Quartis	Extremos
Controle	03	4,2	–	3,9 – 4,8
PTX	03	3,1	–	2,7 – 3,5
Pb	04	4,6	3,2 – 5,9	2,9 – 6,3
Pb+PTX	04	4,0	2,5 – 6,6	2,0 – 8,3

p=0,386, Kruskal-Wallis.

Tabela 34

Influência da pentoxifilina sobre a produção basal de fator de necrose tumoral (FNT), *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos não susceptíveis à malária cerebral (Balb/C), infectados ou não com *P. berghei* ANKA. Os grupos estudados foram: animais não infectados tratados com NaCl 0,9% (Controle) ou com 8 mg/kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com 8 mg/kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	FNT – Basal – Sobrenadante das Culturas				
	Camundongos Balb/C				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	11	435	72 – 667	51 – 947	420 ± 104
PTX	11	511	222 – 1085	87 – 1514	650 ± 155
Pb	09	97	82 – 900	75 – 1240	409 ± 157
Pb+PTX	10	266	99 – 1003	70 – 1692	495 ± 174

p=0,436, Kruskal-Wallis.

Tabela 35

Influência da pentoxifilina sobre a produção de fator de necrose tumoral (FNT), após estímulo com LPS, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos não susceptíveis à malária cerebral (Balb/C), infectados ou não com *P. berghei* ANKA. Os grupos estudados foram: animais não infectados tratados com NaCl 0,9% (Controle), ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	FNT – LPS – Sobrenadante das Culturas				
	Camundongos Balb/C				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	10	428	121 – 872	76 – 1215	511 ± 124
±PTX	11	786	280 – 1270	240 – 1532	808 ± 144
Pb	09	305	200 – 1003	120 – 1522	623 ± 181
Pb+PTX	09	374	280 – 842	280 – 1705	573 ± 164

p=0,559, Kruskal-Wallis.

Tabela 36

Influência da pentoxifilina sobre a quantidade de fator de necrose tumoral (FNT) presente no soro de camundongos não susceptíveis à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA. Os grupos estudados foram: animais não infectados tratados com NaCl 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	FNT – Soro				
	Camundongos Balb/C				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	12	46	41 – 50	38 – 51	45 ± 1,4
PTX	13	42	38 – 47	18 – 54	41 ± 2,4
Pb	12	48	39 – 54	24 – 66	47 ± 3,3
Pb+PTX	12	49	38 – 67	32 – 67	49 ± 3,4

p=0,187, ANOVA.

Tabela 37

Influência da pentoxifilina sobre a produção basal de fator de necrose tumoral (FNT), *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos susceptíveis à malária cerebral (CBA), infectados ou não com *P. berghei* ANKA. Os grupos estudados foram: animais não infectados tratados com NaCl 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	FNT – Basal – Sobrenadante das Culturas				
	Camundongos CBA				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	03	311	–	88 – 403	267 ± 93
PTX	03	158	–	84 – 276	173 ± 56
Pb	04	104	74 – 202	68 – 202	138 ± 48
Pb+PTX	05	52	46 – 106	46 – 116	71 ± 14

p=0,127, Kruskal-Wallis.

Tabela 38

Influência da pentoxifilina sobre a produção de fator de necrose tumoral (FNT), após estímulo com LPS, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos susceptíveis à malária cerebral (CBA), infectados ou não com *P. berghei* ANKA. Os grupos estudados foram: animais não infectados tratados com NaCl 0,9% (Controle), ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	FNT – LPS – Sobrenadante das Culturas				
	Camundongos CBA				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	03	555	–	72 – 1420	682 ± 394
PTX	03	155	–	85 – 216	152 ± 38
Pb	04	120	96 – 166	87 – 198	131 ± 24
Pb+PTX	05	81	52 – 116	46 – 136	84 ± 16

p=0,245, Kruskal-Wallis.

Tabela 39

Influência da pentoxifilina sobre a quantidade de fator de necrose tumoral (FNT) presente no soro de camundongos susceptíveis à malária cerebral (CBA), infectados ou não com *P. berghei* ANKA. Os grupos estudados foram: animais não infectados tratados com NaCl 0,9% (Controle) ou com 8mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	FNT – Soro				
	Camundongos CBA				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	03	47	–	43 – 50	47 ± 2,1
PTX	03	44	–	35 – 46	42 ± 3,3
Pb	04	49	43 – 53	39 – 53	47 ± 3,2
Pb+PTX	05	53	47 – 67	47 – 71	56 ± 4,8

p=0,101, Kruskal-Wallis.

Tabela 40

Influência da pentoxifilina sobre a produção basal de peróxido de hidrogênio, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos não susceptíveis à malária cerebral (Balb/C), infectados ou não com *P. berghei* ANKA. Os grupos estudados foram: animais não infectados tratados com NaCl 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Peróxido de hidrogênio - Basal				
	Camundongos Balb/C				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	11	30,0	12,0 – 61,0	4,0 – 88,0	35,9 ± 8,5
PTX	11	37,0	11,0 – 67,0	1,6 – 86,0	36,2 ± 8,7
Pb	13	36,0	7,5 – 57,0	2,0 – 94,0	34,6 ± 8,6
Pb+PTX	13	35,0	8,0 – 57,5	4,0 – 96,0	36,8 ± 8,7

A determinação da produção de peróxido de hidrogênio no sobrenadante das culturas de macrófagos peritoneais foi realizada no oitavo dia de infecção, pela microtécnica de Pick e Keisari. p=0,998, ANOVA.

Tabela 41

Influência da pentoxifilina sobre a produção de peróxido de hidrogênio após estímulo com PMA, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos não susceptíveis à malária cerebral (Balb/C), infectados ou não com *P. berghei* ANKA. Os grupos estudados foram: animais não infectados tratados com NaCl 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Peróxido de hidrogênio – PMA				
	Camundongos Balb/C				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	13	34,0	13,0 – 71,0	7,0 – 85,0	39,0 ± 8,0
PTX	12	40,0	12,5 – 71,5	2,0 – 88,0	41,4 ± 9,1
Pb	13	30,0	13,5 – 76,5	5,0 – 90,0	42,6 ± 9,0
Pb+PTX	13	34,0	8,5 – 72,5	2,0 – 91,0	40,6 ± 9,3

A determinação da produção de peróxido de hidrogênio no sobrenadante das culturas de macrófagos peritoneais foi realizada no oitavo dia de infecção, pela microtécnica de Pick e Keisari. $p=0,990$, ANOVA.

Tabela 42

Influência da pentoxifilina sobre a produção basal de peróxido de hidrogênio, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos susceptíveis à malária cerebral (CBA), infectados ou não com *P. berghei* ANKA. Os grupos estudados foram: animais não infectados tratados com NaCl 0,9% (Controle) ou com 8mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Peróxido de hidrogênio – Basal				
	Camundongos CBA				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	03	9,5	–	8,6 – 19,8	12,6 ± 3,6
PTX	03	10,8	–	9,0 – 22,1	14,0 ± 4,1
Pb	04	16,2	8,7 – 23,8	8,1 – 24,3	16,2 ± 4,4
Pb+PTX	05	15,8	8,9 – 19,9	8,3 – 21,9	14,7 ± 2,6

A determinação da produção de peróxido de hidrogênio no sobrenadante das culturas de macrófagos peritoneais foi realizada no oitavo dia de infecção, pela microtécnica de Pick e Keisari. $p=0,953$, Kruskal-Wallis.

Tabela 43

Influência da pentoxifilina sobre a produção de peróxido de hidrogênio após estímulo com PMA, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos susceptíveis à malária cerebral (CBA), infectados ou não com *P. berghei* ANKA. Os grupos estudados foram: animais não infectados tratados com NaCl 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Peróxido de hidrogênio – PMA				
	Camundongos CBA				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	03	25,2	–	11,5 – 48,2	28,3 ± 10,7
PTX	03	15,5	–	11,9 – 51,4	26,3 ± 12,6
Pb	04	30,2	11,5 – 48,7	10,6 – 49,3	30,1 ± 10,7
Pb+PTX	05	46,2	9,8 – 50,0	9,7 – 50,7	33,2 ± 9,6

A determinação da produção de peróxido de hidrogênio no sobrenadante das culturas de macrófagos peritoneais foi realizada no oitavo dia de infecção, pela microtécnica de Pick e Keisari. $p=0,979$, Kruskal-Wallis.

Tabela 44

Influência da pentoxifilina sobre a produção basal de óxido nítrico, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos não susceptíveis à malária cerebral (Balb/C), infectados ou não com *P. berghei* ANKA. Os grupos estudados foram: animais não infectados tratados com NaCl 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Óxido Nítrico – Basal				
	Camundongos Balb/C				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	12	307	297 – 341	227 – 365	308 ± 13
PTX	13	311	281 – 434	243 – 503	347 ± 25
Pb	12	345	287 – 480	269 – 1418	519 ± 115
Pb+PTX	11	282	248 – 381	218 – 959	366 ± 64

$p=0,387$, Kruskal-Wallis.

Tabela 45

Influência da pentoxifilina sobre a produção de óxido nítrico após estímulo com LPS, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos não susceptíveis à malária cerebral (Balb/C), infectados ou não com *P. berghei* ANKA. Os grupos estudados foram: animais não infectados tratados com NaCl 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Óxido Nítrico – LPS				
	Camundongos Balb/C				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	13	317	279 – 383	223 – 539	333 ± 23
PTX	14	330	287 – 529	240 – 980	424 ± 53
Pb	12	345	305 – 840	266 – 1497	576 ± 128
Pb+PTX	11	286	265 – 413	221 – 886	363 ± 56

p=0,328, Kruskal-Wallis.

Tabela 46

Influência da pentoxifilina sobre a produção de óxido nítrico após estímulo com INF- γ , *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos não susceptíveis à malária cerebral (Balb/C), infectados ou não com *P. berghei* ANKA. Os grupos estudados foram: animais não infectados tratados com NaCl 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Óxido Nítrico – INF- γ				
	Camundongos Balb/C				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média DP
Controle	12	348	280 – 358	244 – 464	331 ± 17
PTX	14	334	285 – 471	264 – 664	387 ± 36
Pb	12	350	304 – 494	275 – 1658	523 ± 121
Pb+PTX	11	359	277 – 430	233 – 1219	430 ± 84

p=0,702, Kruskal-Wallis.

Tabela 47

Influência da pentoxifilina sobre a produção de óxido nítrico após estímulo com LPS e INF- γ , *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos não susceptíveis à malária cerebral (Balb/C), infectados ou não com *P. berghei* ANKA. Os grupos estudados foram: animais não infectados tratados com NaCl 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Óxido Nítrico – LPS e INF- γ				
	Camundongos Balb/C				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média \pm DP
Controle	13	345	290 – 396	243 – 637	361 \pm 28
PTX	14	363	293 – 498	253 – 1290	455 \pm 74
Pb	12	440	301 – 860	275 – 1660	622 \pm 124
Pb+PTX	11	360	282 – 526	233 – 1901	541 \pm 149

p=0,591, Kruskal-Wallis.

Tabela 48

Influência da pentoxifilina sobre a produção basal de óxido nítrico, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos susceptíveis à malária cerebral (CBA), infectados ou não com *P. berghei* ANKA. Os grupos estudados foram: animais não infectados tratados com NaCl 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Óxido Nítrico –Basal				
	Camundongos CBA				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média \pm DP
Controle	03	303	–	291 – 351	315 \pm 18
PTX	03	300	–	288 – 334	307 \pm 14
Pb	04	332	269 – 367	216 – 393	318 \pm 37
Pb+PTX	05	603	461 – 756	321 – 790	608 \pm 80

p=0,006, Kruskal-Wallis. Pelo teste de Dunn o grupo Pb+PTX produz maior quantidade de óxido nítrico em relação aos outros grupos (p<0,05).

Tabela 49

Influência da pentoxifilina sobre a produção de óxido nítrico após estímulo com LPS, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos susceptíveis à malária cerebral (CBA), infectados ou não com *P. berghei* ANKA. Os grupos estudados foram: animais não infectados tratados com NaCl 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Óxido Nítrico – LPS				
	Camundongos CBA				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	03	325	–	294 – 353	324 ± 17
PTX	03	353	–	303 – 388	348 ± 25
Pb	04	318	281 – 341	245 – 363	311 ± 24
Pb+PTX	05	317	299 – 322	285 – 325	312 ± 7

p=0,653, Kruskal-Wallis.

Tabela 50

Influência da pentoxifilina sobre a produção de óxido nítrico após estímulo com INF- γ , *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos susceptíveis à malária cerebral (CBA), infectados ou não com *P. berghei* ANKA. Os grupos estudados foram: animais não infectados tratados com NaCl 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Óxido Nítrico – INF- γ				
	Camundongos CBA				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	03	303	–	299 – 340	314 ± 13
PTX	03	324	–	285 – 351	320 ± 19
Pb	04	315	265 – 335	232 – 338	300 ± 24
Pb+PTX	05	309	291 – 335	289 – 338	312 ± 10

p=0,9463, Kruskal-Wallis.

Tabela 51

Influência da pentoxifilina sobre a produção de óxido nítrico após estímulo com LPS e INF- γ , in vitro, pelos macrófagos peritoneais de camundongos susceptíveis à malária cerebral (CBA), infectados ou não com *P. berghei* ANKA. Os grupos estudados foram: animais não infectados tratados com NaCl 0,9% (Controle) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (PTX) e animais infectados tratados com NaCl 0,9% (Pb) ou com 8 mg/Kg/dia de pentoxifilina (Pb+PTX).

GRUPOS	Óxido Nítrico – LPS e INF- γ				
	Camundongos CBA				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média \pm DP
Controle	03	312	–	288 – 363	321 \pm 22
PTX	03	345	–	303 – 356	335 \pm 16
Pb	04	329	272 – 350	231 – 357	311 \pm 28
Pb+PTX	05	312	288 – 337	275 – 340	312 \pm 12

p=0,710, Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para comparação entre os grupos.

ANEXO REAGENTES

2- mercaptoetanol – 2-hidroxietilmercaplan; β -mercaptoetanol. M6250 da Sigma-Aldrich® INC, lote 101K1257, Saint Louis – Missouri, EUA.

Coloração panótica – kit Instant-prov da Newprov Produtos para Laboratório LTDA, lote 4601, Pinhais – Paraná, Brasil.

Entellan – Prod OB354749 da Merk, lote 1079610100, Darmstadt– Alemanha.

Éter etílico PA – Cód. R3852.00 da Dinâmica Reagentes Analíticos, lote 11336, São Paulo – SP.

Formaldeído PA – Cód 112 da Vetec Química Fina LTDA, Lote 971458, Duque de Caxias – Rio de Janeiro, RJ.

Giemsa - coloração da Doles Reagentes, lote Giem 1121, Goiânia – Goiás, Brasil.

Glutamina – L-2-ácido aminoglutarâmico. G5763 da Sigma- Aldrich® INC, lote 124H03025, Saint Louis – Missouri, EUA.

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio da Merk, lote K2728110 951, Darmstadt– Alemanha.

H₃PO₄ PA – ácido orto xaroposo. Prod 10016 Reagem da Quimibrás Indústrias Química AS, lote 060310 - Rio de Janeiro, RJ.

Hepes – n-[2-hidroxi etil] piperazina-N'-[2-ácido etano sulfônico]. H3375 da Sigma-Aldrich® INC, lote 32K5459, Saint Louis – Missouri, EUA.

Interferon- γ – citocina recombinante de camundongo expresso em *E. coli*. I4777 da Sigma- Aldrich® INC, lote 055K0925, Saint Louis – Missouri, EUA.

LPS – lipopolysaccharides de *Escherichia coli* O55:B5. L2880 da Sigma- Aldrich® INC, lote 114K4105, Saint Louis – Missouri, EUA.

Metanol absoluto – Prod 10158 AnalaR® da BDH Chemicals, lote 59583300, Cidade – Estado, Inglaterra.

Need – n-(1-naftil)etilenodiamina. N9125 da Sigma- Aldrich® INC, lote 111K0089, Saint Louis – Missouri, EUA.

Nigrosina – N4754 da Sigma- Aldrich® INC, lote 72F-0286, Saint Louis – Missouri, EUA.

Pentoxifilina – Nome comercial: Trental do Laboratório Aventis Pharma LTDA, lote 106708, Suzano – São Paulo, Brasil.

Peroxidase – peróxido de hidrogênio oxiredutase da *Amoracia rusticana* tipo 1 contendo 148 unidades de purpurogalina/mg. Ec 1.11.1.7 da Sigma- Aldrich® INC, CAS 9003-99-0, Saint Louis – Missouri, EUA.

PMA – 13-acetato forbol 12-miristato. P8139 da Sigma-Aldrich INC, lote 42K1555, Saint Louis – Missouri, EUA.

RPMI 1640 – Meio de cultura acrescido de L-glutamina. R6504-1L da Sigma-Aldrich® INC, lote 124k8306, Saint Louis – Missouri, EUA.

Sulfanilamida – p-aminobenzeno sulfonamida. S9251 da Sigma-Aldrich® INC, lote 101K2010, Saint Louis – Missouri, EUA.

Vermelho de fenol – fenolsulfoftaleína. Prod. 7241 da Merk, lote 70168909, Darmstadt– Alemanha