

**TATIANA KARLA DOS SANTOS BORGES**

**MECANISMOS DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA  
EM MODELOS MURINOS DE *Plasmodium  
berghei* ANKA, SUSCETÍVEIS OU NÃO À  
MALÁRIA CEREBRAL**

**Tese de Doutorado**

**Brasília, DF**

**2013**

**TATIANA KARLA DOS SANTOS BORGES**

**MECANISMOS DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA  
EM MODELOS MURINOS DE *Plasmodium  
berghei* ANKA, SUSCETÍVEIS OU NÃO À  
MALÁRIA CEREBRAL**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor.**

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Imaculada  
Muniz Barboza Junqueira**

**Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kelly Grace  
Magalhães**

**Brasília, DF**

**2013**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Celular e Laboratório da Patologia, área de Patologia da Faculdade de Medicina e no Laboratório de Microscopia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, Brasília-DF. Parte dos camundongos foi gentilmente cedida pelo biotério do Laboratório de Ciências – Labocien do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.



# DEDICATÓRIA

*Aos meus queridos e amados filhos, Carolina e Matheus, desde sempre, companheiros da minha vida e para os quais todas as minhas forças são canalizadas. Foram sempre cuidadosos e amorosos comigo, procurando entender minhas ausências, minha correria, minha impaciência e minhas necessidades. Olharam comigo na mesma direção e apesar de não terem a dimensão das nossas necessidades, seguiram o mesmo caminho que o meu, na confiança que iríamos chegar ao fim. Com sua juventude, me deram apoio e esperanças, me auxiliaram na resolução de problemas, acompanharam minhas atividades, e curtiram comigo a vida de laboratório. Vocês são a fonte do meu orgulho, das minhas realizações e da minha felicidade.*

*Esse trabalho é para vocês e por vocês!*

*À Deus, meu pai, sempre presente! Meu senhor e senhor de todas as coisas. Foram tempos difíceis, às vezes sombrios, tempos de luta e de abnegação. Mas em tuas asas encontrei abrigo, no teu silêncio encontrei respostas, no teu amor encontrei refúgio. Orientou-me nesse caminho, não me desamparou e me preparou para esse momento. Encheu a minha vida de graças e de saúde. Esteve presente onde eu não podia estar e cuidou de tudo o que eu não podia cuidar. Nele confiei a minha vida e revestida do seu Espírito Santo fui capaz de superar os desafios com discernimento e sabedoria. Obrigada meu Deus por mais essa vitória!*

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Aos meus queridos pais, Silas e Ivonete, minha família, meu porto seguro, que me apoiaram, me ajudaram e me ampararam em todos os momentos da vida e que se irradiaram com minhas realizações. Por terem me ensinado responsabilidade, dignidade, coragem, objetividade e respeito. Se hoje sou o que sou, agradeço a vocês. Agradeço ainda por entenderem meu esforço, minhas inquietações e meu afastamento do convívio familiar. A vocês, a quem muito amo, ofereço novamente a minha vitória!*

*Ao Maurício, minha paixão, que sempre respeitou minhas decisões. Crescemos juntos nesse período, reforçamos nossos laços e superamos diversas dificuldades. Peço desculpas pelas ausências e pela impaciência. Sua hombridade, discernimento, apoio e confiança foram importantes para chegar a esse momento. Sei o quanto você tem me esperado. Agradeço pelo seu amor, seu carinho, sua força de viver e sua alegria!*

*À minha querida orientadora e amiga, Professora Dr.<sup>a</sup> Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira, que mais uma vez me abriu as portas e depositou sua confiança no meu trabalho. Tenho orgulho de ser sua aluna e ter tido a oportunidade de aprender com você, não somente o conhecimento necessário à execução desse trabalho, mas também, o respeito, a ética e principalmente a humanidade. Agradeço profundamente pelo seu convívio e sua amizade. Ainda, pelo seu empenho em função do meu trabalho, quando na verdade você deveria estar repousando. Isso só mostra seu senso de responsabilidade e presteza.*

*Esse trabalho também é para você!*

*À minha amiga, professora Dr.<sup>a</sup> Selma Aparecida Souza Kückelhaus, pelo seu imenso incentivo, por acreditar em mim nas horas em que nem eu acreditava, pela sua teimosia que me incentivaram a retornar para realizar o doutorado. Também pela sua palavra amiga na hora das dificuldades, sua força nas horas de desânimo, sua objetividade, seu suporte e seu alegre convívio durante todo esse tempo. Sem suas palavras e sua fé, eu não teria superado vários problemas e não teria chegado ao final deste trabalho com êxito.*

# AGRADECIMENTOS

A todos os meus estagiários e alunos. Gostaria de deixar um carinho especial para André Luiz Soares da Cunha, Andréia Cristina Gonçalves Cascaes, Danilo Corazza, Marcelo Henrique de Nóvoa Netto e Simone Schmil. Essa tese é resultado do nosso árduo trabalho. Sem a presteza, a vontade de aprender, a energia, o esforço, a juventude, a disposição e a força propulsora de vocês, nós não teríamos chegado ao fim. Vocês foram aprendizes e também me ensinaram muito. O convívio alegre, cordial, os risos me trouxeram vida e me ajudaram esquecer as dificuldades e tristezas. Por vocês e com vocês o caminho foi, com certeza, mais feliz e mais iluminado. Obrigada!

À Mayara Gabriele Carvalho de Oliveira, Luciana Magalhães Leite, Thaís Tâmara Castro e Souza Minuzzi, Daniela Aquino e Henda Aline da Rosa e Vasconcelos, queridas amigas, companheiras de pesquisa e de vida, a vocês só tenho agradecimentos. O carinho com que sempre me trataram, a amizade acolhedora, a ajuda nos experimentos, a cumplicidade, o incentivo e os ouvidos.

Às minhas parceiras do laboratório Érica Alessandra Rocha Alves e Marthina Gomes de Miranda e aos professores Fabiana Pirani Carneiro, André Moraes Nicola, José Raimundo Correa, Jaime Santana, Luciana Flannery, Eleuza Magalhães e minha co-orientadora Kelly Grace Magalhães, por compartilharem seus conhecimentos, me ajudarem na aplicação das metodologias e pelas análises que com certeza ajudaram a engrandecer esse trabalho.

Ao querido Professor Dr. Carlos Eduardo Tosta, a quem admiro profundamente, e que mesmo distante é fonte de inspiração e de tranquilidade. Também pela sua capacidade de gerar a inquietação no raciocínio das questões experimentais. Fato que me fez repensar protocolos e resultados.

À Shirley Claudino Pereira Couto, Gleise Queiróz Amaral, Mayara Gabriele Carvalho de Oliveira, Mariangela Souza de Oliveira, Tércia Maria Mendes Souza de Castro, Emiraldo dos Anjos Brito, Bráulio Silva Santos Filho e Giuliano Rezende

Silva pelo companheirismo e auxílio na preparação das substâncias, realização de procedimentos e organização do laboratório.

Ao Sr. Nelson Pelet Nascimento (*in memoriam*) pelo preparo dos meios de cultura e pelo auxílio com a cepa do *Plasmodium* e sua paciência reconfortante.

Ao Instituto de Biologia pela utilização dos microscópios confocal e de varredura e citômetro de fluxo, e ainda pela disponibilidade e ajuda do técnico Lauro e das estagiárias, Márcia e Ingrid.

Aos meus irmãos, Alessandro e Katherine dos Santos Borges, à minha tia Maria de Fátima Benício dos Santos, meus primos Pedro Benício e Eduarda Borges e meus cunhados Jackeline Cavalcante do Nascimento Borges e Rodrigo Magalhães de Mattos, pelo apoio, pela amizade, curiosidade e incentivos.

Ao Centro Universitário de Brasília – UniCEUB – em nome da Professora Sr.<sup>a</sup> Magda Verçosa pela doação de animais do biotério do Laboratório de Ciências – Labocien do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

Ao Seminário Laveran & Deane sobre Malária, organizado pela Fundação Oswaldo Cruz – em nome do seu mentor o Dr. Cláudio Tadeu Daniel Ribeiro e a Sr.<sup>a</sup> Cláudia Castro Carvalho – por todas as sugestões importantes que auxiliaram no amadurecimento deste trabalho científico.

Aos meus colegas, amigos e professores, principalmente, Fabíola Fernandes de Castro, Milton de Paula Rego, Patrícia Martins, Daniela Alves, Ruscaia Dias Teixeira, Fabíola Amaral, Karina Aragão, Maria Cláudia Silva, Alessandro Oliveira Silva pelo incentivo, apoio e nossas longas divagações.

Enfim, a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos!

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>xvii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>xxi</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xxiii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xxvi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1. Malária cerebral	2
1.2. Ciclo biológico dos plasmódios	4
1.3. Alterações imunofisiopatogênicas	5
1.4. Espécies reativas na malária cerebral	6
1.5. Citocinas na malária cerebral	9
1.6. Vias de sinalização intracitoplasmáticas	13
1.7. Inflamassoma	18
1.8. Corpúsculos lipídicos	19
1.9. Eicosanoides	20
1.10. Modelos experimentais na malária	21
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>24</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
<b>4. METODOLOGIA</b>	<b>28</b>
4.1. Delineamento experimental	29
4.2. Modelos experimentais e grupos de estudo	31
4.3. Inóculo	32
4.4. Parasitemia	33
4.5. Avaliação da sobrevivência	34
4.6. Procedimentos realizados com macrófagos	34
4.6.1. Coleta e preparação da micróglia	34

4.6.2.	Coleta e preparação dos macrófagos peritoneais	35
4.6.2.1.	Preparação de células para a determinação de NO e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	36
4.6.2.2.	Preparação de células para avaliação da COX-2 E 5-LOX	36
4.6.2.3.	Preparação de células para quantificação dos corpúsculos lipídicos pelo método de coloração de óleo vermelho (Oil-Red-O)	36
4.6.2.4.	Preparação de células para avaliação do inflamassoma, da via do NFκB, do PPAR-γ e do corpúsculo lipídico	36
4.6.3.	Aderência dos macrófagos peritoneais às lamínulas	37
4.6.4.	Determinação do óxido nítrico	37
4.6.5.	Determinação do peróxido de hidrogênio	38
4.6.6.	Imunomarcção das proteínas do inflamassoma e das proteínas da via do NFκB e do PPAR-γ	39
4.6.6.1.	Ativação do inflamassoma	39
4.6.6.2.	Avaliação da via do NFκB	40
4.6.6.3.	Avaliação da proteína PPAR-γ	40
4.6.7.	Quantificação dos corpúsculos lipídicos	40
4.6.7.1.	Marcação com sonda fluorescente BODIPY	40
4.6.7.2.	Marcação citoquímica com óleo vermelho (Oil-Red-O)	41
4.6.8.	Quantificação da ciclooxigenase-2 e da 5-lipoxigenase	42
4.6.8.1.	Padronização da quantidade de anticorpos	43
4.6.8.2.	Teste de reação-cruzada	43
4.7.	Procedimentos realizados nos cérebros	44
4.7.1.	Coleta, fixação e conservação dos cérebros	44
4.7.2.	Silanização de lâminas	47
4.7.3.	Análise histopatológica	47
4.7.4.	Imunohistoquímica	48
4.7.5.	Análise micro-estrutural por microscopia eletrônica de varredura	50
4.7.6.	Preparação de homogenatos	51
4.7.7.	Determinação das citocinas cerebrais	51
4.7.8.	Avaliação da permeabilidade vascular	53
4.8.	Análise estatística	54
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>55</b>
5.1.	Sobrevida de camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados com o <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	56

5.2.	Parasitemia	57
5.3.	Produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais dos camundongos suscetíveis (CBA e C57BL/6) ou não (BALB/c) à malária cerebral pelo <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	58
5.4.	Produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais dos camundongos suscetíveis (CBA e C57BL/6) ou não (BALB/c) à malária cerebral pelo <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	59
5.5.	Citocinas	61
5.5.1.	Determinação de interleucina-1 $\beta$ nos homogenatos dos cérebros e cerebelos de camundongos suscetíveis (CBA e C57BL/6) ou não (BALB/c) à malária cerebral na infecção pelo <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	61
5.5.2.	Determinação de interleucina-4 nos homogenatos dos cérebros e cerebelos de camundongos suscetíveis (CBA e C57BL/6) ou não (BALB/c) à malária cerebral na infecção pelo <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	62
5.5.3.	Determinação de interleucina-10 nos homogenatos dos cérebros e cerebelos de camundongos suscetíveis (CBA e C57BL/6) ou não (BALB/c) à malária cerebral na infecção pelo <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	63
5.5.4.	Determinação de interleucina-12 nos homogenatos dos cérebros e cerebelos de camundongos suscetíveis (CBA e C57BL/6) ou não (BALB/c) à malária cerebral na infecção pelo <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	64
5.5.5.	Determinação de interleucina-17 nos homogenatos dos cérebros e cerebelos de camundongos suscetíveis (CBA e C57BL/6) ou não (BALB/c) à malária cerebral na infecção pelo <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	65
5.5.6.	Determinação de fator de necrose tumoral- $\alpha$ nos homogenatos dos cérebros e cerebelos de camundongos suscetíveis (CBA e C57BL/6) ou não (BALB/c) à malária cerebral na infecção pelo <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	66
5.6.	Avaliação do inflamassoma	67
5.6.1.	Quantificação da proteína NALPR1	68
5.6.2.	Quantificação da proteína ASC	70
5.6.3.	Quantificação da proteína caspase-1	72
5.7.	Avaliação da via do NF $\kappa$ B	74
5.7.1.	Quantificação da proteína p52 (NF $\kappa$ B2)	75
5.7.2.	Quantificação da proteína RelA (p65)	77
5.7.3.	Quantificação da proteína RelB (p68)	79
5.8.	Avaliação do promotor nuclear PPAR- $\gamma$	82
5.9.	Corpúsculos lipídicos	85
5.10.	Expressão de COX-2 e 5-LOX	89
5.10.1.	Quantificação de COX-2 e 5-LOX nas células do tecido cerebral e cerebelar por imunohistoquímica	89
5.10.2.	Avaliação da expressão de COX-2 e 5-LOX nos macrófagos peritoneais e na micróglia	90
5.10.3.	Avaliação da expressão de COX-2 e 5-LOX nos vasos cerebrais e cerebelares	91
5.11.	Análise histopatológica e micro-estrutural	96



5.12.	Permeabilidade	107
5.13.	Sumário dos resultados obtidos	108
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>111</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>134</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>143</b>
<b>9.</b>	<b>APÊNDICE DE TABELAS</b>	<b>172</b>
<b>10.</b>	<b>APÊNDICE DE REAGENTES</b>	<b>203</b>
<b>11.</b>	<b>ANEXO – COMITÊ DE ÉTICA</b>	<b>209</b>

# LISTA DE ABREVIATURAS

<b>κB</b>	– elemento nuclear -κB
<b>5-LOX</b>	– 5 lipoxigenase
<b>ADN</b>	– ácido desoxirribonucleico
<b>ADRP</b>	– proteína reguladora de diferenciação adiposa
<b>AIM2</b>	– proteína indutora do interferon ausente no mieloma
<b>AMA-1</b>	– antígeno de membrana apical 1
<b>AP</b>	– prot. ativadora (fator de trans. Variantes no texto: AP-1 e AP-2)
<b>APC</b>	– alofocianina (fluorocromo)
<b>ARNm</b>	– ácido ribonucleico mensageiro
<b>ASC</b>	– apoptosis-associated speck-like protein
<b>BCL</b>	– regulador de apoptose BAX
<b>CARD</b>	– proteína que contem o domínio de recrutamento da caspase
<b>CD36</b>	– receptor de limpeza ligante do lipídio de densidade baixa
<b>CD62E</b>	– molécula de adesão selectina E
<b>CD62P</b>	– molécula de adesão selectina P
<b>CD81</b>	– tetraspanina
<b>Célula CN</b>	– linfócitos citotóxico natural
<b>cGMP</b>	– monofosfato guanosina cíclico
<b>ciAP</b>	– proteína celular inibidora da apoptose
<b>CLAG9</b>	– Proteína assexual de citoaderência ligado cromos. 9 do <i>P. falciparum</i>
<b>c-Myc</b>	– fator de transcrição ativadora do oncogene <i>myc</i>
<b>COX-2</b>	– ciclooxigenase 2
<b>CPH</b>	– complexo principal de histocompatibilidade
<b>CSP</b>	– proteína circunsporozoíta
<b>EBA</b>	– antígenos de ligação ao eritrócito
<b>EDTA</b>	– ácido etilenodiamino tetracético
<b>ELISA</b>	– ensaio imunoenzimático
<b>ERK</b>	– cinase reguladora do sinal extracelular
<b>ERN</b>	– espécie reativa de nitrogênio
<b>ERO</b>	– espécie reativa de oxigênio
<b>FADD</b>	– proteína contendo domínio de morte associado ao FAS
<b>FITC</b>	– isotiocianato de fluoresceína (fluorocromo)
<b>FNT-α</b>	– fator de necrose tumoral alfa

<i>fnta</i>	– gene codificante do fator de necrose tumoral alfa
<b>GPI</b>	– glicofosfatidil inositol
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	– peróxido de hidrogênio
<i>hmox</i>	– gene codificante da heme oxigenase
<b>HO1</b>	– heme oxigenase 1
<b>HPETE</b>	– ácido monohidroperoxidoeicosaterenoico
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	– inibidor dos fatores nucleares $\kappa$ B (variantes: I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\kappa$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ )
<b>iBAL</b>	– camundongo BALB/c infectado com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA
<b>IC</b>	– índice corpuscular
<b>iC57</b>	– camundongo C57BL/6 infectado com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA
<b>ICAM-1</b>	– CD 54 – molécula de adesão intercelular 1
<b>iCBA</b>	– camundongo CBA infectado com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA
<b>IKK</b>	– cinase inibidora da cinase $\kappa$ B (variantes $\alpha$ , $\beta$ , $\delta$ )
<b>IL</b>	– interleucina
<i>Il12</i>	– gene codificante da interleucina 12
<b>IFM</b>	– intensidade de fluorescência média
<i>inf</i>	– gene codificante do interferon
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	– interferon- $\gamma$
<b>iNOS</b>	– NOS2 – óxido nítrico sintase indutível
<b>JNK</b>	– cinase c-jun N terminal
<b>Ta1</b>	– linfócitos T auxiliar (CD4 <sup>+</sup> ) do ramo de resposta 1
<b>Ta2</b>	– linfócitos T auxiliar (CD4 <sup>+</sup> ) do ramo de resposta 2
<b>Tc</b>	– linfócito T citolítico
<b>LPS</b>	– lipopolissacarídeo
<b>LT</b>	– linfotoxina (variantes: LT $\alpha$ , LT $\alpha\beta$ e LT $\beta$ )
<b>MAPK</b>	– proteína cinase ativadora de mitógenos
<b>MCL</b>	– média de corpúsculos lipídicos
<b>MCP-1</b>	– proteína quimiotática para monócitos 1
<b>MEV</b>	– microscopia eletrônica de varredura
<b>MIP-1</b>	– proteína inflamatória de macrófagos 1
<b>M<math>\emptyset</math></b>	– macrófagos
<b>MSP</b>	– proteína de superfície do merozoíto
<b>MyD88</b>	– proteína de resposta primária a diferenciação mielóide
<b>NADPH</b>	– fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido
<b>NaNO<sub>2</sub></b>	– nitrito de sódio
<b>NEMO</b>	– modulador essencial dos fatores nucleares $\kappa$ B

<b>NF-κB</b>	– fator nuclear que se liga aos elementos κB no ADN
<b>NIK</b>	– cinase indutora do NFκB
<b>NLR</b>	– receptores do tipo NOD
<b>nNOS</b>	– NOS 3 – óxido nítrico sintase endotelial
<b>nNOS</b>	– NOS1 – óxido nítrico sintase neuronal
<b>NO</b>	– óxido nítrico
<b>NO<sub>2</sub></b>	– dióxido de nitrogênio
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	– nitrito
<b>NOD</b>	– prot. que contem o dom. de oligomerização de ligação ao nucleotídeo
<b>NALPR</b>	– proteína que contem o domínio CARD dos receptores NLR
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	– ânion superóxido
<b>OMS</b>	– Organização Mundial da Saúde
<b>p100</b>	– proteína precursora do p52
<b>p105</b>	– proteína precursora do p50
<b>p50</b>	– fator nuclear do NFκB p50 (NFκB 1)
<b>p52</b>	– fator nuclear do NFκB p52 (NFκB 2)
<b>p53</b>	– fator de transcrição
<b>PAMP</b>	– padrão molecular de patógeno
<b>PE</b>	– ficoeritrina (fluorocromo)
<b>PECAM</b>	– CD31 - Molécula de adesão celular endotelial plaquetária
<b>PFEMP1</b>	– Proteína de citoaderência ligado ao gene assexual do <i>Plasmodium</i>
<b>PGG<sub>2</sub></b>	– prostraglandina G2
<b>PMA</b>	– acetato de forbol miristato
<b>PPAR</b>	– receptor ativado de proliferação peroxissomal
<b>RANTES</b>	– quim. secretada, expressa e regulada por ativ. de linfóc. T normais
<b>Ras</b>	– fator de transcrição
<b>RelA</b>	– fator nuclear do NFκB p65
<b>RelB</b>	– fator nuclear do NFκB p68
<b>rFNT1/p55</b>	– receptor 1 do fator de necrose tumoral
<b>rFNT2/p75</b>	– receptor 2 do fator de necrose tumoral
<b>RIG-1</b>	– proteína indutora do ácido retinóico 1
<b>RIP</b>	– proteína inativadora de ribossomas
<b>rLTβ</b>	– receptor beta da linfotóxina
<b>RSP1/2</b>	– prot. supres. do gene controlador do crescimento e proliferação RAS
<b>rTL</b>	– receptores TOLL-símile
<b>RXR</b>	– receptor X do ácido retinóico

<b>SAB</b>	– soro albumina bovina
<b>SH</b>	– proteoglicana sulfato de heparan
<b>SOD</b>	– superóxido dismutase
<b>STAT</b>	– sinal de transdução e ativador da transcrição
<b>STF</b>	– salina tamponada fosfatada
<b>TAG</b>	– triacilglicerol
<b>TAK</b>	– cinase ativada do TGF- $\beta$
<b>TBS</b>	– tampão salina Tris
<b>TIR</b>	– receptor de transcolação da intimina
<b>TLR</b>	– receptor do tipo TOLL
<b>TRADD</b>	– prot. que contém o domínio de morte associado ao receptor de FNT
<b>TRAF</b>	– fator associado ao receptor de FNT
<b>TRAP</b>	– proteína adesiva relacionada com a trombospondina
<b>TSP</b>	– trombospondina
<b>VCAM-1</b>	– CD106 – molécula de adesão vascular 1

# LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b>	<b>17</b>
Vias de sinalização intracelular e seus produtos nos macrófagos.	
<b>Figura 02</b>	<b>29</b>
Fluxograma dos experimentos.	
<b>Figura 03</b>	<b>45</b>
Superfície dorsal da calota cerebral, mostrando o plano horizontal com os pontos de referência para corte e dissecação.	
<b>Figura 04</b>	<b>46</b>
Secção coronal mostrando as regiões estudadas.	
<b>Figura 05</b>	<b>46</b>
Esquema dos cortes.	
<b>Figura 06</b>	<b>56</b>
Curva de sobrevivência de camundongos CBA, C57BL/6 e BALB/c infectados pelo <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Figura 07</b>	<b>58</b>
Parasitemia dos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados pelo <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Figura 08</b>	<b>59</b>
Produção do óxido nítrico basal, <i>in vitro</i> , pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados (BAL, C57 e CBA) e infectados com o <i>P. berghei</i> ANKA (iBAL, iC57 e iCBA).	
<b>Figura 09</b>	<b>60</b>
Produção de peróxido de hidrogênio basal, <i>in vitro</i> , pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados (BAL, C57 e CBA) e infectados com o <i>P. berghei</i> ANKA (iBAL, iC57 e iCBA).	
<b>Figura 10</b>	<b>62</b>
Quantificação da Interleucina-1 $\beta$ no homogenato do cérebro e cerebelo de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados (BAL, C57 e CBA) e infectados com o <i>P. berghei</i> ANKA (iBAL, iC57 e iCBA) no sexto dia da infecção.	
<b>Figura 11</b>	<b>63</b>
Determinação de Interleucina-4 no homogenato do cérebro e cerebelo de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados (BAL, C57 e CBA) e infectados com o <i>P. berghei</i> ANKA (iBAL, iC57 e iCBA) no sexto dia após infecção.	
<b>Figura 12</b>	<b>64</b>
Determinação de Interleucina-10 no homogenato do cérebro e cerebelo de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados (BAL, C57 e CBA) e infectados com o <i>P. berghei</i> ANKA (iBAL, iC57 e iCBA) no sexto dia após a infecção.	

<b>Figura 13</b>	<b>65</b>
Determinação de Interleucina-12 no homogenato do cérebro e cerebelo de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados (BAL, C57 e CBA) e infectados com o <i>P. berghei</i> ANKA (iBAL, iC57 e iCBA) no sexto dia da infecção.	
<b>Figura 14</b>	<b>66</b>
Determinação de Interleucina-17 no homogenato do cérebro e cerebelo de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados (BAL, C57 e CBA) e infectados com o <i>P. berghei</i> ANKA (iBAL, iC57 e iCBA) no sexto dia após infecção.	
<b>Figura 15</b>	<b>67</b>
Determinação do FNT- $\alpha$ no homogenato do cérebro e cerebelo de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados (BAL, C57 e CBA) e infectados com o <i>P. berghei</i> ANKA (iBAL, iC57 e iCBA) no sexto dia após infecção.	
<b>Figura 16</b>	<b>69</b>
Expressão da NALPR1 nos macrófagos peritoneais dos camundongos infectados ou não com o <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	
<b>Figura 17</b>	<b>70</b>
Intensidade de Fluorescência Média da NALPR1 nos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados (BAL, C57 e CBA) e infectados com o <i>P. berghei</i> ANKA (iBAL, iC57 e iCBA) no sexto dia após infecção.	
<b>Figura 18</b>	<b>71</b>
Expressão da ASC nos macrófagos peritoneais dos camundongos infectados ou não com o <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	
<b>Figura 19</b>	<b>72</b>
Intensidade de Fluorescência Média da ASC nos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados (BAL, C57 e CBA) e infectados com o <i>P. berghei</i> ANKA (iBAL, iC57 e iCBA) no sexto dia após infecção.	
<b>Figura 20</b>	<b>73</b>
Expressão da proteína caspase-1 nos macrófagos peritoneais dos camundongos infectados ou não com o <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	
<b>Figura 21</b>	<b>74</b>
Intensidade de Fluorescência Média da caspase-1 nos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados (BAL, C57 e CBA) e infectados com o <i>P. berghei</i> ANKA (iBAL, iC57 e iCBA) no sexto dia após infecção.	
<b>Figura 22</b>	<b>76</b>
Expressão do p52 nos macrófagos peritoneais na malária experimental.	
<b>Figura 23</b>	<b>77</b>
Intensidade de Fluorescência Média de p52 nos macrófagos peritoneais dos camundongos infectados ou não com o <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	
<b>Figura 24</b>	<b>78</b>
Expressão do RelA nos macrófagos peritoneais na malária experimental.	

<b>Figura 25</b>	<b>79</b>
Intensidade de Fluorescência Média de RelA nos macrófagos peritoneais dos camundongos infectados ou não com o <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	
<b>Figura 26</b>	<b>81</b>
Expressão do RelB nos macrófagos peritoneais na malária experimental.	
<b>Figura 27</b>	<b>82</b>
Intensidade de Fluorescência Média de RelB nos macrófagos peritoneais dos camundongos infectados ou não com o <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	
<b>Figura 28</b>	<b>84</b>
Expressão do PPAR- $\gamma$ nos macrófagos peritoneais na malária experimental.	
<b>Figura 29</b>	<b>85</b>
Intensidade de Fluorescência Média de PPAR- $\gamma$ nos macrófagos peritoneais dos camundongos infectados ou não com o <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	
<b>Figura 30</b>	<b>86</b>
Presença de corpúsculos lipídicos nos macrófagos peritoneais de camundongos infectados ou não com o <i>Plasmodium berghei</i> ANKA no sexto dia de infecção.	
<b>Figura 31</b>	<b>87</b>
Imagens representativas da coloração de corpúsculos lipídicos com óleo vermelho ( <i>Oil red</i> ).	
<b>Figura 32</b>	<b>88</b>
Índice corpuscular dos animais infectados ou não pelo <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	
<b>Figura 33</b>	<b>90</b>
Quantificação de células cerebrais e cerebelares com marcação positiva para COX-2 e 5-LOX por imunohistoquímica.	
<b>Figura 34</b>	<b>93</b>
Imagens representativas da expressão de COX-2 e 5-LOX nos vasos cerebrais na malária experimental.	
<b>Figura 35</b>	<b>99</b>
Análise histopatológica dos cérebros.	
<b>Figura 36</b>	<b>106</b>
Avaliação micro-estrutural por Microscopia Eletrônica de Varredura.	
<b>Figura 37</b>	<b>107</b>
Permeabilidade vascular na malária experimental.	
<b>Figura 38</b>	<b>140</b>
Alterações e mecanismos inflamatórios apresentados pelo modelo susceptível à malária cerebral C57BL/6.	



**Figura 39****141**

Alterações e mecanismos inflamatórios apresentados pelo modelo susceptível à malária cerebral CBA.

**Figura 40****142**

Alterações e mecanismos inflamatórios apresentados pelo modelo susceptível à malária cerebral BALB/c.

# LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b>	<b>22</b>
Alterações patológicas já descritas na malária cerebral compartilhadas entre os seres humanos e o modelo murino.	
<b>Tabela 02</b>	<b>23</b>
Características e alterações observadas em diferentes camundongos ( <i>Mus musculus</i> ) infectados pelo <i>Plasmodium berghei</i> ANKA. Animais com idade entre 6 e 8 semanas de vida.	
<b>Tabela 03</b>	<b>43</b>
Utilização dos anticorpos primários e secundários conforme tipo celular e antígeno.	
<b>Tabela 04</b>	<b>50</b>
Padrão de avaliação para vasos no cérebro e cerebelo.	
<b>Tabela 05</b>	<b>52</b>
Concentração dos calibradores em pg/mL para cada citocina.	
<b>Tabela 06</b>	<b>91</b>
Quantificação da COX-2 e 5-LOX nos macrófagos peritoneais e micróglia por citometria de fluxo.	
<b>Tabela 07</b>	<b>94</b>
Quantificação da COX-2 nos vasos cerebrais e cerebelares.	
<b>Tabela 08</b>	<b>95</b>
Quantificação da 5-LOX nos vasos cerebrais e cerebelares.	
<b>Tabela 09</b>	<b>98</b>
Análise morfológica das seções histológicas e dos vasos cerebrais e cerebelares na malária experimental.	
<b>Tabela 10</b>	<b>100</b>
Achados histopatológicos nos cérebros e cerebelos na malária experimental.	
<b>Tabela 11</b>	<b>101</b>
Achados histopatológicos nos cérebros e cerebelo.	
<b>Tabela 12</b>	<b>102</b>
Quantidade de regiões cerebrais e cerebelares com aderência de leucócitos na malária experimental.	

<b>Tabela 13</b>	<b>103</b>
Quantidade de regiões cerebrais e cerebelares com obstrução por leucócitos na malária experimental.	
<b>Tabela 14</b>	<b>104</b>
Quantidade de regiões cerebrais e cerebelares com congestão vascular na malária experimental.	
<b>Tabela 15</b>	<b>105</b>
Quantidade de regiões cerebrais e cerebelares com aderência de eritrócitos na malária experimental.	
<b>Tabela 16</b>	<b>109</b>
Comparação dos resultados observados entre os grupos não infectados e os grupos infectados com o <i>Plasmodium berghei</i> ANKA no sexto dia da infecção.	
<b>Tabela 17</b>	<b>110</b>
Comparação dos resultados obtidos nas 3 linhagens estudadas, no sexto dia da infecção pelo <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-01</b>	<b>173</b>
Parasitemia (%) de camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados com 10 <sup>6</sup> eritrócitos parasitados com <i>P. berghei</i> ANKA no terceiro, quinto e oitavo dia após infecção.	
<b>Tabela A-02</b>	<b>173</b>
Influência da infecção malárica sobre a produção basal de óxido nítrico, <i>in vitro</i> , no sexto dia de infecção, pelos macrófagos peritoneais de camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-03</b>	<b>174</b>
Influência da infecção malárica sobre a produção basal de peróxido de hidrogênio, <i>in vitro</i> , no sexto dia de infecção, pelos macrófagos peritoneais de camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-04</b>	<b>174</b>
Índice corpuscular do sexto dia de infecção dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-05</b>	<b>175</b>
Quantidade média de corpúsculos lipídicos presentes no citoplasma dos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA no sexto dia de infecção malárica.	
<b>Tabela A-06</b>	<b>175</b>
Quantidade de macrófagos com corpúsculos lipídicos no citoplasma dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA no sexto dia de infecção malárica.	
<b>Tabela A-07</b>	<b>176</b>
Intensidade de fluorescência média total da proteína RelA (p65) nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA no sexto dia de infecção malárica.	

<b>Tabela A-08</b>	<b>176</b>
Intensidade de fluorescência média nuclear da proteína RelA (p65) nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA no sexto dia de infecção malárica.	
<b>Tabela A-09</b>	<b>177</b>
Intensidade de fluorescência média citoplasmática da proteína RelA (p65) nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA no sexto dia de infecção malárica.	
<b>Tabela A-10</b>	<b>177</b>
Razão da intensidade de fluorescência média Nuclear:Citoplasmática da proteína RelA (p65) nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA no sexto dia de infecção malárica.	
<b>Tabela A-11</b>	<b>178</b>
Intensidade de fluorescência média total da proteína RelB (p68) nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA no sexto dia de infecção malárica.	
<b>Tabela A-12</b>	<b>178</b>
Intensidade de Fluorescência Média Nuclear da proteína RelB (p68) nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA no sexto dia de infecção malárica.	
<b>Tabela A-13</b>	<b>179</b>
Intensidade de fluorescência média citoplasmática da proteína RelB (p68) nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA no sexto dia de infecção malárica.	
<b>Tabela A-14</b>	<b>179</b>
Razão da intensidade de fluorescência média Nuclear:Citoplasmática da proteína RelB (p68) nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA no sexto dia de infecção malárica.	
<b>Tabela A-15</b>	<b>180</b>
Intensidade de fluorescência média total da proteína p52 (NFκB2) nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA no sexto dia de infecção malárica.	
<b>Tabela A-16</b>	<b>180</b>
Intensidade de fluorescência média nuclear da proteína p52 (NFκB2) nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA no sexto dia de infecção malárica.	
<b>Tabela A-17</b>	<b>181</b>
Intensidade de fluorescência média citoplasmática da proteína p52 (NFκB2) nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA no sexto dia de infecção malárica.	

<b>Tabela A-18</b>	<b>181</b>
Razão da intensidade de fluorescência média nuclear:citoplasmática da proteína p52 (NFκB2) nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA no sexto dia de infecção malárica.	
<b>Tabela A-19</b>	<b>182</b>
Intensidade de fluorescência média total da proteína PPAR-γ nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA no sexto dia de infecção malárica.	
<b>Tabela A-20</b>	<b>182</b>
Intensidade de fluorescência média nuclear da proteína PPAR-γ nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA no sexto dia de infecção malárica.	
<b>Tabela A-21</b>	<b>183</b>
Intensidade de fluorescência média citoplasmática da proteína PPAR-γ nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA no sexto dia de infecção malárica.	
<b>Tabela A-22</b>	<b>183</b>
Razão da intensidade de fluorescência média nuclear:citoplasmática da proteína PPAR-γ nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA no sexto dia de infecção malárica.	
<b>Tabela A-23</b>	<b>184</b>
Influência da infecção malárica sobre a expressão da proteína do complexo inflamassômico NALP1 nos macrófagos peritoneais no sexto dia de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-24</b>	<b>184</b>
Influência da infecção malárica sobre a expressão da proteína do complexo inflamassômico ASC nos macrófagos peritoneais no sexto dia de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-25</b>	<b>185</b>
Influência da infecção malárica sobre a expressão da proteína do complexo inflamassômico Caspase-1 nos macrófagos peritoneais no sexto dia de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-26</b>	<b>185</b>
Influência da infecção malárica sobre a produção de interleucina 1 no homogenato cerebral após 6 dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-27</b>	<b>186</b>
Influência da infecção malárica sobre a produção de interleucina 4 no homogenato cerebral após 6 dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	

<b>Tabela A-28</b>	<b>186</b>
Influência da infecção malárica sobre a produção de interleucina 10 no homogenato cerebral após 6 dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-29</b>	<b>187</b>
Influência da infecção malárica sobre a produção de interleucina 12 no homogenato cerebral após 6 dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-30</b>	<b>187</b>
Influência da infecção malárica sobre a produção de interleucina 17 no homogenato cerebral após 6 dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-31</b>	<b>188</b>
Influência da infecção malárica sobre a produção de fator de necrose tumoral $\alpha$ no homogenato cerebral após 6 dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-32</b>	<b>188</b>
Influência da infecção malárica sobre a produção de ciclooxigenase 2 nas células cerebrais no sexto dia de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-33</b>	<b>189</b>
Influência da infecção malárica sobre a produção de ciclooxigenase 2 nas células cerebelares no sexto dia de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-34</b>	<b>189</b>
Porcentagem de vasos cerebrais com padrão 0 para ciclooxigenase 2 após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-35</b>	<b>190</b>
Porcentagem de vasos cerebrais com padrão 1 para ciclooxigenase 2 após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-36</b>	<b>190</b>
Porcentagem de vasos cerebrais com padrão 2 para ciclooxigenase 2 após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-37</b>	<b>191</b>
Porcentagem de vasos cerebrais com padrão 3 para ciclooxigenase 2 após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-38</b>	<b>191</b>
Porcentagem de vasos cerebelares com padrão 0 para ciclooxigenase 2 após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	

<b>Tabela A-39</b>	<b>192</b>
Porcentagem de vasos cerebelares com padrão 1 para ciclooxigenase 2 após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-40</b>	<b>192</b>
Porcentagem de vasos cerebelares com padrão 2 para ciclooxigenase 2 após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-41</b>	<b>193</b>
Porcentagem de vasos cerebelares com padrão 3 para ciclooxigenase 2 após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-42</b>	<b>193</b>
Influência da infecção malárica sobre a produção de ciclooxigenase 2 nos macrófagos peritoneais no sexto dia de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-43</b>	<b>194</b>
Influência da infecção malárica sobre a produção de ciclooxigenase 2 na micróglia no sexto dia de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-44</b>	<b>194</b>
Influência da infecção malárica sobre a produção de 5-lipoxigenase nas células cerebrais no sexto dia de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-45</b>	<b>195</b>
Influência da infecção malárica sobre a produção de 5-lipoxigenase nas células cerebelares no sexto dia de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-46</b>	<b>195</b>
Porcentagem de vasos cerebrais com padrão 0 para 5-lipoxigenase após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-47</b>	<b>196</b>
Porcentagem de vasos cerebrais com padrão 1 para 5-lipoxigenase após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-48</b>	<b>196</b>
Porcentagem de vasos cerebrais com padrão 2 para 5-lipoxigenase após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-49</b>	<b>197</b>
Porcentagem de vasos cerebrais com padrão 3 para 5-lipoxigenase após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	

<b>Tabela A-50</b>	<b>197</b>
Porcentagem de vasos cerebelares com padrão 0 para 5-lipoxigenase após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-51</b>	<b>198</b>
Porcentagem de vasos cerebelares com padrão 1 para 5-lipoxigenase após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-52</b>	<b>198</b>
Porcentagem de vasos cerebelares com padrão 2 para 5-lipoxigenase após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-53</b>	<b>199</b>
Porcentagem de vasos cerebelares com padrão 3 para 5-Lipoxigenase após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-54</b>	<b>199</b>
Influência da infecção malárica sobre a produção de 5-lipoxigenase nos macrófagos peritoneais no sexto dia de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-55</b>	<b>200</b>
Influência da infecção malárica sobre a produção de 5-lipoxigenase na micróglia no sexto dia de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-56</b>	<b>200</b>
Avaliação da permeabilidade vascular cerebral após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-57</b>	<b>201</b>
Quantidade de regiões cerebrais e cerebelares com micro-hemorragia na malária experimental. Após seis dias de infecção, a presença de micro-hemorragia foi avaliada em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	
<b>Tabela A-58</b>	<b>202</b>
Quantidade de regiões cerebrais e cerebelares com infiltrado inflamatório na malária experimental. Após seis dias de infecção, a presença de infiltrado inflamatório foi avaliada em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com <i>P. berghei</i> ANKA.	



**RESUMO**

A malária ainda é um importante problema de saúde global, acometendo milhões de pessoas e resultando em aproximadamente 1 milhão de mortes por ano. A forma cerebral é uma das complicações mais grave da infecção pelo *Plasmodium falciparum* em seres humanos, e sua patogênese não está ainda totalmente esclarecida. A hiperativação do sistema imunitário tem sido considerada um importante determinante da evolução para as formas graves. O desequilíbrio da resposta imunitária com polarização para a resposta inflamatória tem um papel central na hiperativação do endotélio vascular, no sequestro de eritrócitos parasitados na microvasculatura cerebral e nas lesões das células cerebrais. Os mediadores inflamatórios são liberados em resposta aos antígenos plasmodiais, às próprias citocinas, aos eicosanóides e a outros produtos como a hemozoína e heme livre, que estimulam diferentes vias de ativação e regulação intracelular. O objetivo deste trabalho foi avaliar os mecanismos da resposta inflamatória envolvidos nas alterações cerebrais em camundongos suscetíveis (CBA e C57BL/6) ou resistentes (BALB/c) à malária cerebral para melhor esclarecer os possíveis mecanismos imunopatogênicos determinantes das formas graves da doença e melhor caracterizar os modelos experimentais da malária. Foram utilizados para este estudo camundongos machos de 8 a 12 semanas de idade, infectados ou não com  $10^6$  eritrócitos parasitados pelo *Plasmodium berghei* ANKA. Para cada linhagem, a morte espontânea foi avaliada dia a dia e a parasitemia foi comparada entre eles no terceiro, quinto e oitavo dia da infecção. 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. As citocinas IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 e o FNT- $\alpha$  foram quantificadas nos homogenatos do cérebro e cerebelo por teste imunoenzimático. A presença de COX-2 e 5-LOX foi avaliada nos macrófagos peritoneais e micróglia por citometria de fluxo, e nos vasos cerebrais e células cerebrais por imunohistoquímica. A ativação do metabolismo lipídico foi avaliada pela quantificação dos corpúsculos lipídicos no citoplasma dos macrófagos peritoneais pela técnica do *Oil red* e *Bodipy*. As vias de ativação do NF $\kappa$ B, o inflamassoma e a regulação pelo PPAR- $\gamma$  foram avaliados no citoplasma e no núcleo dos macrófagos peritoneais. Cortes histológicos do cérebro também foram avaliados utilizando o método clássico de coloração pela hematoxilina-eosina e também por microscopia eletrônica de varredura. A permeabilidade vascular foi avaliada pela quantificação do extravasamento do corante de azul de Evans para o tecido cerebral. Os camundongos C57BL/6 começaram a morrer no sexto dia após a

infecção, os camundongos CBA, dois dias depois, enquanto 55% dos camundongos BALB/c ainda estavam vivos no décimo quinto dia da infecção. A parasitemia nos camundongos C57BL/6 foi maior do que na linhagem BALB/c no terceiro e quinto dias após a infecção e no oitavo dia também foi maior do que nos camundongos CBA. Nos camundongos C57BL/6 houve ativação da via canônica do NFκB, e diminuição da produção de NO e aumento do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, FNT-α e IL-10; não houve alteração na produção de IL-4, IL-12 e IL17; e houve aumento na formação de corpúsculos lipídicos e predominância da expressão de 5-LOX. Observamos também ativação do inflamassoma NALPR1, porém diminuição da produção IL-1β. Nos camundongos CBA houve ativação preponderantemente da via não-canônica do NFκB, diminuição da produção do FNT-α e da IL-10, não houve alteração da produção de IL-12, NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mas observamos um padrão de IL-4 e IL-17 maior do que o das outras linhagens. Houve também ativação do inflamassoma, mas não houve alteração na produção de IL-1β. Nos camundongos BALB/c houve ativação preponderantemente da via canônica do NFκB, mas não houve alteração na produção de IL-12, NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que são estimulados pela atividade desta via. Ainda observamos diminuição na produção de FNT-α e IL-1β. Observamos que houve aumento da formação de corpúsculos lipídicos, mas não houve aumento paralelo na expressão de COX-2 e 5-LOX. Entretanto, a linhagem BALB/c foi a única que apresentou uma translocação importante do regulador PPAR-γ para o núcleo. O perfil de resposta foi seguido de alterações histopatológicas características para cada linhagem, sendo os camundongos C57BL/6 os que apresentaram a maior permeabilidade e sequestro de leucócitos. Os camundongos CBA também apresentaram aumento de permeabilidade, porém menor do que os camundongos C57BL/6, e também apresentaram maior sequestro de eritrócitos do que leucócitos. Poucas alterações foram observadas nos camundongos BALB/c. Os resultados desse trabalho evidenciam diferentes mecanismos de respostas celulares que devem em conjunto ter contribuído para a evolução clínica da malária e mostram que a escolha do modelo experimental para pesquisas em malária deve levar em consideração a linhagem do camundongo e suas capacidades individuais de resposta. Além disso, indicam que a forma cerebral pode ser resultado de diferentes mecanismos fisiopatológicos. Provavelmente, esses resultados também expliquem as diferentes evoluções clínicas observadas da malária humana.

**ABSTRACT**

Malaria is one of the most important problems of public health, affecting millions people and resulting in almost one million death every year. Cerebral disease is one of the most severe complications of *Plasmodium falciparum* malaria and its immunopathogenesis is not well established. It has been considered that the excessive activation of the immune system by some parasite components is critical to the pathogenesis of severe malaria. The imbalance of immune response with polarization towards the inflammatory mechanisms plays a key role in the activation of endothelial vessels, in the sequestration of parasitized erythrocytes within the small vessels of brain and in cerebral cells lesions. The inflammatory mediators are released in response to plasmodial antigens, cytokines, eicosanoids and other products as hemozoin and free heme, which stimulates differently the activation and regulation of intracellular pathways. This work aimed at evaluating the inflammatory response which is involved in cerebral alterations in susceptible (CBA and C57BL/6) and resistant (BALB/c) mice to cerebral malaria, to better understanding of the immunopathological mechanisms and to better characterize the experimental murine models of malaria. In this work, 8-12 weeks-old male mice were infected with  $10^6$  *Plasmodium berghei* ANKA parasitized erythrocytes. For each strain, the survival rate and parasitemia were assessed. The nitric oxide production was evaluated by the Griess reaction and the hydrogen peroxide production was assessed by the Pick's method. IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 and TNF- $\alpha$  production in brain tissue were quantified by an ELISA test. The COX-2 and 5-LOX expression in microglia and peritoneal macrophages were analyzed in a flow cytometer. COX-2 and 5-LOX expression were evaluated in cerebral cells and vessels by immunohistochemistry. The lipid body formation is a hallmark of the activation of lipid metabolism and it was quantified in peritoneal macrophages by oil red O staining and bodipy fluorescent probe. The activation of NF $\kappa$ B pathway, inflammasome and PPAR- $\gamma$  were evaluated in the nuclei and cytoplasm of peritoneal macrophages. Histopathological evaluation of the brain was performed by hematoxylin-eosin staining and by scanning electron microscopy. Vascular permeability was measured by Evans blue dye extraction. The C57BL/6 mice began to die on the sixth day post-infection, CBA mice, two days later, while 55% of BALB/c mice still remained alive 15 days after infection. C57BL/6 mice showed the highest parasitemia compared with the two other strains. Only the canonical NF $\kappa$ B pathway was activated in C57BL/6 mice, there was a decrease in NO production, and an increase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  e IL-10 levels after *Plasmodium* infection, but no alteration was observed in IL-4, IL-12 and IL-17 production; the lipid

bodies formation was enhanced and 5-LOX was predominantly expressed. It was also observed the NALPR1 inflammasome activation, but the IL-1 $\beta$  production was decreased. The non-canonical NF $\kappa$ B pathway was more activated than the canonical one in CBA mice. They showed a decline in TNF- $\alpha$  and IL-10 productions, while no alteration in IL-12, NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was observed; the IL-4 and IL-17 pattern production was higher in these mice than in the other strains. The inflammasome was activated, but no production of IL-1 $\beta$  was observed. The BALB/c mice showed predominantly activation of the canonical NF $\kappa$ B pathway, but the products stimulated by the activity of this pathway, such as, IL-12, NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was not changed in infected animals, and even a decreased production of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  was observed. There was an increased formation of lipid bodies, however, COX-2 and 5-LOX were not significantly expressed. In addition, higher translocation of PPAR- $\gamma$  into the nuclei was observed in this resistant model. These profiles of responses were followed by histopathological alterations that were characteristics for each strain. The C57BL/6 mice showed the highest vascular permeability and leukocyte sequestration; the CBA mice also showed increased vascular permeability but lower than C57BL/6 mice, and they showed more erythrocyte than leukocyte sequestered. Few changes were observed in BALB/c mice. The results presented in this work suggest that different mechanisms of cellular responses may have contributed to determinate clinical malaria and showed that the choice of the experimental model for research on malaria should take into consideration the strain of mice and their individual capacities of responses. They also showed that the cerebral form of the disease may result from different pathophysiological mechanisms. Probably, these results may also explain the different clinical outcomes observed in human malaria.

## **INTRODUÇÃO**

## 1.1. Malária cerebral

Ao longo dos últimos anos, várias estratégias vêm sendo aplicadas para conter o crescimento dos casos de malária. O envolvimento político-social dos líderes e da sociedade privada no combate à doença, o aumento do suporte financeiro, as melhores condições de urbanização e a melhora nas condições nutricionais, aliados à disponibilidade da terapêutica adequada e a utilização de mosquiteiro impregnado com inseticida, certamente, contribuíram para uma redução global de 17% na incidência da doença entre os anos de 2000 e 2010, principalmente em regiões da Europa, da América e noroeste do Pacífico. Contudo, em torno de 3,3 bilhões de pessoas ainda estão em risco de contrair a doença, e dos 216 milhões de casos estimados em 2010, 655.000 pessoas morreram neste ano de complicações da malária grave, dos quais, 86% dos óbitos foram de crianças abaixo de cinco anos de idade (Milner, 2010; OMS, 2012).

As razões para esta alta mortalidade incluem muitos fatores, tais como retardo para iniciar o tratamento, suporte clínico inadequado e dificuldade de acesso à terapêutica apropriada (Marsh, 1992; Miller e cols, 2002; OMS, 2012). Entretanto, a morte do paciente com malária pode ocorrer a despeito da terapêutica antiparasitária apropriada e o adequado suporte clínico. Por que isto ocorre não é completamente entendido, mas o fato de que o paciente pode morrer mesmo após a diminuição da parasitemia indica que outros fatores, além da carga parasitária, possam estar envolvidos. De fato, é reconhecido atualmente que a desregulação do sistema imunitário tem importante participação nos mecanismos da patogênese da anemia e das formas cerebral, renal e pulmonar, as quais caracterizam as formas graves e complicadas da doença (OMS, 2000; Weatherall e cols, 2002; Naqvi e cols, 2003; Schofield e Grau, 2005; Mohan e cols, 2008; Mishra e Das, 2008; Buffet e cols, 2011).

A malária grave é uma síndrome que pode acometer órgãos como cérebro, pulmões, rins e cursar com febre alta, confusão, sonolência ou fraqueza extrema, convulsões generalizadas, anemia, hipoglicemia, hemoglobinúria, icterícia, acidose metabólica, dentre outros. A forma grave mais comum é a malária cerebral caracterizada, segundo a OMS, pela presença de coma ou alteração variável de consciência, apresentando aumento da pressão intracranial, movimentos posturais de descerebração ou descorticação, alucinações, parasitemia no sangue periférico



por *P. falciparum* e nenhuma outra morbidade associada que possa explicar o quadro clínico (OMS, 2000; Trampuz e cols, 2003; Schumacher e Spinelli, 2012).

As complicações neurológicas, como convulsões, ataxia e coma, geralmente ocorrem de forma abrupta nas crianças e, nos adultos, tardiamente, com comprometimento múltiplo de órgãos. Além disso, os adultos apresentam uma frequência menor de edema de papila, retinopatia e resolução mais lenta do coma. Alguns indivíduos ainda podem desenvolver infartos ou trombose cerebral decorrentes da coagulação inadequada. Segundo Wasay e cols (2011), os pacientes adultos que apresentam complicações neurológicas possuem um risco maior de morte, enquanto que a maioria das crianças apresenta restabelecimento da consciência em 48h e melhora completa do quadro neurológico. Por outro lado, em torno de 20% das crianças morrem e 10% das que apresentam convulsões no momento da admissão no hospital cursam com sequelas pós-tratamento (Idro e cols, 2007; Schumacher e Spinelli, 2012). Essas se estabelecem como alterações neurológicas e comportamentais e deficiências cognitivas, representadas por dificuldade de memorização, dificuldades de aprendizagem, prejuízo no desenvolvimento da linguagem, alteração na motricidade e na visão espacial e distúrbios psiquiátricos observados em humanos (Mishra e Newton, 2009; Idro e cols, 2010) e também em modelos experimentais (Dai e cols, 2010).

No Brasil, os casos de malária predominam na Região Amazônica, que apresenta em torno de 807 municípios com transmissão ativa de malária. A média de casos nos últimos 12 anos foi de 422.858 por ano, com uma tendência à diminuição. Entre os anos de 2000 a 2011 foi registrada uma queda de 56,7% no número de casos, saindo de 615.247 notificações em 2000 para 266.348 em 2011, embora em 2005 tenha ocorrido um incremento de 73,7% no número de casos da doença.

A principal espécie causadora da malária transmitida no Brasil é o *Plasmodium vivax* que foi registrado em 78,7% de casos no ano de 2011. Já do contingente de 266.348 casos notificados em 2011, 31.736 desses foram causados pelo *Plasmodium falciparum*. Segundo o Sistema de Informações sobre Mortalidade da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SIM/SVS/MS), a mortalidade por malária tem diminuído na Região Amazônica, entretanto, um incremento na proporção de óbitos tem ocorrido na região Extra-Amazônica desde 2000, sendo o *Plasmodium falciparum* responsável por 18,8% e o *Plasmodium vivax* por 37,7%, em 2011 em todo o Brasil (Brasil, 2013).

No Brasil, raros casos têm sido relatados sobre malária grave pelo *Plasmodium falciparum*. Segundo o SIM/SVS/MS em 2012, somente 15 óbitos foram registrados por *P. falciparum* sendo que destes 2 casos foram de malária cerebral. Por outro lado, são crescentes os dados registrando a presença de casos graves por malária *vivax*, inclusive com acometimento cerebral (Braga e cols, 2004; Santos-Ciminera e cols, 2007; da Silva e cols, 2007; Alexandre e cols, 2010). Os mecanismos que levam um indivíduo infectado com o *Plasmodium vivax* desenvolver a forma cerebral ainda não estão estabelecidos, porém, sugere-se que o desenvolvimento das formas graves provavelmente esteja associado à presença de co-morbidades (Lacerda e cols, 2012) ou ainda que seja reflexo de alterações nos mecanismos imunopatológicos que estimulam a exacerbação da resposta inflamatória (da Silva e cols, 2008; Andrade e cols, 2010).

## **1.2. Ciclo biológico dos plasmódios**

O principal agente causador das formas graves no mundo é o protozoário *Plasmodium (Laverania) falciparum*. Contudo, casos graves de malária têm sido atribuídos ao *P. vivax* e em algumas regiões da África do Sul observam-se infecções por uma espécie símia, o *P. knowlesi*, também responsável por casos fatais.

A transmissão ocorre quando a fêmea do mosquito *Anopheles* infectada com o plasmódio realiza o repasto sanguíneo e inocula esporozoítos, que seguem para fígado, onde realizam o primeiro ciclo esquizônico no interior dos hepatócitos. Em seguida, os merozoítos formados rompem o hepatócito e ganham a circulação sanguínea, onde após reorientação do seu complexo apical e por meio de sistema motor, formado de actina-miosina, invadem os eritrócitos para um novo ciclo esquizônico. Novos merozoítos são formados e lançados novamente na circulação sanguínea, infectando novos eritrócitos e mantendo assim ciclos intra-eritrocitários. Durante o período de esquizogonia eritrocitária, alguns merozoítos se diferenciam em macrogametas ou microgametas, que ao serem ingeridos pelo mosquito, realizam a reprodução sexuada, chamada esporogonia, na qual serão formados novos esporozoítos. É justamente durante a liberação dos merozoítos no sangue que se observa as principais manifestações clínicas, como febre, mialgias e convulsões (Antinori e cols, 2012; Wirth e Pradel, 2012).

As mudanças morfológicas durante o ciclo de vida do parasito são

acompanhadas por mudanças na expressão de antígenos plasmodiais, importantes para invasão de cada tipo celular e para sua sobrevivência dentro do hospedeiro. Desta forma, a entrada nos hepatócitos dependerá de proteínas como a proteína circunsporozoítica (CSP) e proteína adesiva relacionada com a trombospondina (TRAP) que se ligam especificamente a proteoglicana sulfato de heparan (SH) ou a tetraspanina chamada CD81, presentes na superfície do hepatócito (Frevet e cols, 1993; Silvie e cols, 2003; Ejigiri e Sinnis, 2009).

Para invadir os eritrócitos, os merozoítos utilizam mecanismos complexos ligando-se a vários antígenos de superfície diferentes. Inicialmente, a ligação ocorre via proteínas ancoradas ao glicofosfatidilinositol (GPI) do plasmódio, tais como as proteínas da superfície do merozoíto (MSPs) e, em seguida, o antígeno de membrana apical 1 (AMA-1) interage com a superfície do eritrócito durante a reorientação do complexo apical. Essa ligação resulta em interações secundárias que envolvem os antígenos de ligação ao eritrócito (EBAs) e proteínas homólogas ligantes ao reticulócito do *Plasmodium falciparum* (PfRhs) (Gaur e cols, 2004; Ranjan e cols, 2011). Contudo, os mecanismos de invasão dos hepatócitos e eritrócitos são complexos e ainda muito estudados uma vez que esse conhecimento possibilita entre outros a identificação de proteínas chaves para a produção de vacinas profiláticas (Doolan, 2011).

### **1.3. Alterações imunofisiopatogênicas**

A característica central da infecção pelo *P. falciparum* é o sequestro de eritrócitos parasitados na microcirculação de vários órgãos, principalmente cérebro, baço e pulmão (Muniz-Junqueira, 2007; Sarkar e cols, 2010). O sequestro exacerbado é uma consequência direta do desequilíbrio de citocinas, principalmente a superprodução do fator de necrose tumoral e/ou da linfotoxina (Brown e cols, 1999a; Silamut e cols, 1999; Ângulo e Fresno, 2002). Estas citocinas aumentam a expressão de moléculas de aderência como ICAM-1 (CD 54), VCAM-1 (CD106), PECAM (CD31), CD36, trombospondina (TSP), P-selecitina (CD62P) e E-selecitina (CD62E). Essas adesinas são expressas na superfície do endotélio vascular e podem interagir com proteínas do parasito expressos na membrana dos eritrócitos infectados como a molécula EMP1 do *P. falciparum* (PfEMP1), a CLAG9 e, a GPI e a RSP1/2 (Kyes e cols, 2001; Hunt e Grau, 2003; Nebl e cols, 2005).

Assim, o desenvolvimento da forma cerebral começa com a exacerbação da aderência dos eritrócitos parasitados pelo *P. falciparum* às células endoteliais e/ou aos eritrócitos vizinhos. Este sequestro pode interferir com o fluxo sanguíneo cerebral local e, portanto, facilitar o acúmulo de leucócitos, que são ativados pelos produtos liberados pelo parasito durante a multiplicação local (Bate e cols, 1988; Clark e Cowden, 2003). A produção local de citocinas pró-inflamatórias pelos monócitos e macrófagos ativados, particularmente o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (FNT- $\alpha$ ) e linfotóxina (LT) e de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, leva à ativação das células endoteliais e, eventualmente, ao dano destas células e das células vizinhas (Schofield e Grau, 2005). Após ativação, há aumento da produção de radicais livres pelas células endoteliais e da expressão de moléculas de aderência, as quais agravam ainda mais o sequestro dos eritrócitos parasitados.

Os estudos histológicos de cortes cerebrais corados com hematoxilina-eosina e a análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram que como consequência das alterações endoteliais ocorre o edema perivascular, hipóxia do parênquima cerebral circunvizinho, petéquias e hemorragias e rompimento dos capilares cerebrais e vênulas pós-capilares. Dependendo da extensão do dano estrutural cerebral e do grau de distúrbio metabólico, o envolvimento cerebral pode evoluir para múltiplas convulsões e coma (Lackner e cols, 2006; Muniz-Junqueira e Tosta, 2007; Mishra e cols, 2007; Mishra e Newton, 2009). Outros pesquisadores sugerem que a produção excessiva de óxido nítrico pode estar envolvida no desenvolvimento do coma, pela ação moduladora do NO sobre a transmissão de sinal na sinapse neuronal (Mendis e Carter, 1995), como também pela formação de peroxinitritos com lesão tecidual.

#### **1.4. Espécies reativas na malária cerebral**

A produção de espécies reativas no interior das células pode ocorrer de maneira fisiológica, como parte do metabolismo que libera como produtos secundários ou finais as espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs). Já em processos patológicos, como na malária, a produção de EROs e ERNs ocorre de forma estimulada e determina a síntese e quebra de várias moléculas, a transdução dos sinais intracelulares, os mecanismos microbicidas e a propagação de sinais extracelulares. Em conjunto, o desequilíbrio na produção de

citocinas inflamatórias e a alteração do metabolismo lipídico promovem a formação de várias espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), e de nitrogênio, como o óxido nítrico (NO) (Morgan e Liu, 2011).

As espécies reativas de oxigênio são produzidas durante o metabolismo aeróbio de várias células nas quais, inicialmente, o  $O_2$  sofre redução monovalente formando o ânion superóxido ( $O_2^-$ ). 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, as peroxidases e a NADPH oxidase (Babior, 1999; Cai, 2005). 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  $O_2^-$  pela enzima superóxido dismutase (SOD). Ao final, o  $H_2O_2$  é convertido ao radical hidroxila (OH) ou se associa ao óxido nítrico formando o radical dióxido de nitrogênio ( $NO_2$ ) (Forman e Torres, 2001). Todos esses compostos promovem 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, e ainda, promovem defeitos na reparação do ácido desoxirribonucleico (ADN) por meio de sinais apoptóticos, lipoperoxidação das membranas, levando a célula à morte. Para evitar o efeito lesivo dos EROs, as células possuem um sistema antioxidante como a glutathiona reduzida (GSH), a catalase, a glutathiona peroxidase (GSH-Px) que detoxificam as espécies reativas antes que causem dano celular (Ferreira e Matsubara, 1997)

Na malária, o papel do  $H_2O_2$  é controverso. Estudos realizados com camundongos C57BL/10 infectados com *P. berghei* K173, suscetíveis à malária grave, demonstraram 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 suscetíveis A/J. Outros estudos indicam um efeito microbicida do  $H_2O_2$  sobre o *P. yoelli* (Ockenhouse e Shear, 1984; Dockrell e Playfair, 1983) e *P. falciparum* (Wozencraft e cols, 1984; Malhotra e cols, 1988).

Apesar do  $H_2O_2$  estar envolvido nos mecanismos microbicidas, Hermsen e cols (1997) demonstram que os EROs possuem um papel no desenvolvimento da malária cerebral em camundongos C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei* K173. Já em camundongos CBA infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA que também desenvolvem a malária cerebral, Sanni e cols (1999) não observaram alteração na produção de EROs.

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 e Nanda, 1999).

O óxido nítrico é uma espécie reativa de nitrogênio 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 (Brunet, 2001). Sua produção é mediada por membros da família óxido nítrico sintase (NOS) que convertem a L-arginina em L-citrulina. Três membros desta família foram identificados: NOS endotelial (eNOS ou NOS3), NOS neuronal (nNOS ou NOS1) e a NOS induzível (iNOS ou NOS2) (Stuehr, 1999). O óxido nítrico derivado da eNOS tem um papel importante na manutenção da homeostase, inibindo a ativação das células endoteliais, modulando a expressão de moléculas de adesão (CAMs) e a função plaquetária. Inibe a adesão, ativação e agregação de plaquetas tanto pela via cGMP dependente quanto pela via cGMP independente (Laroux e cols, 2000; Loscalzo, 2001).

No sistema imunitário, o óxido nítrico é um componente da resposta imune inata e sua produção nos fagócitos é mediada pela enzima iNOS (Nathan, 1992). Apesar da polêmica inicial sobre as múltiplas funções do iNOS de fagócitos humanos *versus* murinos, estudos têm constatado que regiões promotoras gênicas das duas enzimas são semelhantes (Chartrain e cols, 1994; Macmicking e cols, 1997). Além de sua função antimicrobiana, o óxido nítrico pode regular funções do sistema imunitário, incluindo a inibição da proliferação celular de células T e B, a adesão e rolamento de leucócitos no endotélio microvascular e a produção de citocinas (Bogdan, 2001; van der Veen, 2001).

Vários estudos tentam compreender o papel do NO na malária, entretanto ainda existem muitas controvérsias. Têm sido relatados seus efeitos benéficos na defesa antiparasitária, mas essa molécula parece estar implicada na patogenia 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, 1988; Taylor-Robinson, 1997; Taylor-Robinson e Looker, 1998; Taylor-Robinson e 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 e Abd-Allah, 1999).

## **1.5. Citocinas na malária cerebral**

O papel das citocinas na malária tem sido vastamente avaliado, contudo a contribuição de cada uma ainda é controversa, provavelmente porque os estudos as analisam de maneira isolada e com protocolos experimentais diferentes. Contudo, sabe-se que tanto as respostas T auxiliar 1 (Ta1) como a 2 (Ta2) são importantes para controlar a infecção e que o estabelecimento de um padrão inflamatório contribui para a gravidade da doença.

A variação antigênica plasmodial é em grande parte responsável por desencadear as respostas imunes específicas durante cada fase do ciclo biológico do plasmódio. Moléculas de superfície do merozoíto do plasmódio bem como os produtos liberados na lise dos eritrócitos infectados induzem nas células do hospedeiro a expressão de várias citocinas implicadas na patogênese da doença, como FNT- $\alpha$ , linfotóxina, interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina-12 (IL-12) (Cooke e cols, 2000; Miller e cols, 2002; Jamarillo e cols, 2003; Rasti e cols, 2004; Randall e cols, 2010).

A interleucina 12 é uma citocina importante tanto na imunidade celular quanto na resposta imune mediada por anticorpos na malária (Stevenson e cols, 1995; Malaguarnera e cols, 2002). Na malária humana, a concentração de IL-12 se correlacionou negativamente com a parasitemia em indivíduos infectados pelo *Plasmodium falciparum* (Luty e cols, 2000; Graig e cols, 2003). Adicionalmente, foi

demonstrado que a IL-12 estava aumentada em crianças com malária moderada e em menor quantidade com malária grave (Malaguarnera e cols, 2002). Em modelos murinos, a administração da IL-12 diminui a mortalidade e a parasitemia por induzir a produção de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e óxido nítrico (Stevenson e cols, 2001). Em camundongos C57BL/6, o nocauteamento do gene *Il12* dificultou o desenvolvimento de imunidade protetora contra os esporozoítos irradiados de *Plasmodium berghei* (Romero e cols, 2007). Provavelmente, a influência da IL-12 na imunidade contra os plasmódios está relacionada com a capacidade do seu receptor de ativar a sinalização intracelular via STAT/ERK, que é necessária para a produção de FNT- $\alpha$ , linfotóxina  $\alpha$  e  $\beta$  e IFN- $\gamma$  (Kondadasula e cols, 2008; Fauconnier e cols, 2012).

A ativação do macrófago pelo IFN- $\gamma$  produzido pelos linfócitos T auxiliares CD4<sup>+</sup> (T CD4<sup>+</sup>), principalmente em resposta aos antígenos plasmodiais (Grau e cols, 1986), proporciona uma maior produção do FNT- $\alpha$  por aumentar os níveis do ácido ribonucleico mensageiro (ARNm) desta citocina, além de aumentar a expressão dos receptores para o FNT- $\alpha$  na superfície das células alvo (Lou e cols, 2001). Tanto o FNT- $\alpha$  (Muniz-Junqueira e cols, 2001) quanto o IFN- $\gamma$  (Ângulo e Fresno, 2002) têm efeitos antiplasmodiais e estão associados com as formas benignas da malária. Entretanto, quando estas citocinas são produzidas em excesso, elas participam do processo de hiperativação endotelial associada à patogênese das formas graves da doença (Ângulo e Fresno, 2002; Muniz-Junqueira, 2007).

O papel do IFN- $\gamma$  na patogênese da malária murina foi estabelecido após a observação que o ARNm do IFN- $\gamma$  estava aumentado no cérebro de camundongos suscetíveis à forma cerebral e que o bloqueio do IFN- $\gamma$  com anticorpos ou o nocauteamento do gene *inf* protegeu camundongos C57BL/6 infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA contra o desenvolvimento da malária cerebral (Grau e cols, 1989; de Kossodo e Grau, 1993; Rudin e cols, 1997). Já em humanos, enquanto alguns estudos não associaram IFN- $\gamma$  plasmático à severidade ou às complicações da malária (Cabantous e cols, 2005), outros observaram níveis aumentados no soro de pacientes com *Plasmodium falciparum* (Ringwald e cols, 1991; Kojima e cols, 2004).

Adicionalmente, o FNT- $\alpha$ , a IL-1 e o IFN- $\gamma$  agem sinergicamente nos mecanismos que induzem a malária cerebral (Clark e cols, 1990a; de Kossodo e Grau, 1993; Rockett e cols, 1994). O aumento paralelo de FNT- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foi observado nos neurônios, células endoteliais, micróglia, astrócitos e monócitos



aderentes no córtex de crianças com malária e camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* (Medana e cols, 1997; Brown e cols, 1999b). Possivelmente, a IL-1 $\beta$  contribua localmente no cérebro para aumentar a adesividade de células e o infiltrado leucocitário perivascular, por promover a gliose, e ainda, por interferir na produção de neurotransmissores, neuropeptídios e segundos mensageiros, o que provoca alterações na condução elétrica, no crescimento e na diferenciação de neurônios (Hopkins e Rothwell, 1995; van Meir, 1995). Em contraste, o tratamento com IL-1 $\alpha$  diminuiu as alterações neurológicas em camundongos C57BL/6 infectados com o *P. berghei* K173 (Curfs e cols, 1990).

Já o papel do FNT- $\alpha$  tem sido largamente relacionado com os mecanismos imunopatológicos na malária humana e murina (Lucas e cols, 1997; May e cols, 2000; Gimenez e cols, 2003) devido a sua capacidade de induzir sua própria produção, além de estimular a síntese de outras citocinas pró-inflamatórias, ativar linfócitos T, estimular a expressão das moléculas do complexo de histocompatibilidade principal 1 e 2 (CPH1 e CPH2) em várias células e promover o extravasamento de leucócitos para o sítio de infecção (Goetz e cols, 2004). Na malária, o FNT- $\alpha$  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 nas vênulas e para a neurotoxicidade (Gimenez e cols, 2003).

O FNT- $\alpha$  representa o protótipo de uma superfamília de genes de moléculas ligantes que controlam as defesas do hospedeiro, inflamação, apoptose, autoimunidade e organogênese (Krönke e Adam-Klages, 2002; Randall e Engwerda, 2010). O FNT- $\alpha$  liga-se a dois tipos de receptores, e ambos (rFNT1/p55 e rFNT2/p75) são co-expressos na maioria das células, mas diferem em sua expressão espontânea e induzida. Tem sido demonstrado que o receptor 1 para FNT (rFNT1) tem uma função principal na defesa contra infecções por patógenos intracelulares (Lucas e cols, 1997). O FNT- $\alpha$  exerce sua função pela interação tanto com o rFNT1, que contém o domínio de morte, como com o receptor 2 para o FNT

(rFNT2), que não contém o domínio de morte. A linfotóxina interage com o rFNT-2 e com o rLT $\beta$  (Wajant e Scheurich, 2001; Randall e Engwerda, 2010).

Estudos em camundongos C57BL/6, suscetíveis à malária cerebral, nocauteados para os genes *rFNT 1*, *rFNT 2*, e *rLT $\beta$* , e infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA mostraram que somente os animais rFNT 2<sup>-/-</sup> foram significativamente protegidos da forma cerebral, enquanto os animais deficientes do rFNT1 foram tão suscetíveis à malária grave quanto os animais selvagens. Além disso, apesar de no camundongo C57BL/6 selvagem, o rFNT2 ter sido predominantemente expresso, a sinalização via receptor para linfotóxina- $\beta$  também é importante para o desenvolvimento da malária cerebral (Togbe e cols, 2008). Foi sugerido pelos autores que a proteção conferida pela ausência do rFNT2 deveu-se ao fato de não ter ocorrido aumento da expressão do ICAM-1 nos leucócitos, diminuindo desta maneira o sequestro na microvasculatura cerebral (Lucas e cols, 1997).

Das citocinas pró-inflamatórias, a IL-17, produzida principalmente por linfócitos T CD4 Ta17, está envolvida na indução de citocinas inflamatórias e quimiocinas. Poucos estudos retrataram seu papel na malária, contudo, recentemente, a IL-17 teve seu papel relacionado com a imunidade em indivíduos co-infectados com o *Plasmodium falciparum* e com a *Wulchereria bancrofti* (Metenou e cols, 2011) e em indivíduos com malária não complicada pelo *Plasmodium vivax* (Bueno e cols, 2012). Tanto na malária humana quanto na murina, pouco se conhece sobre suas ações, porém sua capacidade de estimular a produção de quimiocinas importantes para o recrutamento de neutrófilos e linfócitos T CD8+ para o tecido, a faz um importante alvo de estudo, já que estas células parecem estar envolvidas na suscetibilidade e resistência à forma cerebral (Campanella e cols, 2008; Miu e cols, 2008; Ouyang e cols, 2008; Van den Steen e cols, 2008). Por outro lado, estudos mostraram que na malária cerebral murina as alterações neurológicas ocorreram independentes da ação da IL-17 (Ishida e cols, 2010) e em crianças pré-escolares, a IL-17 não estava relacionada com a eliminação do *P. falciparum* (Noone e cols, 2013).

Na malária, a contribuição da resposta de linfócitos Ta2 parece estar relacionada com a remoção de parasitos durante as fases tardias da infecção primária, contudo o papel das citocinas anti-inflamatórias no controle da infecção malárica é menos claro do que o papel das respostas dos linfócitos do ramo Ta1. A ativação do ramo Ta2 resulta em produção de interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10). A capacidade de estimular a produção de anticorpos pelos linfócitos B em

infecções secundárias (Good e Doolan, 1999) chamou atenção para o papel da IL-4 nos mecanismos de eliminação dos plasmódios durante a doença. Porém, o nocauteamento do gene da IL-4 em camundongos infectados com os *Plasmodium chabaudi* e *Plasmodium berghei* ANKA não alterou a capacidade dos animais de controlarem a infecção parasitária (von der Weid e cols, 1994; Saeftel e cols, 2004) e ainda permitiu que camundongos BALB/c infectados com esporozoítos de *P. berghei* ANKA montassem um controle eficiente da infecção. Níveis aumentados de IL-10 também foram relacionados à ineficácia do controle da parasitemia e desencadeamento da anemia em crianças com o *P. falciparum* (May e cols, 2000; Huggoson e cols, 2004; Cabantous e cols, 2009; Boeuf e cols, 2012). Esse efeito foi atribuído às ações anti-inflamatórias da IL-4 e IL-10, que interferem na produção de IFN- $\gamma$  e FNT- $\alpha$ , citocinas importantes para a produção da molécula microbicida NO, para a mudança de classe de IgG1 para IgG3 que medeia a fagocitose do parasito e por diminuir a capacidade de monócitos reconhecerem os plasmódios opsonizados (Kumaratilake e Ferrante, 1992; Zhu e cols, 2006; Cabantous e cols, 2009)

Por outro lado, na malária cerebral, a IL-10 parece ter um papel protetor, uma vez que no início da infecção evitou o desenvolvimento da síndrome neurológica em camundongos C57BL/6 (Tan e cols, 2000) e sua neutralização promoveu o desenvolvimento da malária cerebral em camundongos BALB/c resistentes (de Kossodo e cols, 1997). Além disso, vários estudos com foco na IL-10 mostraram que esta citocina desempenha um papel importante no controle da resposta antiparasitária e no dano tecidual causado pela resposta inflamatória e que os polimorfismos nos seus genes se relacionam com as manifestações clínicas da malária (Freitas do Rosario e Langhorne, 2012; Zhang e cols, 2012).

## **1.6. Vias de sinalização intracitoplasmáticas**

Os fenômenos intracelulares que ocorrem após a ligação do FNT/LT aos seus receptores são complexos e ainda pouco entendidos na malária. Muitas proteínas que estão envolvidas nas vias de ativação de proliferação e morte programada celular interagem direta ou indiretamente com os domínios citoplasmáticos dos receptores rFNT1, rFNT2 e rLT $\beta$ , após ligação do FNT- $\alpha$  e da LT, mostrando que estes receptores estão conectados com a apoptose via caspases e com a cascata de sinalização que leva à ativação do NF- $\kappa$ B e JNK/MAPK (Wajant

e Scheurich, 2001; Randall e Engwerda, 2010).

A sinalização através dos receptores da superfamília do FNT- $\alpha$  ocorre por meio de duas classes de proteínas adaptadoras: os fatores associados ao receptor do FNT (TRAFs) e as moléculas com domínio de morte (DD). Sete membros da família TRAF estão envolvidos na transdução de sinal. Os TRAF 1 e 2 estão envolvidas na transdução do sinal do FNT- $\alpha$ , LT e IL-17 e o TRAF 6 está relacionado com a sinalização via receptor da IL-1 e de alguns membros dos receptores semelhantes ao TOLL. Estudos demonstram que o TRAF 1 em associação com o TRAF 2 e cIAP evita a apoptose mediada pelo FNT- $\alpha$ . O TRAF 2 tem um papel importante em mediar a sinalização estimulada por meio do rFNT1, ativando a via do NF- $\kappa$ B e JNK. Além disso, tem sido sugerido que o TRAF 2 é um ponto de integração entre os sinais anti e pró-apoptóticos. A sinalização pelo TRAF 1 raramente resulta em apoptose, mas pode estimular muitas vias que levam à ativação celular, diferenciação, mas também à apoptose (Chung e cols, 2002; Randall e Engwerda, 2010; Oeckinghaus e cols, 2011).

Entre as vias de ativação intracelular sinalizadas via TRAF estão aquelas que culminam na ativação do NF- $\kappa$ B, JNK e caspases (Krönke e Adam-Klages, 2002; Oeckinghaus e cols, 2011). Tanto os receptores para o FNT- $\alpha$  quanto para a linfotoxina e IL-1 $\beta$  podem ativar estas vias recrutando, em sua porção intracitoplasmática, diferentes proteínas adaptadoras, além dos TRAFs, como a FADD, TRADD, a NIK, RIP e cIAP. Acrescenta-se que as proteínas que se adaptam nas caudas intracitoplasmáticas podem interagir umas com as outras ativando mecanismos redundantes de sinalização e regulação (Basak e Hoffmann, 2008; Varfolomeev e Vucic, 2008; Shih e cols, 2011). Considerando que nas respostas antiplasmodiais existe uma multiplicidade de interações entre as citocinas, como o FNT- $\alpha$  e LT, e seus receptores rFNT e rLT, na membrana celular e os mecanismos intracelulares que potencialmente podem ser ativados após essa interação (Lucas e cols, 1997; Togbe e cols, 2008), é possível que a suscetibilidade ou não às formas graves da doença possa depender da via de ativação que é estimulada predominantemente; entretanto, estes aspectos ainda precisam ser esclarecidos na malária.

A resposta imune inata, principalmente a fagocitose, representa a primeira linha de defesa contra o plasmódio, seguida pela resposta adaptativa (Muniz-Junqueira e cols, 2001, 2005; Tosta e cols, 2005; Muniz-Junqueira e Tosta, 2009). O reconhecimento de microrganismos pelos receptores associados aos padrões

moleculares de patógenos (PAMP), que fazem parte da imunidade inata, induz a expressão de citocinas, as quais agem como mediadoras da inflamação, recrutando mais células fagocíticas responsáveis pela remoção dos patógenos. A produção destas citocinas inflamatórias é estimulada pela via do NF- $\kappa$ B.

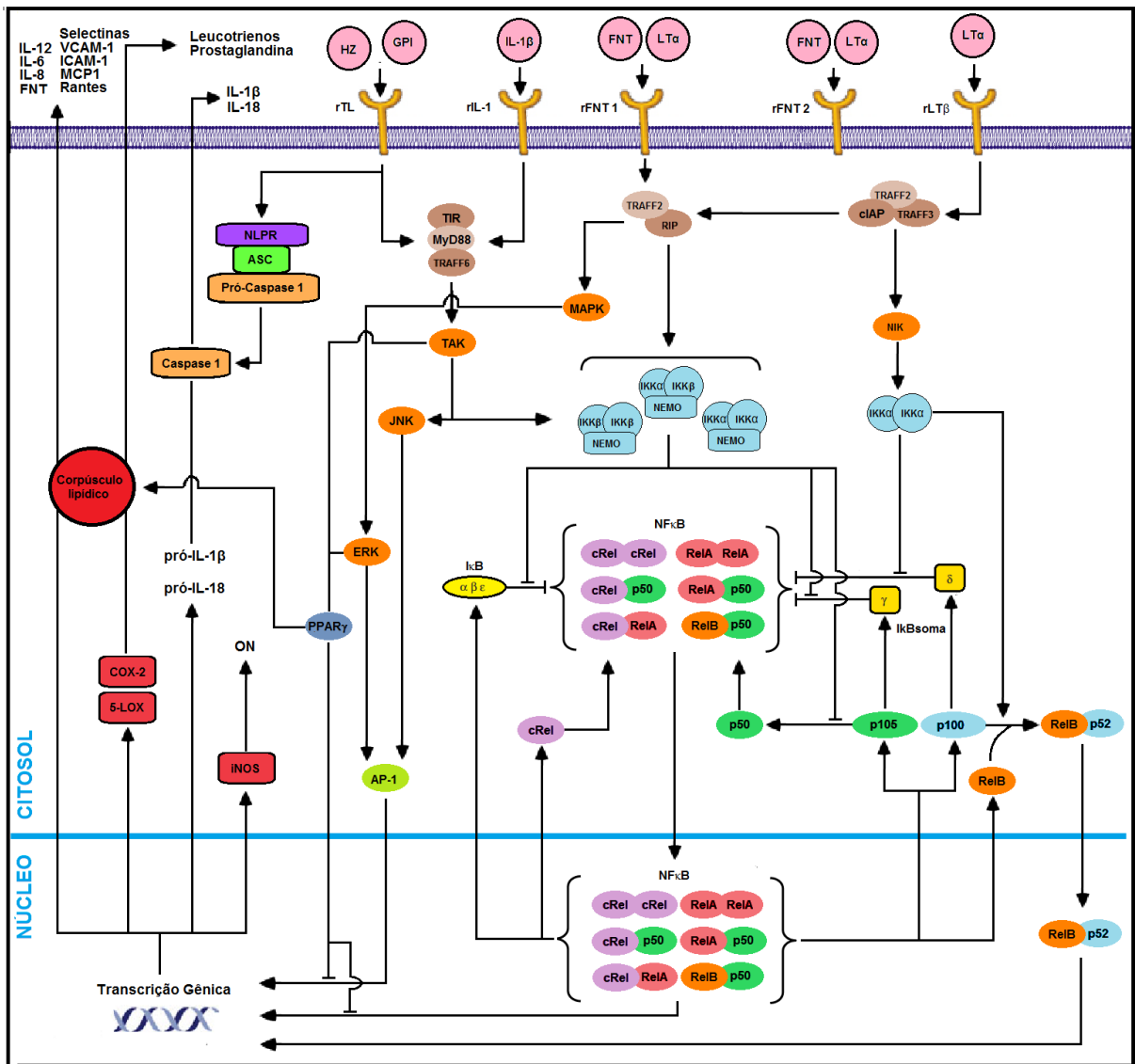
O fator nuclear (NF)- $\kappa$ B, seu inibidor (I $\kappa$ B) e a cinase do fator nuclear - $\kappa$ B (IKK) são formados por um conjunto de proteínas que se relacionam e que controlam a indução ou repressão da expressão gênica celular. Nos mamíferos existem cinco membros da família do NF- $\kappa$ B: 1) RelA (p65), 2) RelB (p68), 3) c-Rel, 4) NF- $\kappa$ B1 (p50/p105) e 5) NF- $\kappa$ B2 (p52/p100). Para que estes membros não transloquem para o núcleo ativando expressões gênicas desnecessárias, na maioria das células, os complexos NF- $\kappa$ B são retidos no citoplasma por uma família de proteínas inibitórias, as I $\kappa$ Bs. As I $\kappa$ Bs: I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$  e BCL-3 agem em parte mascarando a região nuclear de ligação dos promotores NF- $\kappa$ B, os mantendo represados no citoplasma. É a fosforilação destas proteínas inibitórias pelos complexos de cinases IKKs (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , IKK $\delta$  e NEMO) que degradam as I $\kappa$ Bs e permitem a translocação dos promotores para o núcleo (Perkins, 2007; Shih e cols, 2011).

A translocação para o núcleo dos fatores nucleares - $\kappa$ B só ocorre quando eles dimerizam no citoplasma celular. A combinação entre os diversos componentes dos NF- $\kappa$ B podem gerar até 15 dímeros, sendo o dímero RelA:p50 constitutivamente formado na maioria das células. Dos dímeros formados, o RelA:RelB, o RelB:RelB e o cRel:RelB não são capazes de ligar ao ácido desoxirribonucleico (ADN) e os dímeros p50:p50, p52:p52 e p50:p52 ligam ao ADN mas não possuem atividade transcricional. Contudo, a taxa de formação de dímeros é uma característica própria de cada célula e dependerá de estímulos extracelulares (O'Dea e Hoffmann, 2010). Entre os genes regulados pelos dímeros do NF- $\kappa$ B estão aqueles relacionados com a morte celular programada (BCL-2), com a adesão celular (ICAM, VCAM e selectinas), com a proliferação (p53, c-Myc, Ras), com a resposta imune inata e adaptativa (CPH 1 e 2 e citocinas), com a resposta oxidativa (iNOS, SOD e NADPH oxidase), com a inflamação e com o remodelamento tecidual (Karin e cols, 2002; Shehata, 2005).

Antígenos do plasmódio (Bate e cols, 1989) e particularmente a molécula glicofosfatidil inositol (GPI) induzem a transdução do sinal intracelular via NF- $\kappa$ B (figura 01) culminando com a produção das citocinas inflamatórias FNT- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-

6, na ativação da via da sintase do óxido nítrico e na expressão das moléculas de aderência ICAM-1 e VCAM-1 (Tachado e cols, 1996; Ramasamy, 1998; Tripathi e cols, 2009), todos envolvidos tanto na defesa antiplasmódio quanto na imunopatogenia da malária grave cerebral (Muniz-Junqueira e cols, 2001; Muniz-Junqueira, 2002; Silva, 2002; Muniz-Junqueira, 2007).

Vários estímulos que induzem a ativação da via do NF- $\kappa$ B, como citocinas (FNT- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6), a molécula GPI do plasmódio, a hemozoína, o óxido nítrico e os radicais de oxigênio (Garg e Aggarwal, 2002; Shehata, 2005; Morgan e Liu, 2011) encontram-se aumentadas na infecção grave pelo plasmódio (Muniz-Junqueira 2007; Clark e cols, 2008). Esta produção aumentada pode levar à ativação da via do NF- $\kappa$ B e terminar num processo de retroalimentação positiva, agravando ainda mais o processo, pois podem exacerbar a produção das mesmas moléculas que as induziram, e que estão envolvidas nos processos imunopatológicos da doença. Entretanto, os fatores envolvidos na ativação ou não da via do NF- $\kappa$ B ainda precisam ser esclarecidos na malária. Alguns estudos mostram que a modulação dessa via é um caminho importante na busca de um melhor tratamento das formas graves. Tem sido demonstrado que o tratamento com rosiglitazona e o curcumim, que modulam a resposta do hospedeiro ao plasmódio via NF- $\kappa$ B, melhora a sobrevivência em modelos experimentais de malária cerebral (Serghides e cols, 2009; Balachandar e Katyal, 2011; Mimche e cols, 2011; Serghides, 2012).



**Figura 01.** Vias de sinalização intracelular e seus produtos nos macrófagos. A via do NF- $\kappa$ B pode ser ativada por mecanismos diferentes oriundos tanto da ligação de citocinas como FNT- $\alpha$ , LT $\alpha$  e IL-1 $\beta$  aos seus receptores (rFNT, rLT $\beta$  e rIL-1) ou pela ligação de antígenos aos receptores TOLL (rTL). A via canônica do NF- $\kappa$ B inicia quando moléculas adaptadoras (TRADD, MyD88, TIR) e cinases (TAK e JNK) ativam o complexo IKK- $\alpha,\beta$  e NEMO que são capazes de liberar os fatores - $\kappa$ B dos seus inibidores I $\kappa$ B ( $\alpha,\beta$  ou  $\epsilon$ ), que posteriormente são degradados pelo proteossoma. Na via canônica do NF- $\kappa$ B são formados dímeros com os fatores RelA, cRel e p50. A via não canônica do NF- $\kappa$ B inicia após ativação da molécula NIK pelas proteínas adaptadoras TRAFF e cIAP. A NIK estimula a degradação da atividade cinase da p100 (IKK $\alpha$ :IKK $\alpha$ ) permitindo a formação da p52 que transloca ligada com o RelB. A ligação dos fatores nucleares às regiões - $\kappa$ B no ADN pode transcreever vários genes diferentes. Além disso, essa atividade nuclear pode ainda depender de co-fatores transcricionais como a AP-1 ou pode ser regulada por fatores como o PPAR- $\gamma$ .

As drogas rosiglitazona e curcumina são agonistas dos receptores de proliferação peroxissomal ativada (PPARs). Recentemente, vários estudos têm demonstrado que esses PPARs possuem importantes propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras, modulam o metabolismo de lipídios e de carboidratos e desempenham ações no desenvolvimento, diferenciação e apoptose celular, além de estar envolvidos na regeneração tecidual e neuroproteção (Chinetti e cols, 2001; 2003; Feng e cols, 2008; Wang, 2010). Os PPARs são receptores nucleares expressos em três isoformas: o PPAR- $\alpha$ , o PPAR- $\beta/\delta$  e o PPAR- $\gamma$  que se dimerizam com o receptor retinóide X (RXR). Ao translocar para o núcleo, o heterodímero PPAR/RXR liga-se em regiões gênicas formadas pela sequência repetida de AGGTCA separada por um ou dois nucleotídeos, conhecida como elemento de resposta do PPAR (PPREs) (Desvergne e Wahli, 1999). Todas as três isoformas desempenham diversas ações biológicas durante a resposta imune, como a inibição da produção de iNOS, das citocinas FNT- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e de enzimas formadoras de eicosanoides (Li e cols, 2000; Mendes e LaPointe, 2003; Welch e cols, 2003; Ye, 2008), que se encontram aumentados nas formas graves da malária. Assim, alguns estudos têm indicado um importante papel do PPAR- $\gamma$  na resistência (Bopp e cols, 2010) e no tratamento da malária cerebral (Boggild e cols, 2009; Balachandar e Katyal, 2011), contudo, pouco se conhece ainda sobre seus mecanismos de ação na doença.

## **1.7. Inflamassoma**

Outro mecanismo inato que tem sido implicado na resposta a vários microrganismos, principalmente bactérias e vírus, envolve a ativação da IL-1 $\beta$  pelo inflamassoma. Uma das consequências da ativação da resposta inata é a secreção de citocinas estimulada pela via do NF- $\kappa$ B, entre elas a IL-1 $\beta$ . Ao contrário de outras citocinas, a IL-1 $\beta$  é produzida em uma forma inativa, a pró-IL1 $\beta$  que necessita ser clivada enzimaticamente para ativação. Entre as várias enzimas que realizam este processo, a caspase 1 é a principal enzima que cliva o precursor da IL-1 $\beta$ , sendo este processo regulado na intimidade do inflamassoma, que é uma plataforma multiprotéica.

O inflamassoma é um complexo proteico formado por uma proteína com um domínio nucleotídico de ligação, rico em repetições de leucina (NLR), uma



molécula adaptadora associada a apoptose, uma proteína pequena que contém um domínio CARD (ASC) e a caspase 1. Os inflamassomas já descritos são: os inflamassomas ativados pelo AIM2, pelo RIG-1, pelo NLRP1, pelo NLRC4, pelo NIAP5 e pelo mais estudado, o NLRP3, que pertence à família dos NLR de receptores de patógenos, os PAMPs (Skeldon e Saleh, 2011; van de Veerdonk e cols, 2011; Walle e Lamkanfi, 2011).

Pouco se conhece sobre o envolvimento do inflamassoma nas infecções parasitárias. Na malária, seu papel é controverso, porém, poucos estudos foram realizados. Sugere-se que a hemozoína pode ser reconhecida pelo inflamassoma NLRP3 (Hanscheid e cols, 2007), e que, *in vitro*, ela induz a ativação da caspase-1 e a produção de IL-1 $\beta$  na dependência de ASC e das tirosinas cinases Syk e Lyn (Dostert e cols, 2009; Shio e cols, 2009). Contudo, Griffith e cols (2009) não obtiveram os mesmos resultados. Nos estudos *in vivo*, a produção de IL-1 $\beta$  parece não ser influenciada pelo inflamassoma, apesar de se observar um retardo no desenvolvimento da forma clínica cerebral em camundongos *nlrp3*<sup>-/-</sup> (Labbe e cols, 2010; Reimer e cols, 2010; Kordes e cols, 2011). Entretanto, poucos estudos compararam estas respostas em modelos murinos de malária com bases genéticas diferentes.

## 1.8. Corpúsculos lipídicos

Evidências mostram que os corpúsculos lipídicos são as principais organelas produtoras de eicosanoides e são chaves no processo de sinalização intracelular e nas células do processo inflamatório. Apesar de serem tipicamente encontrados em células normais de forma dispersa no citoplasma, seu aumento já foi descrito em neoplasias, aterosclerose, sepse bacteriana, síndrome da angústia respiratória aguda, artrite e infecções por micobactéria (Melo e Dvorak, 2012).

Nas infecções parasitárias, o aumento de corpúsculos lipídicos foi observado nos macrófagos peritoneais na infecção murina por *Leishmania amazonensis* (Pinheiro e cols, 2009), nos fibroblastos na toxoplasmose humana (Charron e cols, 2002), nos macrófagos peritoneais e cardíacos de camundongos e ratos infectados com o *Trypanosoma cruzi* (Melo e cols, 2003; D'ávila e cols, 2011) e em eosinófilos na esquistossomose murina (Magalhães e cols, 2010). Na malária, seu estudo se restringe a observações ultraestruturais em hepatócitos (Rodríguez-

Acosta e cols, 1998) e em células renais (Pulido-Méndez e cols, 2006) de camundongos infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA e em eritrócitos parasitados pelo *Plasmodium falciparum* (Palacpac e cols, 2004). Contudo, a interferência na formação dos corpúsculos lipídicos tem sido sugerida como um alvo para tratamento, uma vez que estão envolvidos na síntese de fosfolipídios e ácidos graxos importantes para o crescimento e proliferação dos plasmódios e também devido a sua capacidade de armazenar enzimas envolvidas nos processos inflamatórios observados na malária grave (Palacpac e cols, 2004).

No cérebro, a alteração do metabolismo lipídico parece estar associado à várias desordens e alterações neurológicas. Baixas concentrações de produtos lipídicos influenciam na biossíntese de neurotransmissores e o aumento da peroxidação lipídica se correlaciona a um mau prognóstico em várias doenças cerebrais (Harada e cols, 2007; Adibhatla e Hatcher, 2008). Na infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA, a alteração do metabolismo lipídico no cérebro se associou ao desenvolvimento da malária cerebral em camundongos C57BL/6 (Ghosh e cols, 2012).

Estruturalmente, os corpúsculos lipídicos são envolvidos por uma monocamada de fosfolipídios e seu núcleo central é rico em lipídeos neutros. Estudos proteômicos demonstraram que eles possuem e podem produzir proteínas envolvidas no metabolismo do colesterol e triglicerídeos, no transporte do araquidonato e dos ácidos graxos para membrana, além de estarem envolvidos na regulação e formação dos eicosanoides, no armazenamento de citocinas, como o FNT- $\alpha$ , e quimiocinas, como a Rantes, e na ativação das vias de sinalização intracelular (Bozza e Bandeira-Melo, 2005; Wan e cols, 2007; Bozza e cols, 2009).

## **1.9. Eicosanoides**

Outros mediadores importantes da inflamação são os eicosanoides que podem ser produzidos em resposta a citocinas inflamatórias, como o FNT- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  e a linfotóxina. Os eicosanoides são formados a partir da transformação do ácido araquidônico e medeiam processos celulares como a proliferação, apoptose, metabolismo e migração celular. Para a produção de eicosanoides, o diacilglicerol e os fosfolipídeos são hidrolisados a ácido araquidônico (AA) pelo PCL $\beta$  e PLA2, respectivamente. Em seguida, o AA é convertido em prostaglandina G2 (PGG<sub>2</sub>)

pelas cicloxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2) e em leucotrienos pela 5-lipoxigenase (5-LOX). A PGG<sub>2</sub> ainda pode ser convertida a PGH<sub>2</sub> pela peroxidase e a última em metabólitos finais: tromboxano, prostaciclina e prostaglandinas E<sub>2</sub>, F<sub>2</sub> e D<sub>2</sub>. Na via dos leucotrienos, a 5-lipoxigenase promove primeiro a formação do 15-HPETE e 5-HPETE que darão origem às lipoxinas (A e B) e aos leucotrienos (B<sub>4</sub> e E<sub>4</sub>), respectivamente (Bozza e cols, 2009).

Na malária, alguns estudos demonstraram que os eicosanoides podem influenciar a função de células e a evolução da doença. No estudo de Alves e cols (1992) foi observada redução na capacidade proliferativa de linfócitos T de indivíduos infectados com *P. falciparum* ou *P. vivax* quando em cultura com PGE<sub>2</sub>. Em outro estudo, camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA e tratados com aspirina apresentaram uma sobrevivência maior e, nesse mesmo estudo, a prostaglandina se mostrou protetora de malária cerebral, enquanto, os leucotrienos correlacionaram-se com a gravidade da doença (Xiao e cols, 1999). Já no estudo de Ball e cols (2004), a COX-1 é expressa no cérebro dos camundongos CBA e C57BL/6 quando infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA ou *P. berghei* K173, contudo, neste estudo, o aumento de COX-2 só foi deflagrado pelo *P. berghei* ANKA e ocorreu progressivamente durante a evolução da malária cerebral.

## **1.10. Modelos experimentais na malária**

A maioria do conhecimento sobre a imunopatologia da malária advém de estudos *post-mortem* ou de modelos experimentais. Porém, considerando as peculiaridades da fisiopatologia da malária em humanos, White e cols (2010) levantaram uma discussão a cerca das contribuições dos modelos murinos no entendimento da doença humana, gerando ceticismo na comunidade científica (Graig e cols, 2012). Um dos problemas centrais desta discussão versa sobre o uso do camundongo C57BL/6 infectado com o *Plasmodium berghei* ANKA como modelo de malária cerebral, uma vez que não ocorre ou ocorre minimamente sequestro de eritrócitos na microvasculatura cerebral deles, ao contrário do que ocorre em seres humanos, provavelmente devido a diferentes fenótipos de adesão (de Souza e Riley, 2002). Contudo, vários aspectos da doença são similares aos seres humanos (ver tabela 01). Uma melhor compreensão e uma análise comparativa das respostas entre os diversos modelos experimentais poderão contribuir para uma melhor

utilização dos modelos experimentais para o entendimento dos mecanismos imunopatogênicos da malária.

Os principais modelos utilizados para o estudo da malária cerebral são os camundongos singênicos das linhagens CBA e C57BL/6 infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA (Lou e cols, 2001). As duas linhagens apresentam alterações neurológicas, ataxia, paralisia muscular, convulsões, coma e morte, que também são observadas em seres humanos (Smith e cols, 1994). O modelo CBA possui haplótipo do CPH H-2<sup>k</sup> e morre com sinais neurológicos e baixa parasitemia em torno do 8º dia de infecção, já o camundongo C57BL/6 com haplótipo H-2<sup>b</sup> também apresenta a malária cerebral, mas desenvolve sinais neurológicos mais precocemente que os animais CBA. Além disso, assim como os seres humanos, os dois modelos apresentam alterações metabólicas e vasculares sistêmicas e no cérebro apresentam hemorragias focais, edema, obstrução e congestão vascular, alteração na condução elétrica neuronal, apoptose celular, quebra da barreira hemato-encefálica e aumento da pressão intracraniana (Pongponratn e cols, 2003; Muniz-Junqueira, 2007; Nacer e cols, 2012).

**Tabela 01:** Alterações patológicas já descritas na malária cerebral compartilhadas entre os seres humanos e o modelo murino

Alterações	Referências
Hemorragia cerebral	<p>Lou e col, 2001</p> <p>de Souza e cols, 2009</p> <p>Franke-Fayard e cols, 2010</p> <p>Grau e Graig, 2012</p>
Obstrução da microvasculatura	
Edema perivascular	
Necrose da microvasculatura	
Alteração e apoptose aumentada em astrócitos e neurônios	
Sequestro de eritrócitos parasitados (humanos: +++ e murino: ++)	
Sequestro de leucócitos (humanos: ++ e murino: +++)	
Sequestro de plaquetas	
Participação de fatores de coagulação, como o fator de von Willebrand	
Aumento de moléculas de aderência, como ICAM, VCAM, CD36	
Expressão aumentada do CPH 1 e 2	
Aumento de receptores para o FNT- $\alpha$	
Aumento de citocinas pró-inflamatórias, como FNT- $\alpha$ e IFN- $\gamma$	
Desenvolvimento de convulsões e coma	
Presença de alterações cognitivas e comportamentais	

Diferente dos modelos CBA e C57BL/6, o camundongo BALB/c possui haplótipo H-2<sup>d</sup> e na malária não desenvolve a síndrome neurológica, apesar de apresentar alterações também no tecido cerebral (Lacerda-Queiroz, 2007). Por outro lado, quando infectado com o *Plasmodium berghei* ANKA, o camundongo BALB/c morre em torno da 3<sup>a</sup> a 4<sup>a</sup> semana pós-infecção com anemia grave e com parasitemia alta (de Kossodo e Grau, 1993) (Tabela 02). A anemia nesses animais se desenvolve por mecanismos variados, mas a hemólise periférica causada pela multiplicação intraeritrocitária do parasito contribui em primeira instância para o desenvolvimento da patologia (Soni e cols, 2005). Além disso, a eritrofagocitose (Wickramasinghe e Abdalla, 2000), a eritropoiese ineficiente na medula (Mohan e Stevenson, 1999; Martiney e cols, 2000; Ekvall, 2003), o aumento da peroxidação lipídica da membrana eritrocitária (Das e cols, 1999) e a formação de anticorpos contra os eritrócitos (Helegbe e cols, 2009) são mecanismos importantes para o estabelecimento da anemia nesses animais e em humanos.

**Tabela 02:** Características e alterações observadas em diferentes camundongos (*Mus musculus*) infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA. Animais com idade entre 6 e 8 semanas de vida.

	BALB/c	CBA	C57BL/6	Referências
Haplótipo do CPH	H-2 <sup>d</sup>	H-2 <sup>k</sup>	H-2 <sup>b</sup>	<a href="http://www.informatics.jax.org/external/festing/mouse/STRAINS.shtml">http://www.informatics.jax.org/external/festing/mouse/STRAINS.shtml</a>
Início da morte	3 <sup>a</sup> a 4 <sup>a</sup> semana pós-infecção	7 a 14 dias após a infecção	6 a 9 dias após a infecção	Pierrot e cols, 2003 Grau e cols, 1987
Parasitemia no momento da morte	Alta	Baixa	Baixa	Pierrot e cols, 2003 Grau e cols, 1987
Síndrome neurológica	Resistente	Suscetível	Suscetível	Delahaye e cols, 2006 Bagot e cols, 2002 Oakley e cols, 2011
Incidência cumulativa de malária cerebral (%)	0	80 a 90	80	Carvalho e cols, 2000 Schmutzhard e cols, 2010
Sequestro microvascular (eritrócitos parasitados)	Mínimo	Presente	Presente	Di Baptista e cols, 2010 Lacerda-Queiroz, 2007
Sequestro microvascular (Leucócitos)	Mínimo	Presente	Presente	Chen e cols, 2000b Carvalho e cols, 2000 Lackner e cols, 2006 Lacerda-Queiroz e cols, 2010 Nacer e cols, 2012

**JUSTIFICATIVA**

Uma característica comum das formas graves da malária é a descontrolada ativação do sistema imunitário. Porém, as respostas clinicamente diferentes ao parasito sugerem que são múltiplos os mecanismos patogênicos que fazem com que um indivíduo produza citocinas de modo exacerbado e evolua para as formas graves da doença e morra e outros não. Além disso, os diversos perfis de produção de mediadores inflamatórios, de citocinas e de seus receptores na malária cerebral apresentada por crianças e adultos reforçam a hipótese de que o desenvolvimento da forma neurológica nos seres humanos também possa ser determinado por diversos mecanismos fisiopatológicos.

Considerando a hipótese que as formas graves da malária poderiam ser determinadas por processos inflamatórios distintos, geneticamente dependentes da ativação de vias diferentes do NF $\kappa$ B, do inflamassoma e do metabolismo lipídico, que em conjunto poderiam colaborar para o desenvolvimento das alterações neurológicas, é possível que estes mecanismos imunopatogênicos diferentes responsáveis pela forma cerebral da malária poderiam ser mais bem evidenciados pelo estudo de diferentes linhagens de camundongos suscetíveis à malária cerebral infectados pelo mesmo plasmódio.

Assim, uma maior compreensão das respostas à infecção entre os diferentes modelos da doença em animais suscetíveis ou resistentes à malária cerebral, poderia contribuir para a melhor utilização dos modelos experimentais murinos para o entendimento da malária grave no ser humano. Além disso, o entendimento dos mecanismos envolvidos na hiperativação do sistema imunitário em linhagens de camundongos que desenvolvem diferentes fenótipos da malária poderia dar subsídios para uma melhor compreensão dos mecanismos imunopatogênicos envolvidos nas formas graves da doença.

A avaliação dos aspectos funcionais do sistema imunitário relacionados com as alterações das vias moleculares que ocorrem na intimidade das células e a interação entre os produtos gerados na ativação dessas vias poderão ampliar o conhecimento de como os mecanismos patogênicos contribuem para os diferentes perfis patogênicos da malária. Consequentemente, isso possibilitará que estudos mais assertivos promovam indicações terapêuticas mais adequadas, no sentido de reduzir a gravidade das manifestações clínico-patológicas e melhorar o prognóstico dos pacientes.

## **OBJETIVOS**



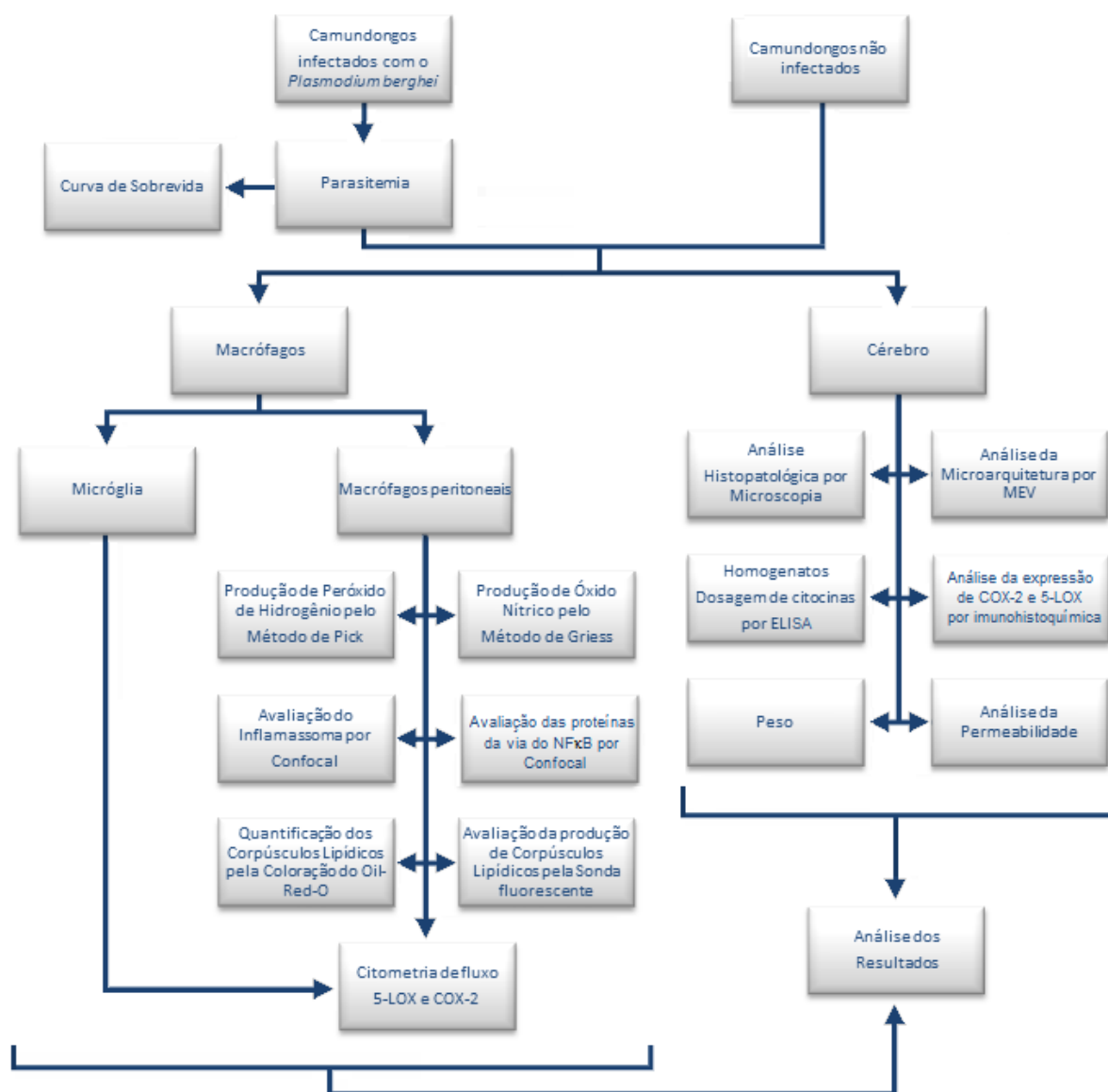
O objetivo do presente estudo foi esclarecer como as vias de ativação intracelulares se relacionam com a produção de componentes da resposta inflamatória na malária murina, utilizando modelos susceptíveis (CBA e C57BL6) ou não (BALB/c) à malária cerebral, infectados ou não com o *Plasmodium berghei* ANKA.

Para tal, foram realizadas as seguintes avaliações:

- 1) Análise nos macrófagos peritoneais das proteínas p52, RelA (p65) e RelB (p68) envolvidas na via de sinalização intracelular do NFκB;
- 2) Análise nos macrófagos peritoneais das proteínas ASC, NALPR1 e caspase 1 pertencentes ao inflamassoma;
- 3) Análise nos macrófagos peritoneais, na micróglia e no tecido cerebral das enzimas COX-2 e 5-LOX envolvidas na formação de eicosanoides;
- 4) Quantificação das citocinas pró-inflamatórias IL-12, FNT-α, IL-1β e IL-17 e anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 nos homogenatos do tecido cerebral;
- 5) Quantificação dos radicais de oxigênio e nitrogênio em macrófagos peritoneais;
- 6) Correlação entre a expressão das moléculas avaliadas com a histopatologia do tecido cerebral e as funções celulares dos macrófagos;
- 7) Correlação dos resultados encontrados com o intuito de estabelecer o perfil de resposta nos animais suscetíveis ou não à malária cerebral.

**METODOLOGIA**

## 4.1. Delineamento experimental



**Figura 02.** Fluxograma dos experimentos.

Este estudo é do tipo experimental e foi realizado comparando os achados em camundongos infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA de três linhagens diferentes – BALB/c, CBA e C57BL/6 – com seus controles não infectados e entre si. As linhagens foram escolhidas com base no tipo de evolução clínica da malária nestes modelos experimentais (item 4.2).

A coleta e os processamentos foram realizados sempre no sexto dia de infecção, momento no qual se iniciam os sinais neurológicos da doença nos camundongos C57BL/6 que evoluem para forma cerebral. Neste dia, as

parasitemias foram avaliadas para confirmar a infecção nos animais (item 4.4). Três outros grupos de animais, cada um de uma linhagem, foram acompanhados até sua morte espontânea para se estabelecer a curva de sobrevivência (item 4.5).

Do grupo de animais sacrificados no sexto dia da infecção foram coletados macrófagos por lavagem da cavidade peritoneal (item 4.6.2) para as seguintes avaliações: produção de óxido nítrico (item 4.6.4) e de peróxido de hidrogênio (item 4.6.5); formação de corpos lipídicos (item 4.6.7); ativação do inflamassoma pela análise das proteínas NALPR1, ASC e caspase 1, avaliação da via do NF $\kappa$ B pela análise das proteínas RelA (p65), RelB (p68) e p52 e análise da proteína PPAR- $\gamma$  (item 4.6.6). Além dos macrófagos peritoneais, a micróglia também foi coletada (item 4.6.1) para avaliar a quantidade intracelular de COX-2 e 5-LOX produzidas no sexto dia da infecção (item 4.6.8).

Para melhor esclarecer aspectos imunofisiopatogênicos da doença os cérebros foram obtidos no sexto dia da infecção e analisados imediatamente após a morte (item 4.7.1). Os cérebros foram processados para análise histopatológica clássica (item 4.7.3), para a expressão de COX-2 e 5-LOX por imunohistoquímica (item 4.7.4) e para análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (item 4.7.5). Os cérebros foram também coletados para preparação dos homogenatos (item 4.7.6) para dosagem de citocinas (item 4.7.7). Para avaliar a integridade do endotélio vascular foi realizado ainda teste de permeabilidade vascular utilizando o corante azul de Evans (item 4.7.8).

A maioria dos experimentos foi realizada no Laboratório de Imunologia Celular do departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Os cortes histopatológicos foram realizados no Laboratório de histologia e as análises imunohistopatológicas no Laboratório Patologia também do mesmo departamento. A captura de imagens foi feita em microscópio confocal, em microscópio eletrônico de varredura, e no microscópio Axiophot; as leituras por citometria de fluxo foram realizadas no Laboratório de Microscopia do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília; e a dosagem de citocinas foi realizada no Laboratório de Radicais Livres e Imunologia da Inflamação também do mesmo departamento.

OBS: Todas as marcas dos reagentes estão descritas no apêndice de reagentes.

## 4.2. Modelos experimentais e grupos de estudo

Para o estudo, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) das linhagens CBA, C57BL/6 e BALB/c, machos, de 8 a 10 semanas, infectados ou não com o *Plasmodium berghei* ANKA. As diferentes linhagens prototípicas de camundongos foram escolhidas em função do tipo de resposta imunológica. Estas diferenças sofrem influência do complexo principal de histocompatibilidade (CPH), sendo todos os animais singênicos dentro do seu grupo: o BALB/c possui haplótipo H-2<sup>d</sup> e na malária apresenta resistência à doença cerebral, mas desenvolve anemia grave e morre em torno da 3<sup>a</sup> semana pós-infecção com alta parasitemia; o modelo CBA possui haplótipo H-2<sup>k</sup> e morre com sinais neurológicos e baixa parasitemia em torno do 8<sup>o</sup> dia de infecção; o camundongo C57BL/6 com haplótipo H-2<sup>b</sup> também apresenta a malária cerebral, mas desenvolve sinais neurológicos um pouco mais cedo que os animais CBA.

Para minimizar o desconforto e a dor, os procedimentos adotados para o manejo, contenção e sacrifício dos animais, manutenção e permanência no biotério foram realizados seguindo as normas éticas para a pesquisa científica com animais de laboratório, conforme determinação da lei número 11.794, de 8 de outubro de 2008 (CFMVet), os princípios éticos para experimentação animal, definidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1990) e a Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO, 1978).

A eutanásia e a anestesia dos animais seguiram as sugestões da Resolução N° 714 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária e do protocolo modificado em 2003 do comitê de ética e cuidado com animais da Universidade de Newcastle que indica as drogas de preferência e regimes para anestesia e analgesia de animais (CEUA/IB). A eutanásia foi realizada em câmara de CO<sub>2</sub>, o que leva a uma morte rápida, indolor, sem, no entanto, interferir nos parâmetros hemodinâmicos ou hematológicos do animal.

Durante os experimentos, os animais foram mantidos em caixas em grupos de 2 a 4 animais dentro de uma estante ventilada. A maravalha e a ração foram esterilizadas e a água filtrada. O ciclo noite-dia foi monitorado. Os animais foram constantemente monitorados e nenhuma co-morbidade foi encontrada.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília – UnB (43050/2010). Os animais foram doados em parte pelo biotério do Laboratório de Ciências da Saúde – UniCEUB ou

foram obtidos da produção no Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB.

Para todos os procedimentos, os animais foram distribuídos nos seguintes grupos:

**- Grupos não infectados (controles do estudo):**

**Grupo BAL:** camundongos BALB/c não infectados

**Grupo CBA:** camundongos CBA não infectados

**Grupo C57:** camundongos C57BL/6 não infectados

**- Grupos infectados:**

**Grupo iBAL:** camundongos BALB/c infectados com  $10^6$  eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA.

**Grupo iCBA:** camundongos CBA infectados com  $10^6$  eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA.

**Grupo iC57:** camundongos C57BL/6 infectados com  $10^6$  eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA.

OBS: A quantidade de animais utilizada nos experimentos esta descrita em cada experimento e também se encontra nas tabelas no apêndice de tabelas

### **4.3. Inóculo**

A cepa do *Plasmodium berghei* ANKA, inicialmente mantida com solução preservadora de Alsevier em nitrogênio líquido, era descongelada e inoculada em camundongos Swiss. Quando a parasitemia estava acima de 10%, os animais eram sacrificados em CO<sub>2</sub> e o sangue retirado por punção cardíaca com auxílio de uma seringa de 1 mL molhada com heparina e novamente inoculado em outro animal Swiss. Esse procedimento era realizado mais duas vezes para garantir a virulência da cepa.

Após aquisição de virulência, 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. Para produzir a infecção malárica experimental, os animais eram infectados por via intraperitoneal com 200 µL de solução tamponada com fosfato, pH 7.2, 0,15 M (STF) estéril, contendo  $1 \times 10^6$  eritrócitos parasitadas com o *Plasmodium berghei* ANKA (Clark e cols, 1990; Neill e Hunt, 1992).

#### **4.4. Parasitemia**

Para comparar a evolução da parasitemia nos diferentes modelos, em 13 camundongos C57BL/6, 24 camundongos CBA e 21 camundongos BALB/c, uma pequena amostra de sangue total era retirada da ponta da cauda no terceiro, quinto e oitavo dia da infecção. O sangue total obtido era distendido em lâmina e corado com coloração hematológica panótica. A parasitemia era então determinada pela análise de 500 células, diferenciando nesse quantitativo os eritrócitos parasitados dos não parasitados. O número de eritrócitos parasitados de cada animal foi expresso em porcentagem.

A coloração panótica utilizada possui um conjunto de reagentes que propicia uma coloração rápida e diferencial dos elementos figurados do sangue. Seu reagente 1 possui uma solução alcoólica de ciclohexadienos a 0,1% que tem por função fixar as células sanguíneas às lâminas; o reagente 2 é uma solução de azobenzenosulfônico a 0,1% que é capaz de corar as organelas básicas das células; e o reagente 3 é composto de uma solução alcoólica de fenotiazinas a 0,1%, capaz de corar os estruturas ácidas.

Com o objetivo de confirmar a infecção pelo plasmódio nos animais estudados, a parasitemia também foi realizada no sexto dia da infecção em todos os animais infectados dos demais experimentos. Nesses animais o sangue para determinação da parasitemia era coletado por punção cardíaca.

## **4.5. Avaliação da sobrevida**

Para comparar a influência da infecção malárica entre as diferentes linhagens de camundongos, 10 camundongos CBA, 15 C57BL/6 e 20 BALB/c foram infectados com  $10^6$  eritrócitos parasitados pelo *P. berghei* ANKA. Os animais possuíam entre 8 a 12 semanas de vida. A avaliação foi realizada 3 vezes ao dia até a morte do último animal. O dia da morte espontânea de cada animal foi computado e a curva de sobrevida segundo Kaplan-Meyer foi construída para análise comparativa entre os grupos.

## **4.6. Procedimentos realizados com macrófagos**

### **4.6.1. Coleta e preparação da micróglia**

Para os procedimentos de quantificação da COX-2 e 5-LOX por citometria de fluxo, foi realizado um método para o isolamento da micróglia baseado no protocolo descrito por Moussauda e Draheimb (2010). Brevemente, o cérebro foi removido assepticamente do crânio e transferido para uma placa de vidro estéril onde ele foi lavado com STF, pH 7,2, 0,15 M, estéril e cortado com o auxílio de um bisturi em vários pedaços finos. Depois, o cérebro foi transferido para um tubo cônico de 15 mL contendo um meio de cultura enzimático preparado com RPMI 1640, pH 7,2, acrescido de HEPES 20mM, glutamina 2mM, 2,5 mg/dL de gentamicina, EDTA 0,5 mM, glicose 25 mM e 20 unidades/mL de papaína e o tecido foi deixado a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> em agitação constante. Depois de 90 minutos de incubação, o cérebro digerido foi transferido para outro tubo cônico e a reação enzimática foi bloqueada pela adição de 10 mL RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB).

Os tubos foram centrifugados a 200 g, a temperatura ambiente, por 7 minutos e o sedimento foi suspenso em 2 mL de RPMI 1640, pH 7,2 acrescido de 0,5 mg/ml de inibidor de protease (Complete Mini). Os tubos foram então incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Depois, os tecidos foram gentilmente triturados em uma seringa de 5 mL. Em seguida, o material triturado foi filtrado em uma membrana de 70 µM. A solução celular resultante foi centrifugada a 200 g, a temperatura ambiente, por 7 minutos e o sedimento foi suspenso em 7,5 mL de uma



solução isotônica de Percoll a 70% em HBSS. Esta suspensão foi cuidadosamente sobreposta por 7,5 mL de meio HBSS, pH 7,2 e centrifugada a 200 g por 20 minutos. Finalmente, o material interfásico foi descartado e o sedimento foi lavado uma vez com RPMI 1640, pH 7,2, acrescido de 10% SFB e 1 $\mu$ M de EDTA. As células obtidas foram quantificadas em hemocítmetro de Neubauer utilizando como solução diluidora o líquido de Türk. A viabilidade foi avaliada quantificando a porcentagem de células mortas e vivas utilizando solução de nigrosina 0,05%, e mostrou sempre  $\geq$  99% de células viáveis. Após a contagem, as células foram conservadas em paraformaldeído a 2% com 1 $\mu$ M de EDTA.

#### **4.6.2. Coleta e preparação dos macrófagos peritoneais**

Para avaliar a produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, a ativação do inflamassoma, a quantificação de corpos lipídicos e a expressão de COX-2 e 5-LOX foram utilizados macrófagos, coletados do peritônio no sexto dia da infecção dos animais infectados (iBAL, iCBA e iC57) e dos seus controles não infectados (BAL, CBA, C57). Todos os procedimentos de retirada, quantificação, preparação e cultura dos macrófagos foram realizados em ambiente estéril, com materiais limpos, esterilizados e descartáveis e reagentes estéreis.

Após o sacrifício, os animais recebiam um banho com álcool a 70% e, em seguida, a pele da parede abdominal era aberta e a cavidade peritoneal era exposta. Com auxílio de uma seringa de 10mL era inoculado na cavidade peritoneal 10mL de RPMI incompleto estéril, pH 7.2, com Hapes 20mM, glutamina 2mM e 2.5 mg/dL de gentamicina, pH 7.2. Após uma massagem delicada da cavidade peritoneal, o líquido era recuperado com auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro e colocado em tubo tipo Falcon de plástico de 15 mL. O tubo era centrifugado a 200g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e as células eram ressuspensas em 2mL de RPMI 1640 estéril, pH 7.2 a 4°C sem ou com 10% de soro fetal bovino a depender do procedimento. Em seguida, eram quantificadas em hemocítmetro de Neubauer utilizando como diluidor o líquido de Türk e a viabilidade era determinada pela porcentagem de células mortas e vivas utilizando solução de nigrosina 0,05%. A viabilidade foi sempre  $\geq$  96%.

#### **4.6.2.1. Preparação de células para a determinação de NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Os dois procedimentos foram realizados separadamente para cada animal. As células foram suspensas em RPMI 1640 sem acréscimo de soro fetal bovino e ajustada para  $1,5 \times 10^5$  células/200 $\mu$ L. Nestes experimentos foram utilizados 10 camundongos por grupo de estudo.

#### **4.6.2.2. Preparação de células para avaliação da COX-2 e 5-LOX**

Neste procedimento, tanto os macrófagos peritoneais quanto a micróglia tiveram um tratamento diferenciado após a centrifugação para evitar a aglutinação celular e degradação protéica. Para tal, foram acrescentados aos tubos, 2mL de RPMI 1640, pH 7.2 a 4°C com 10% de soro fetal bovino e 1 $\mu$ M EDTA. O tratamento foi realizado para cada animal separadamente e a quantidade de células foi ajustada  $2,5 \times 10^5$  células/200 $\mu$ L. Cada grupo de estudo continha 5 camundongos.

#### **4.6.2.3. Preparação de células para quantificação dos corpúsculos lipídicos pelo método de coloração de óleo vermelho (Oil-Red-O)**

As células foram suspensas em RPMI 1640 sem acréscimo de soro fetal bovino e ajustada para  $2,0 \times 10^5$  células/200 $\mu$ L. Nestes experimentos foram utilizados 10 camundongos por grupo de estudo.

#### **4.6.2.4. Preparação de Células para Avaliação do Inflamassoma, da via do NF $\kappa$ B, do PPAR- $\gamma$ e do Corpúsculo Lipídico**

Foi feito um pool das células de 5 animais para cada grupo estudado e depois centrifugadas e ressuspensas em 2 mL de RPMI 1640, pH 7,2, a 4°C, sem soro fetal bovino. Os pools foram ajustados para uma proporção de  $1 \times 10^6$  células peritoneais/500  $\mu$ L.

#### **4.6.3. Aderência dos macrófagos peritoneais às lamínulas**

O procedimento de aderência foi realizado como passo inicial dos experimentos de quantificação de NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, quantificação dos corpúsculos lipídicos e para a avaliação do inflamassoma, da via do NFκB e do PPAR-γ por microscopia confocal.

Nos procedimentos para determinação do NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as células eram colocadas para aderir em placas de cultura de fundo chato com 96 escavações (TPP – Zellkultur Testplate - Suíça), por 2 horas, a 37°C, em câmara úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, e após a lavagem das escavações por 3 vezes com STF estéril, a 37°C, cada protocolo específico era realizado.

Nos procedimentos para avaliação das proteínas do inflamassoma, do NFκB e da proteína PPAR-γ, assim como para quantificação de corpúsculos lipídicos, os fagócitos eram aderidos em lamínulas de 13 mm colocadas nas placas de cultura com 24 escavações, por 4 horas, a 37°C, em câmara úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, e após as escavações serem lavadas por 3 vezes com STF estéril, a 37°C os protocolos específicos eram realizados.

#### **4.6.4. Determinação do óxido nítrico**

O óxido nítrico é um radical livre inalterado que é produzido durante a conversão enzimática da L-arginina para L-citrulina por membros da família de proteínas óxido nítrico sintase (NOS), que se decompõem rapidamente em nitrito e nitrato. A produção do óxido nítrico (NO) pelos macrófagos foi avaliada pela quantificação do nitrito no sobrenadante das culturas por meio da reação de Griess (Green e cols, 1981). Após o procedimento de adesão descrito no item 4.6.3, os fagócitos aderidos eram incubados em triplicata por 24 horas em câmara úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, estimulados ou não com 10 ng/ml de lipopolissacarídeo (LPS) em um volume final de 200 μL de RPMI 1640, pH 7,2, a 37°, com 10% de soro fetal bovino e incubados por 24 horas, em câmara úmida em um ambiente de 5% de CO<sub>2</sub>.

A concentração de nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) era determinada no sobrenadante das culturas dos macrófagos peritoneais após 24 horas de incubação. Para tal, 100 μL do sobrenadante das culturas eram incubados com 100 μL do reagente de Griess (1-

N naftiletileno diamina dihidroclorido) a 0,1 %, sulfanilamida a 1% e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 25 %] e a reação era lida em espectrofotômetro de placa (Spectramax plus 384 - Molecular Devices), em 540 nm e os resultados foram expressos como  $\mu\text{M NO}_2$  (Muniz-Junqueira e cols, 2005).

A curva padrão para análise da produção de óxido nítrico foi elaborada a partir da diluição seriada do nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) nas diluições de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, respectivamente, 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$ , 6,25  $\mu\text{M}$ , 3,12  $\mu\text{M}$  e 1,56  $\mu\text{M}$ , com água destilada, sendo o padrão 0  $\mu\text{M}$  preparado somente com água destilada.

#### **4.6.5. Determinação do peróxido de hidrogênio**

A produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi avaliada pela microtécnica de oxidação do vermelho fenol na presença de peroxidase (Pick e Keisari, 1980). Após aderência dos macrófagos e lavagem para retirada das células não aderentes (item 4.6.3), as células eram incubadas, em triplicata, em câmara úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C por 60 min, em 140  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 5,5 mM de dextrose, 0,5 mM de vermelho de fenol (sal de sulfonftaleína de fenol) e 19 U/mL de peroxidase do tipo II RZ 1.3 (HRPO – *Amoracia rusticana* tipo II, sal contendo 148 purpurogalina/mg) (Vasconcelos, 2010). A reação era interrompida com 10  $\mu\text{L}$  NaOH 1N, em seguida a leitura era feita em espectrofotômetro de placa (SpectraMax plus 384 – Molecular Devices) em comprimento de onda de 620 nm, e expressa como em  $\mu\text{M H}_2\text{O}_2/1.5 \times 10^5$  macrófagos h<sup>-1</sup>.

Uma curva padrão para a determinação de peróxido de hidrogênio era acrescida na placa, sendo preparada a partir de uma solução estoque de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma) na concentração de 10 nM diluída seriadamente nas diluições de 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 e 1:6400, respectivamente, 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$ , 6,25  $\mu\text{M}$ , 3,12  $\mu\text{M}$  e 1,56  $\mu\text{M}$  de vermelho de fenol acrescido de peroxidase tipo II (19 U/mL). O padrão 0  $\mu\text{M}$  foi preparado com a mesma solução de vermelho de fenol, porém, sem peroxidase. A curva era distribuída em triplicata na placa de 96 escavações, logo após a última incubação dos macrófagos peritoneais e anteriormente ao acréscimo do hidróxido de sódio 1N.

#### **4.6.6. Imunomarcção das proteínas do inflamassoma e das proteínas da via do NFκB e do PPAR-γ**

A expressão das proteínas que compõem o complexo inflamassômico: NALPR1, ASC e Caspase 1; das proteínas do NFκB: p52, p65 (RelA) e p68 (RelB); e da proteína PPAR-γ foram analisadas no citoplasma e no núcleo dos macrófagos peritoneais. Para tal, após o passo de aderência e lavagem (item 4.6.3), as células eram fixadas em paraformaldeído a 4% por 10 minutos em temperatura ambiente e lavadas novamente 3 vezes em STF, pH 7,2, por 5 minutos cada. Em seguida, as células eram permeabilizadas com uma solução contendo 0,2 % de Triton X-100 em STF, pH 7,2, por 20 minutos e lavadas 3 vezes em STF, pH 7,2, por 5 minutos cada. Após esse procedimento, uma etapa de bloqueio era realizada utilizando uma solução de 400μL de STF com 2% de albumina bovina por 20 minutos e depois as células eram incubadas com o anticorpo primário diluído a 1:200 na solução de bloqueio, por 24 horas, a 4°C.

Terminado o período de incubação, as escavações eram lavadas 3 vezes em STF, pH 7,2, por 5 min e incubadas, no escuro, com o anticorpo secundário contra IgG de coelho acoplado ao ALEXA 546, diluído em STF, pH 7,2 por 1 h a temperatura ambiente e depois lavadas como descrito anteriormente (exceção para a caspase 1).

Após a lavagem, as células eram incubadas com 500 μL de DAPI (1/5000 em STF) por 5 minutos, lavadas e as lamínulas eram montadas sobre uma lâmina com uma camada fina de meio anti-*fading* (Prolong Gold) interposta entre elas. As imagens fluorescentes foram capturadas usando o microscópio confocal Leica SP5 e processadas pelo programa LAS AF versão 2.6.0 (Leica Microsystems). Os resultados foram expressos na forma de intensidade de fluorescência média do fluoróforo em 100 células.

##### **4.6.6.1. Ativação do inflamassoma**

Para avaliar esse mecanismo, as proteínas NALPR1, ASC e Caspase 1 foram analisadas no citoplasma dos macrófagos. O protocolo acima descrito foi aplicado integralmente para as proteínas NALPR1 e ASC. Já para avaliar a proteína caspase 1, a marcação com o segundo anticorpo não foi necessária, porque o

anticorpo primário já estava acoplado com o fluorocromo FITC. Os anticorpos utilizados eram policlonais purificados e produzidos em coelhos contra as proteínas NALPR1, ASC e caspase1.

#### **4.6.6.2. Avaliação da via do NF $\kappa$ B**

As proteínas p52 e RelB (p68), pertencentes a via não canônica do NF $\kappa$ B e a RelA (p65) da via canônica foram analisadas conforme o protocolo acima. Os anticorpos utilizados foram IgGs policlonais produzidos em coelhos contra as proteínas NF $\kappa$ B p65 , RelB e NF $\kappa$ B p52.

#### **4.6.6.3. Avaliação da proteína PPAR- $\gamma$**

Para avaliar esse receptor nuclear, o anticorpo utilizado foi um IgG policlonal produzido em coelhos contra as proteínas PPAR- $\gamma$ .

#### **4.6.7. Quantificação dos corpúsculos lipídicos**

Os corpos lipídicos são organelas dinâmicas que contém lipídios neutros circundados por uma monocamada de fosfolipídeos, colesterol e proteínas. A sua presença foi avaliada no citoplasma dos macrófagos por dois métodos: marcação com sonda fluorescente BODIPY e marcação citoquímica com óleo vermelho O (Oil-Red-O).

##### **4.6.7.1. Marcação com sonda fluorescente BODIPY**

Para avaliar a expressão dos corpos lipídicos com sonda fluorescente, após o procedimento de adesão e lavagem (item 4.6.3), as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 10 minutos em temperatura ambiente e lavadas novamente 3 vezes em STF, pH 7,2, por 5 minutos cada. Em seguida, as células

foram permeabilizadas em uma solução contendo 0,2 % de Triton X-100 em STF, pH 7,2, por 20 min e lavadas 3 vezes em STF, pH 7,2, por 5 min cada. Após esse procedimento, uma etapa de bloqueio foi realizada utilizando uma solução de 400 µL de STF com 2% de albumina bovina por 20 minutos e depois as células foram incubadas com uma diluição de 1/300 do fluoróforo lipofílico 4,4-difluoro-3a-4a-diazo-s-indaceno (Bodipy) em STF/BSA, que marca os lipídios presentes no interior dos corpúsculos. Esse fluoróforo foi incubado com as células por um período de 24 horas. Depois desse período as escavações foram lavadas 3 vezes com STF, pH 7,2, por 5 min cada. As células foram então incubadas com DAPI diluído 1/5000 em STF, pH 7,2, por 5 min, lavadas novamente e as lamínulas de 13 mm foram retiradas das escavações e montadas em lâminas sobre uma finíssima camada de solução anti-*fading* (ProLong Gold). As imagens fluorescentes foram capturadas por microscopia confocal no aparelho Leica SP5 e processadas pelo programa LAS AF versão 2.6.0 (Leica Microsystems). A análise das marcações foi avaliada considerando a intensidade de fluorescência média do fluoróforo.

#### **4.6.7.2. Marcação citoquímica com óleo vermelho (Oil-Red-O)**

Para quantificar os corpos lipídicos por esta técnica, foi utilizada a coloração com óleo vermelho (oil red), que é um corante com grande solubilidade para substâncias lipofílicas, e que se apresenta na cor vermelha no citoplasma dos macrófagos. Após o passo de adesão e lavagem (item 4.6.3), as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 30 minutos e lavadas 2 vezes com STF, pH 7,2 e uma vez com álcool isopropílico a 60%. Em seguida, as células foram coradas por 15 minutos com uma solução de óleo vermelho filtrada 3 vezes em filtro 0,22 µm e preparada no momento do uso a partir de uma solução estoque de 0,5% (2 partes da solução estoque para 3 partes de água destilada). O excesso de corante foi retirado e as escavações foram lavadas uma vez com 1 mL de álcool isopropílico a 60% e depois duas vezes com 1 mL de água destilada. Os núcleos celulares foram corados com hematoxilina de Mayer por 5 minutos, lavadas novamente com água destilada e as lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro uma fina camada de meio de montagem contendo 10 g de gelatina, 60 mL de água destilada, 70 mL de glicerol e 0,25 g de fenol.

O procedimento de coloração dos corpúsculos lipídicos com óleo vermelho foi realizado em duplicata para cada animal e cada lâmina foi analisada em um estudo cego por três avaliadores distintos. Por essa metodologia, os corpúsculos lipídicos se apresentam como estruturas circulares que se coram em vermelho no citoplasma dos macrófagos. Para cada lamínula contada foi calculada a média de contagem dos três analisadores e com esses resultados foram estabelecidas a quantidade média de corpúsculos dentro dos macrófagos (MCL), a porcentagem de macrófagos apresentando corpúsculos lipídicos no citoplasma (MØ%) e o índice corpuscular (IC) que é a expressão da MCL multiplicada pelo MØ%.

#### **4.6.8. Quantificação da ciclooxigenase-2 e da 5-lipoxigenase**

A quantificação da COX-2 e 5-LOX, enzimas importantes para a formação de eicosanoides, presente no citoplasma dos macrófagos peritoneais e da micróglia foi realizada por citometria de fluxo. As enzimas foram quantificadas em tubos diferentes. Os tubos contendo  $2,5 \times 10^5$  células foram suspensas em STF, pH 7,2, acrescido de 1% de albumina bovina (SAB) e  $1 \mu\text{M}$  de EDTA (STF/SAB) por 20 minutos. Em seguida, as células foram incubadas mais duas horas, a  $37^\circ\text{C}$  com  $0,5 \mu\text{L}$  de anticorpo policlonal IgG anti-F4/80 de camundongo produzido em coelho diluído em  $100 \mu\text{L}$  de STF/SAB. Terminado esse período, as células foram lavadas duas vezes por 5 minutos, a 200 g, em temperatura ambiente, com STF/SAB e permeabilizadas por 30 minutos com STF/SAB acrescido de 0,1% de Triton X-100 (STF/SAB/Triton). Após permeabilização, a lavagem foi realizada novamente duas vezes e as células foram incubadas mais duas horas à  $37^\circ\text{C}$  com anticorpo policlonal IgG anti-5-LOX ou anti-COX-2 produzidos em cabra e diluídos em  $100 \mu\text{L}$  de STF/SAB. Mais duas lavagens foram realizadas e as células foram então incubada por 1 hora no escuro e em temperatura ambiente com  $0,5 \mu\text{L}$  de anticorpos secundários específicos. Para marcar o anticorpo anti-F4/80 nas micróglia foi utilizado o anticorpo anti-IgG de coelho marcado com APC e no caso dos macrófagos peritoneais, foi utilizado o anticorpo anti-IgG de coelho marcado com FITC diluído em STF/SAB. Para marcar o COX-2 e o 5-LOX, foi utilizado o anticorpo anti-IgG de cabra marcado com PE diluído em  $100 \mu\text{L}$  de STF/SAB/Triton. Finalmente, as células foram lavadas mais duas vezes nas mesmas condições já



descritas e suspensas em STF, pH 7,2 para um volume final de 200  $\mu$ L. Na tabela 03 encontram-se resumidos os anticorpos utilizados.

Paralelamente, foram acrescentados ao experimento controles positivos, representados por células coletadas de camundongos C57BL/6 estimuladas com 10 ng/mL de LPS. Além desses, também foram acrescentadas ao experimento células incubadas somente com os anticorpos secundários. As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (Becton Dickinson Company, EUA) equipado com lasers de 488 nm e 633 nm. Os resultados foram analisados pelo programa FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, EUA). Brevemente, a população correspondente às células foi selecionada por meio de parâmetros de espalhamento (“Forward Scatter” e “Side Scatter”) e em seguida foram quantificadas a mediana de fluorescência e a porcentagem de células positivas para cada marcador.

**Tabela 03:** Utilização dos anticorpos primários e secundários conforme tipo celular e antígeno.

Antígeno de superfície		Antígeno intracelular	
Anticorpo primário	Anticorpo secundário	Anticorpo Primário	Anticorpo secundário
Coelho anti-F4/80	Anti-coelho-APC (micróglia) Anti-coelho-FITC (macrófagos peritoneais)	Cabra anti-5-LOX Cabra anti-COX-2	Anti-cabra-PE Anti-cabra-PE

#### 4.6.8.1. Padronização da quantidade de anticorpos

Para estabelecer a quantidade de anticorpos primários e secundários, foi preparado um pool com  $1 \times 10^6$  macrófagos peritoneais e outro com  $1 \times 10^6$  micróglia de 5 camundongos C57BL/6 não infectados e nesses foi aplicada a metodologia acima, considerando a quantidade sugerida pelo fornecedor.

#### 4.6.8.2. Teste de reação-cruzada

Uma vez ajustada a quantidade de anticorpos, também foi realizado um protocolo piloto para estabelecer se existiam reações cruzadas entre diferentes anticorpos primários e secundários. Esse protocolo também usou o mesmo tipo de

amostra utilizado para ajustar a quantidade de anticorpos e a mesma metodologia descrita para a citometria de fluxo. Assim, foram testadas as seguintes combinações:

- A) Anticorpo de coelho anti-F4/80 *versus* anticorpo anti-cabra-PE
- B) Anticorpo de cabra anti- 5-LOX *versus* anticorpo anti-coelho-APC
- C) Anticorpo de cabra anti- 5-LOX *versus* anticorpo anti-coelho-FITC
- D) Anticorpo de cabra anti-COX-2 *versus* anticorpo anti-coelho-APC
- E) Anticorpo de cabra anti-5-COX-2 *versus* anticorpo anti-coelho-FITC
- F) Células marcadas F4/80 e anti-cabra-PE *versus* anticorpo anti-coelho-APC
- G) Células marcadas F4/80 e anti-cabra-PE *versus* anticorpo anti-coelho-FITC

Por esse protocolo, não foram evidenciadas reações cruzadas entre anticorpos secundários e anticorpos primários utilizados.

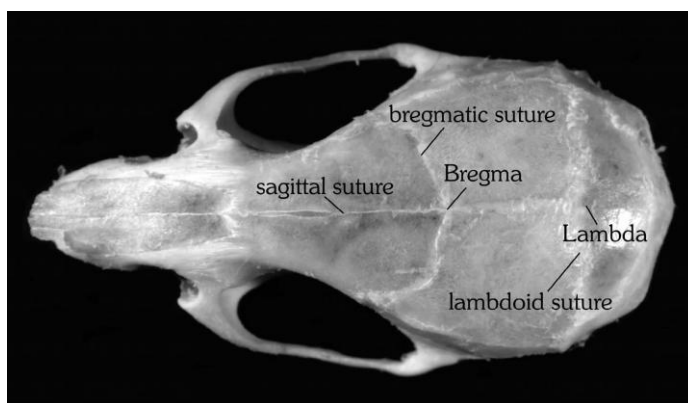
## **4.7. Procedimentos realizados nos cérebros**

### **4.7.1. Coleta, fixação e conservação dos cérebros**

Antes da coleta dos cérebros, os animais foram anestesiados com 150 mg/Kg de ketamina e 7,5 mg/Kg de xilazina e, em seguida, fez-se uma perfusão transcardíaca com 10 mL de STF a 4°C, pH 7,2, com 2% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído. Para tal, os animais foram fixados dorsalmente sobre uma placa de dissecação, lavados com álcool a 70% e a cavidade torácica foi exposta com auxílio de um bisturi. Duas agulhas de tamanho 25G acopladas a seringas de 10 mL foram inseridos cuidadosamente nos ventrículos direito e esquerdo. O líquido foi injetado lentamente pelo ventrículo esquerdo e retirado pelo direito na velocidade de aproximadamente 1mL/minuto.

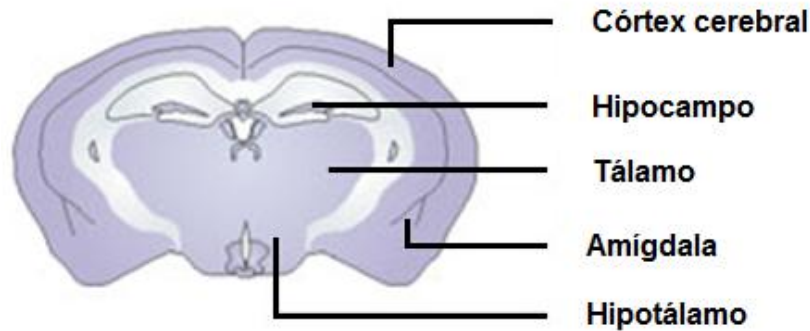
Para coletar os cérebros, logo após a perfusão, as cabeças dos grupos infectados e não infectados de cada linhagem foram decepadas aproximadamente na 4<sup>o</sup> vértebra cervical e toda a pele e musculatura foram dissecadas até exposição

da calota craniana. Com auxílio de um bisturi nº3, a calota foi aberta cuidadosamente iniciando pelo centro da sutura lambdóide seguindo até o final do eixo da sutura sagital, no sentido rostro-caudal, afastando os ossos lateralmente com auxílio de uma tentacânula (Figura 03). O cérebro e o cerebelo expostos foram retirados delicadamente em no máximo 5 minutos e lavados em STF, pH 7,2, a 4°C. O excesso de líquido foi retirado com um papel absorvente e os cérebros com seus cerebelos foram pesados.



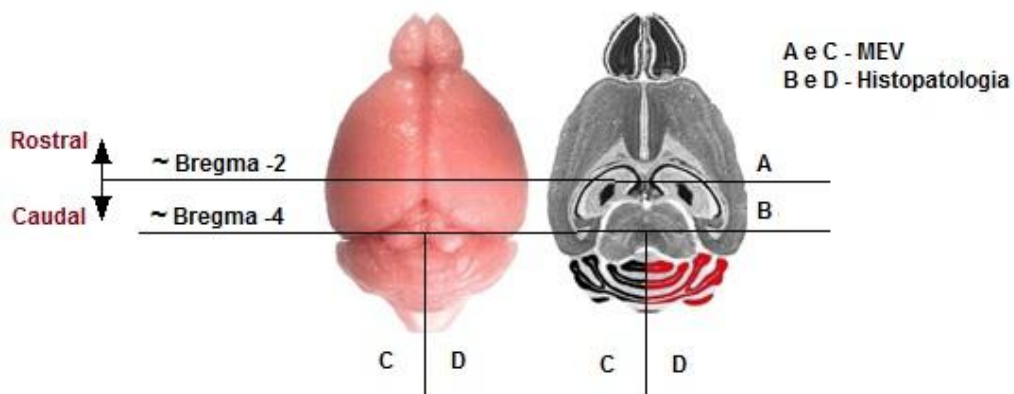
**Figura 03.** Superfície dorsal da calota cerebral, mostrando o plano horizontal com os pontos de referência para corte e dissecação. Fonte: Franklin e Paxinos, 2008.

Para realizar os procedimentos de histopatologia, imunohistoquímica e análise micro-anatômica por MEV, após a perfusão, foram coletados cérebros e cerebelos de um grupo com 5 animais infectados e outro com 5 animais não infectados para cada linhagem estudada. Os cortes foram orientados utilizando um atlas de coordenadas estereotáxicas descritas por Franklin e Paxinos (2008). Nesse protocolo, após a pesagem, os cérebros foram mantidos sobre uma placa de gelo coberta com papel alumínio, o que os manteve resfriados e foram cortados na posição coronal, em duas partes, aproximadamente na posição do bregma -2 e -4. Este local compreende, entre outras, a região hipocampal e regiões de córtex motor, visual e auditivo (figura 04).



**Figura 04.** Secção coronal mostrando as regiões estudadas. No cérebro dos camundongos, a região bregmática -2 e -4 compreende anatomicamente as regiões corticais, hipocampais, talâmicas, amígdalas e hipotálamo. Fonte da figura: Cryan e Holmes. Nature Reviews Drug Discovery 4: 775-790; 2005.

O cerebelo foi separado e também cortado em duas partes (Figura 05). O corte que compreende as regiões bregmáticas -2 e -4 foi utilizado para o procedimento histopatológico e para a imunohistoquímica e a parte adjacente ao corte da região bregmática -2 foi utilizada para o procedimento de MEV. O cerebelo foi cortado ao meio no sentido sagital (rostro-caudal) e o lado esquerdo foi utilizado para histopatologia e o direito para análise por MEV.



**Figura 05.** Esquema dos cortes. Cérebros: corte realizado aproximadamente na região bregmática -2 e -4. A face fontral (sentido rostral) foi separada para os procedimentos de MEV (A) e a face posterior adjacente (sentido caudal) para histopatologia (B). Cerebelo: corte realizado aproximadamente na região bregmática -4. Lado esquerdo foi separado para histopatologia (C) e o lado direito para MEV (D). Posições estereotóxicas baseadas no atlas de Franklin e Paxinos, 2008. Fonte: [<http://www.nervenet.org/papers/cerebellum2000.html>].

Os cortes destinados ao estudo histopatológico foram conservados submersos em paraformaldeído a 4% e os cortes destinados para análise por MEV foram fixadas em solução de Karnovsky, composta de glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2%, sacarose 3% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, por 2 dias depois mantidos pós-fixação em tampão cacodilato de sódio, 0,1M, pH 7,2.

#### **4.7.2. Silanização de lâminas**

A silanização é um procedimento necessário para que os cortes possam se fixar melhor às lâminas de vidro. Para tal, as lâminas foram distribuídas em suportes para coloração, lavadas com água da torneira e depois deixadas durante 24 horas em uma solução preparada com 246 mL de detergente neutro diluído em 5 litros de água destilada. Em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente por 30 min e lavadas com água destilada. Após este passo, os suportes com as lâminas foram mergulhadas 6 vezes em solução de álcool absoluto à 50% em água destilada. Para retirar o excesso de álcool, nova lavagem foi realizada por imersão em água destilada. As lâminas foram então deixadas por 30 min em ácido clorídrico à 1% e novamente imersas em água destilada para retirar o excesso do ácido. As lâminas foram secas em estufa a 60°C, durante 24 horas.

Após o período de secagem, as lâminas foram imersas em uma cuba contendo acetona e assim deixadas por 2 minutos. O excesso de líquido foi retirado em uma folha de papel e os suportes foram imersos por mais 2 minutos em uma segunda cuba contendo 30 mL de (3- aminopropyl) trilhoxysilane em 480 mL de acetona PA. O excesso foi desprezado. As lâminas foram imersas 4 vezes em mais duas cubas contendo acetona para retirar o excesso de silano e deixadas por 1 a 2 dias para secagem e mantidas em estoque em suas embalagens originais até o momento de uso.

#### **4.7.3. Análise histopatológica**

Para comparar a qualidade e a quantidade de alterações histopatológicas existentes entre os diferentes modelos de malária, após a pesagem, os cérebros e cerebelos foram fixados em paraformaldeído a 4% e desidratados seriadamente em

álcool etílico a 70%, 80%, 90% e três vezes em álcool a 100%, clarificadas por duas vezes em xilol e impregnadas em duas parafinas por uma hora em cada passagem. Em seguida, as peças foram incluídas em parafina líquida a 60°C e resfriadas para solidificar o molde.

Os cortes foram realizados em micrótomo e secções de 5 µm de espessura foram corados com hematoxilina-eosina. Para corar, as lâminas foram imersas em xilol por três vezes por 5 minutos cada vez e depois foram mergulhadas 10 vezes em álcool etílico a 100% por três vezes e em seguida sofreram 10 mergulhos em álcool a 90%, 80% e 70%. Depois, as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos, coradas com hematoxilina de Harris por 5 minutos e lavadas novamente em água corrente até retirar o excesso do corante. Após a lavagem, os cortes foram imersos 10 vezes em álcool a 80%, corados com eosina por 30 segundos, imersos 10 vezes por três vezes em álcool etílico a 100% e por três vezes em xilol por 5 minutos cada e finalmente montadas com meio de montagem em resina sintética (enthelan) e lamínulas sobrepostas.

Para a análise dos cortes histopatológicos, de cada lâmina foram capturadas imagens de duas secções histológicas com uma distância de aproximadamente 20 µm, utilizando o equipamento Aperio ScanScope®. Em cada imagem foram analisados entre 10 a 20 campos em regiões do córtex, do tálamo, do hipocampo e do cerebelo, utilizando o programa ImageScope version 11.2.0.780 (Aperio Technologies Inc, Vista, CA, USA). Nestes campos os parâmetros analisados foram: a presença de necrose parenquimatosa e neural, infiltrado inflamatório e micro-hemorragia. Em cada região, também foram avaliados microvasos com perímetros entre 30 a 80 µm, observando nesses a presença de congestão vascular, de obstrução vascular por leucócitos, aderência de eritrócitos e de leucócitos. Para homogeneização dos resultados, os dados foram apresentados em número percentual (%) do parâmetro avaliado em 1 mm<sup>2</sup> (%/mm<sup>2</sup>). Foram analisadas 5 animais de cada grupo de estudo.

#### **4.7.4. Imunohistoquímica**

Para avaliar a expressão de COX-2 e 5-LOX no cérebro, o procedimento foi realizado em cortes de 5µm que após serem depositados sobre lâminas previamente silanizadas foram desparafinizados em uma sequencia começando por

3 passagens de 1 a 2 minutos em xilol a 100%, depois 6 passagens em etanol absoluto e ao final 2 passagens em etanol a 95%. Em seguida, os cortes foram reidratados em 3 banhos de 1 minuto em água destilada.

Apesar do procedimento de parafinização e desparafinização ser importante para a conservação e fixação do tecido, esses métodos podem mascarar o epítipo antigênico por alterar sua conformação ou sua carga eletrostática o que interfere na capacidade química de ligação do anticorpo primário ao seu alvo. Por isso, uma etapa de recuperação antigênica foi realizada por imersão das lâminas em uma cuba dentro de um vaporizador contendo tampão citrato com 0,2% de *Tween* 20 previamente aquecido a 95°C. As lâminas foram deixadas por 20 minutos nessa solução e depois foram resfriadas em temperatura ambiente por 15 minutos. Ao final, as lâminas foram lavadas em água destilada em constante agitação.

Além da recuperação antigênica, um passo de bloqueio da peroxidase endógena foi realizado no tecido cerebral, pois, a atividade dessa enzima pode ocorrer normalmente em eritrócitos, granulócitos e sistema nervoso central o que provoca reação inespecífica no material. Por isso, essa atividade enzimática foi bloqueada em dois banhos com uma solução de 10% de peróxido de hidrogênio em água destilada de 15 minutos cada. Ao final, o excesso de solução de bloqueio da peroxidase foi retirado lavando as lâminas 3 vezes em água destilada.

Após os tratamentos anteriores, as lâminas foram lavadas exaustivamente com tampão TBS (TRIS pH 7,3 e cloreto de sódio diluído em água destilada) acrescido de *Tween* 20. O excesso de líquido foi retirado com o auxílio de um papel absorvente e então os cortes foram tratados com 50µL de anticorpos primários policlonais anti-COX-2 ou anti-5-LOX produzidos em cabra, diluídos na proporção de 1:100 em tampão TBS com 1% de SAB. As lâminas foram incubadas em uma cuba umidificada durante 24 horas à 4°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas exaustivamente com tampão TBS/*Tween* 20 e após retirar o excesso de líquido os cortes foram incubados com 50µL de anticorpo secundário anti-cabra biotinilado diluído 1:200 em tampão TBS/*Tween* 20 por uma hora à temperatura ambiente. Terminado o período de incubação, as lâminas foram lavadas novamente com o tampão TBS/*Tween* 20 e, o excesso de líquido foi retirado com auxílio de um papel absorvente.

Ao final dessas etapas, se houver antígeno no tecido, forma-se-á um imunocomplexo que contem antígeno-alvo + anticorpo primário + anticorpo secundário biotinilado. Para visualizar essa reação, então as lâminas foram

incubadas com uma solução comercial contendo estreptavidina-peroxidase em tampão TBS por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a revelação foi feita utilizando uma solução comercial contendo diaminobenzidina (DMB) e peróxido de hidrogênio em incubação com as lâminas durante 10 minutos. A estreptavidina se liga à biotina presente no anticorpo secundário e a peroxidase em uma reação de peroxidação reage com o peróxido de hidrogênio e o DMB formando em água e DMB oxidado que se precipita em uma cor acastanhada.

Após o procedimento de revelação, as lâminas foram lavadas por 3 vezes com água corrente evitando o jorro direto da água sobre os cortes, contracoradas com hematoxilina de Harris por 30 segundos, novamente lavadas em água corrente por 5 minutos e finalmente montadas com resina sintética (enthelan) e lamínulas.

Para quantificar a expressão de COX-2 e 5-LOX, 500 células no cérebro e 250 células no cerebelo foram avaliadas na área total da secção e o número de células positivas foi expresso em porcentagem. Adicionalmente, 30 vasos no cérebro e 15 vasos no cerebelo também foram avaliados adaptando o protocolo de Deininger e cols (2000) para nosso experimento (Tabela 04). As imagens foram capturadas com o equipamento Aperio ScanScope® e avaliadas no programa ImageScope version 11.2.0.780 (Aperio Technologies Inc, Vista, CA, USA).

**Tabela 04:** Padrão de avaliação para vasos no cérebro e cerebelo.

<b>Padrão</b>	<b>Achado</b>
0	Nenhuma marcação no endotélio ou dentro do vaso
1	Marcação positiva no endotélio do vaso
2	Marcação positiva no endotélio e em algumas células dentro do vaso
3	Marcação forte no endotélio e no interior dos vasos

#### **4.7.5. Análise micro-estrutural por microscopia eletrônica de varredura**

No intuito de correlacionar os achados histopatológicos com a estrutura morfológica do cérebro dos animais infectados e não infectados das linhagens suscetíveis ou não à malária cerebral, os cortes conservados em tampão cacodilato foram cortados em secções de 1 mm e processados para avaliação em microscopia de varredura. No dia do processamento, os cortes foram fixados em capela com tetróxido de ósmio 1% por 1 hora no escuro e em seguida lavados com tampão cacodilato por 15 minutos 2 vezes e uma vez com água destilada. As secções foram



então desidratadas com gradientes de acetona de 30%, 50%, 70%, 90% por 15 min cada e duas vezes com acetona 100% por 15 min. Seguiu-se uma secagem ao ponto crítico com CO<sub>2</sub> no equipamento Balzers CPD 030 *critical point dryer* e metalização com ouro no equipamento Balzer SCD050 sputter coater (Balzers Union - Liechtenstein) por 1 hora cada. Depois cada secção foi montada sobre uma fita de dupla face fixada à superfície lisa de um suporte de latão de dimensões 1x1 cm (stub) e analisadas em aparelho de microscopia eletrônica de varredura a laser JEOL JSM-7001F. Toda a superfície metalizada que compreendia as regiões corticais, hipocampal e talâmica foi analisada.

#### **4.7.6. Preparação de homogenatos**

Para avaliar a concentração de citocinas no tecido cerebral, o cérebro com o cerebelo foram retirados sem perfusão de grupos de 5 camundongos infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA ou de 5 camundongos não infectados. Após a coleta, cérebro com cerebelo foram lavados, pesados, cortados em pequenos pedaços com bisturi e depois em um cadinho contendo 4 mL de RPMI 1640, pH 7,2, acrescido de HEPES 20mM e glutamina 2mM, foram totalmente mascerados com auxílio de um pistilo. O lisado foi centrifugado por 20 minutos a 700 g e o sobrenadante obtido de cada amostra individual foi mantido a -20°C até a realização das determinações das citocinas.

#### **4.7.7. Determinação das citocinas cerebrais**

As citocinas IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-12, IL-10, IL-17 e FNT- $\alpha$  foram determinadas pelo método imunoenzimático (ELISA) de captura HRP nos homogenatos dos cérebros dos camundongos infectados ou não infectados. O método se baseia na reação antígeno-anticorpo e para todas as quantificações realizadas, a técnica possui o seguinte princípio: anticorpos de captura anti-citocina eram adsorvidos em uma placa de poliestireno de 96 escavações e a respectiva citocina presente nas amostras ligam-se especificamente ao anticorpo, sendo esta reação visualizada colorimetricamente, após adição de um segundo anticorpo anti-citocina marcado com biotina-avidina-HRP na presença do substrato tetrametilbenzidina.

Os procedimentos de ELISA foram realizados utilizando kits comerciais para IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 e FNT- $\alpha$  e o procedimento foi realizado em três etapas conforme o protocolo de utilização do fabricante. A primeira etapa foi realizada para adsorção dos anticorpos primários à placa de 96 escavações. Para cada citocina foi preparada uma placa. Nessa etapa, foram adicionados a cada escavação 100  $\mu$ L da solução do anticorpo de captura diluído 1:250 em STF, pH 7,2. A placa foi coberta com parafilme e mantida a 4°C por 24 horas em uma superfície plana.

Na segunda etapa, a placa que estava sendo mantida sob refrigeração foi lavada 3 vezes com 250  $\mu$ L de STF com 0,05% de Tween-20 (solução de lavagem). Em seguida, os sítios inespecíficos de cada escavação foram bloqueados com 100  $\mu$ L de STF, pH 7,2 com 1% de albumina bovina (tampão de bloqueio ou de amostra) por uma hora em temperatura ambiente. Após este período, 100  $\mu$ L das amostras e de cada calibrador da curva foram adicionadas às suas escavações específicas e novamente as placas foram incubadas por 24 horas a 4°C, cobertas com parafilme e em uma superfície plana. As amostras foram determinadas em monoplicata.

Para cada placa de citocina foi adicionada uma curva de calibração. As concentrações estão relacionadas na tabela 05 abaixo:

**Tabela 05:** Concentração dos calibradores em pg/mL para cada citocina.

Calibrador	IL-1 $\beta$	IL-4	IL-12	IL-10	FNT- $\alpha$	IL-17
01	1000	500	2000	4000	1000	500
02	500	250	1000	2000	500	250
03	250	125	500	1000	250	125
04	125	62,5	250	500	125	62,5
05	62,5	31,25	125	250	62,5	31,25
06	31,25	15,625	62,5	125	31,25	15,625
07	15,625	7,813	31,25	62,50	15,625	7,813

Terminado o período de 24 horas, iniciou-se a terceira etapa que se refere à revelação da reação. Nessa etapa, as escavações foram lavadas 3 vezes com 100  $\mu$ L de tampão de amostra. Em seguida, adicionou-se às escavações 100  $\mu$ L do anticorpo de detecção biotinilado ligado à streptavidina diluído 1:250 em tampão de amostra e as placas foram incubadas por uma hora em temperatura ambiente. Nova lavagem foi realizada nas mesmas condições anteriores e depois 100  $\mu$ L da solução de avidina-HRP foram adicionados às escavações. As placas foram incubadas no

escuro por 30 min em temperatura ambiente e depois nova lavagem foi realizada. Finalmente, 100 µL da solução de substrato com tetrametilbenzidina foram adicionados às escavações e após um período de 5 min no escuro foi acrescentado 50 µL de 1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> para bloquear a reação.

A reação colorimétrica foi lida em comprimento de onda 450 nm em espectrofotômetro de placa (Spectramax plus 384 - Molecular Devices, EUA) utilizando o programa SoftMax<sup>®</sup> Pro (Molecular Devices). A cor amarela formada é diretamente proporcional à quantidade de citocinas presente na amostra e as densidades ópticas foram multiplicadas por 4.

#### **4.7.8. Avaliação da permeabilidade vascular**

Para comparar a permeabilidade vascular cerebral entre os modelos CBA e C57BL/6 e BALB/c foi realizado a avaliação da integridade do endotélio vascular no cérebro dos animais infectados e não infectados pelo método de extração do azul de Evans adaptado do protocolo descrito por van der Heyde e cols (2001). O corante azul de Evans, quando injetado no sangue, se liga a proteínas plasmáticas, principalmente, a albumina. Quando ocorre alteração na integridade da parede endotelial vascular, o corante extravasa do lúmen vascular e se fixa no tecido intersticial.

Nesse método, os camundongos foram anestesiados com 150 mg/Kg de ketamina e 7,5 mg/kg de xilazina por via intraperitoneal e 200 µL de azul de Evans a 2% diluído em solução salina 0,9% foi injetado na veia caudal. Após uma hora, os camundongos eram eutanasiados e os cérebros juntamente com os cerebelos eram coletados (item 4.7.1), lavados em STF gelada, secados em papel absorvente e pesados. Em seguida, os cérebros com os cerebelos eram deixados em tubos com 1 mL de N,N-dimetilformamida por 48 horas para extração do azul de Evans. Após esse período, o líquido de extração era homogeneizado e 200 µL eram transferidos em triplicata para placas de 96 escavações.

A quantidade de azul de Evans extraída do tecido cerebral era lida em espectrofotômetro de placa (Spectramax plus 384 - Molecular Devices, EUA) em 630 nm e as absorbâncias foram tratadas utilizando o programa SoftMax<sup>®</sup> Pro (Molecular Devices). Uma curva de calibração foi acrescentada à placa nas concentrações de

20, 10, 5 e 0 µg/mL. Para uniformizar os resultados, esses foram divididos pelo peso dos cérebros e cerebelos.

Nesse experimento foram utilizados 5 animais nos grupos BAL, CBA, iCBA e C57 e 7 animais nos grupos iBAL e iC57.

#### **4.8. Análise estatística**

Os dados foram analisados previamente para normalidade das amostras pelos testes Kolmogorov-Smirnov e D'Agostino e Pearson. Segundo a normalidade e a variância das amostras, foram utilizados testes estatísticos paramétricos e/ou não paramétricos indicados segundo o número de grupos. Para dois grupos independentes foram aplicados o teste *t*-student para amostras com distribuição normal ou Mann-Whitney para aquelas que não tiveram distribuição normal. Quando as análises foram realizadas com mais de 2 grupos independentes foi utilizado o teste ANOVA para grupos com distribuição normal acompanhado do método Student-Newman-Keuls para comparação entre os grupos; ou Kruskal-Wallis, para as amostras que não tiveram distribuição normal seguido do método comparativo de Dunn.

Para comparar a evolução da infecção entre as linhagens de camundongos infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA foi feita uma curva de sobrevivência 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 5 para Windows (GraphPad Software – San Diego, EUA).

## **RESULTADOS**

## 5.1. Sobrevida de camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA

Para comparar a evolução da doença nas duas linhagens suscetíveis (CBA e C57BL/6) e na não suscetível (BALB/c) à forma cerebral da doença quando infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA, foi avaliada a sobrevida dos animais, dia a dia, pela manhã e pela noite.

Os animais do grupo C57BL/6 começaram a morrer mais precocemente, no sexto dia após a infecção, enquanto os animais CBA e BALB/c só começaram a morrer no oitavo dia. Neste dia (oitavo), 14,3% dos animais C57BL/6 já tinham morrido. No décimo sexto dia, 50% dos animais BALB/c ainda estavam vivos, enquanto todos os camundongos C57BL/6 já estavam mortos e ainda restavam 20% de camundongos CBA vivos ( $p=0,016$ , Logrank). Os camundongos BALB/c mostraram sobrevida maior do que os outros dois grupos (BALB/c x C57BL/6,  $p=0,003$  e BALB/c x CBA,  $p=0,025$ , Logrank). Entretanto, embora todos os camundongos C57BL/6 já estivessem mortos quatro dias antes dos camundongos CBA, não houve diferença estatística entre as curvas de mortalidade dos grupos C57BL/6 e CBA ( $p=0,207$ , Logrank) (Figura 06).

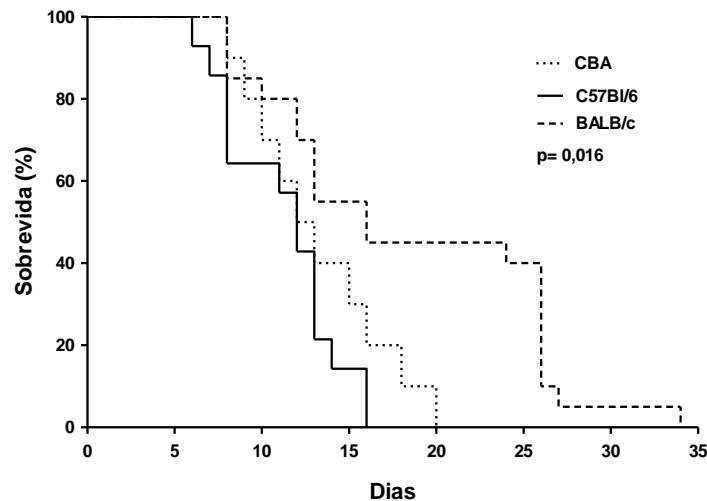
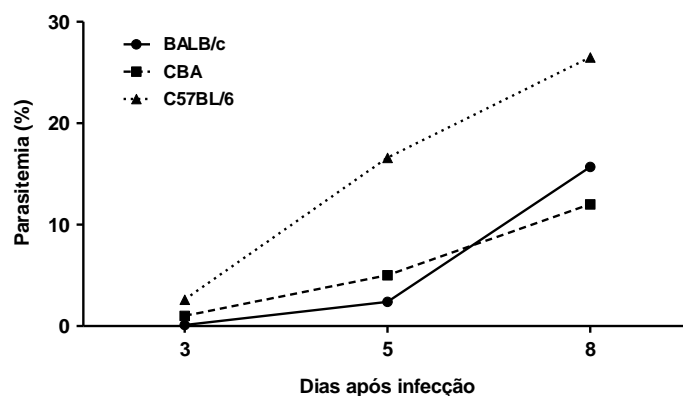


Figura 06. Curva de sobrevida de camundongos CBA, C57BL/6 e BALB/c infectados pelo *P. berghei* ANKA. Curva de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier e a diferença estatística avaliada pelo teste de Logrank (8,3;  $p=0,016$ ). Grupos com  $n=15$ .

## 5.2. Parasitemia

Para comparar a evolução da parasitemia nos modelos suscetíveis (CBA e C57BL/6) e não suscetível (BALB/c) à malária cerebral, uma alíquota do sangue total retirado da ponta da cauda foi distendida em uma lâmina, corado com panótico e analisados pelo método de Schilling ao microscópio óptico. A parasitemia foi determinada nos 3º, 5º e 8º dias após a infecção malárica pelo *Plasmodium berghei* ANKA.

Em todos os animais, a parasitemia aumentou ao longo do tempo, contudo, houve diferença de resultados entre os três modelos. O grupo de camundongos C57BL/6 foi o que apresentou a maior parasitemia ao longo do tempo, sendo que a mediana de sua parasitemia (2,6%) foi diferente da apresentada pelo grupo dos camundongos BALB/c (0,1%) já no terceiro dia de infecção ( $p=0,0005$ , Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn:  $iBAL < iCBA \sim iC57$ ; figura 07) e se manteve maior até o oitavo dia. A partir do quinto dia de infecção, a parasitemia mediana do grupo iC57 (16,6%) foi maior também do que a do grupo iCBA (5,0%) ( $p < 0,0001$ , ANOVA, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls:  $iC57 > iBAL$  e  $iCBA$ ). No terceiro dia, a parasitemia do grupo iCBA (mediana: 1,0%) também foi maior do que a do grupo iBAL, porém no quinto dia de infecção, as parasitemias destes dois grupos não foram estatisticamente diferentes, apesar do grupo iCBA ter apresentado praticamente o dobro de eritrócitos parasitados (iCBA: 5,0%) do que o grupo iBAL (iBAL: 2,4%). No oitavo dia, os camundongos C57BL/6 apresentaram a parasitemia 1,7 vezes maior (26,5%) do que os camundongos BALB/c (15,7%) e 2,2 vezes maior do que os camundongos CBA (12,0%) ( $p < 0,0001$ , ANOVA, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls:  $iBAL \sim iCBA > iC57$ ). Neste, mesmo dia, não houve diferença estatística entre as parasitemias dos grupos iBAL e iCBA, contudo, a parasitemia dos camundongos CBA foi relativamente menor do que a apresentada pelos camundongos BALB/c.



**Figura 07. Parasitemia dos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados pelo *P. berghei* ANKA.** Os camundongos suscetíveis à malária cerebral (C57BL/6: n=13 e CBA: n=24) apresentaram maior parasitemia do que os camundongos BALB/c (n=21) no terceiro dia de infecção ( $p=0,0005$ , Kruskal-Wallis, seguido do método de Dunn:  $iC57 > iBAL$  e  $iCBA > iBAL$ ). No quinto e no oitavo dia de infecção, o grupo  $iC57$  apresentou uma parasitemia maior do que os grupos  $iCBA$  e  $iBAL$  ( $p < 0,0001$ , ANOVA, seguido pelo método de Student-Neuman-Keuls:  $iC57 > iCBA$  e  $iBAL$ ). Valores apresentados como medianas.

### 5.3. Produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais dos camundongos suscetíveis (CBA e C57BL/6) ou não (BALB/c) à malária cerebral pelo *Plasmodium berghei* ANKA

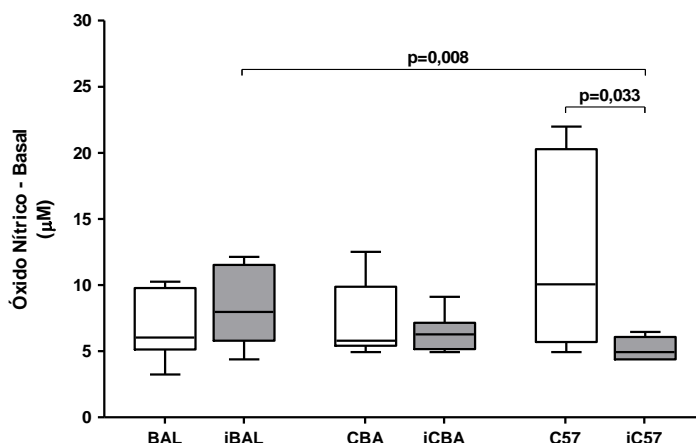
Para comparar a produção do NO nas diferentes linhagens de animais infectados ou não pelo *Plasmodium berghei* ANKA a produção deste radical foi quantificada, *in vitro*, pelo método de Griess, no sobrenadante das culturas de macrófagos peritoneais coletados no sexto dia da infecção, sendo a concentração expressa em  $\mu M NO_2$ .

Não houve nenhuma diferença estatística entre a produção basal de NO pelos macrófagos peritoneais das diferentes linhagens de camundongos antes da infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA (BALB/c =  $6,03 \mu M NO_2$ ; C57BL/6 =  $10,06 \mu M NO_2$  e CBA =  $5,80 \mu M NO_2$ ,  $p=0,296$ , Kruskal-Wallis; Figura 08). Contudo, no sexto dia da infecção pelo plasmódio, a produção de óxido nítrico foi diferente entre as linhagens. Os camundongos BALB/c apresentaram a maior produção de NO no sobrenadante das culturas dos macrófagos ( $7,97 \mu M NO_2$ ), enquanto, os camundongos C57BL/6 produziram a menor quantidade ( $4,94 \mu M NO_2$ ); Já o grupo de camundongos CBA infectados teve uma produção intermediária entre os dois ( $6,27 \mu M NO_2$ ) ( $p=0,007$ , ANOVA, seguido pelo método de Student Newman-Keuls para comparação entre os grupos:  $iC57 < iBAL$ ).

O efeito da infecção pelo *Plasmodium berghei* também foi analisada comparando a produção de NO pelos macrófagos dos animais infectados e não



infectados. Por essa análise, a resposta individual de cada linhagem se mostrou diferente. Enquanto, nos camundongos BALB/c houve aumento da produção de NO depois da infecção, nos camundongos C57BL/6 a produção do NO dos animais infectados foi menor do que dos animais não infectados que correspondiam ao seu grupo controle. A produção do grupo não infectado C57BL/6 ( $10,06 \mu\text{M NO}_2$ ) foi duas vezes maior do que a do grupo infectado ( $4,94 \mu\text{M NO}_2$ ) ( $p=0,033$ , teste  $t$  com correção de Welch).



**Figura 08. Produção do óxido nítrico basal, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados (BAL, C57 e CBA) e infectados com o *P. berghei* ANKA (iBAL, iC57 e iCBA).** Camundongos BALB/c e CBA: não houve diferença estatística na produção de NO entre os grupos de animais infectados e não infectados (teste  $t$ ). Camundongos C57BL/6: os animais não infectados produziram mais óxido nítrico do que os animais infectados (ANOVA, seguido pelo método de Student-Neuman-Keuls:  $iBAL > iC57$ ). Os dados estão representados em medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos. Os valores de  $p$  foram apresentados na figura. Grupos com  $n= 10$ .

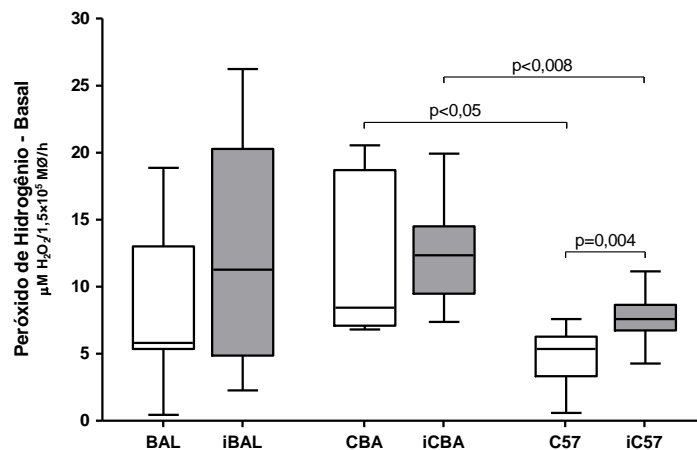
#### 5.4. Produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais dos camundongos suscetíveis (CBA e C57BL/6) ou não (BALB/c) à malária cerebral pelo *Plasmodium berghei* ANKA

Para comparar a produção do  $\text{H}_2\text{O}_2$  pelos macrófagos dos modelos murinos suscetíveis (CBA e C57BL/6) ou não (BALB/c) à malária cerebral, foram realizadas dosagens desse radical no sobrenadante das culturas de macrófagos peritoneais coletados no sexto dia de infecção, e os resultados foram comparados entre os grupos infectados e seu respectivo grupo controle, entre os grupos de infectados e entre os grupos não infectados (Figura 09).

Antes da infecção malárica, a capacidade de produzir peróxido de hidrogênio basal pelos macrófagos peritoneais foi diferente entre as diferentes linhagens de camundongos. Os dois modelos que desenvolvem a forma clínica

cerebral apresentaram produção diferente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os camundongos C57BL/6 do grupo controle produziram menor quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do que os outros grupos. Os camundongos C57BL/6 do grupo controle produziram significativamente menos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5,36 μM/1,5×10<sup>5</sup> MØ/h) do que os camundongos CBA (8,4 μM/1,5×10<sup>5</sup> MØ/h) (p=0,007; Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn: CBA>C57).

Em resposta à infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA, o mesmo padrão de produção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ser observado nas três linhagens, sendo que o C57BL/6 infectado manteve a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (7,6 μM/1,5×10<sup>5</sup> MØ/h) menor do que a dos camundongos CBA infectados (12,3 μM/1,5×10<sup>5</sup> MØ/h) (p=0,008; teste t com correção de Welch). Quando comparamos os animais infectados com seus controles, observamos que a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelos animais infectados (7,6 μM/1,5×10<sup>5</sup> MØ/h) foi significativamente maior do que os animais não infectados (5,3 μM/1,5×10<sup>5</sup> MØ/h) (p=0,033; teste t com correção pelo método de Welch).



**Figura 09. Produção de peróxido de hidrogênio basal, *in vitro*, pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados (BAL, C57 e CBA) e infectados com o *P. berghei* ANKA (iBAL, iC57 e iCBA).** Camundongos BALB/c e CBA: não houve diferença estatística na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre os grupos de animais infectados e não infectados (teste *t* e Mann-Whitney, respectivamente). Camundongos C57BL/6: os animais infectados apresentaram produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> maior do que os não infectados (teste *t*). A produção basal do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelos camundongos da linhagem C57BL/6 foi menor do que nos camundongos CBA, e esse padrão se manteve nos animais infectados. Os dados estão representados em medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos. Os valores de *p* foram apresentados na figura. Grupos com n=10.

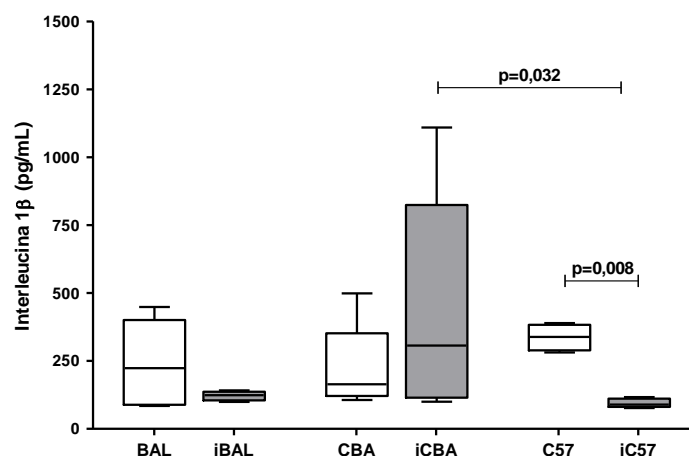
## 5.5. Citocinas

Para avaliar a influência da infecção pelo *P. berghei* ANKA sobre a produção de citocinas nos modelos murinos suscetíveis (CBA e C57BL/6) ou não suscetível (BALB/c) à malária cerebral, foram coletados cérebros com cerebelos após seis dias de infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA. O cérebro e cerebelo foram macerados juntos e após centrifugação, os homogenatos resultantes foram utilizados para a dosagem de IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 e FNT- $\alpha$ .

### 5.5.1. Determinação de interleucina-1 $\beta$ nos homogenatos dos cérebros e cerebelos de camundongos suscetíveis (CBA e C57BL/6) ou não (BALB/c) à malária cerebral na infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA

A quantificação da IL-1 $\beta$  nos homogenatos cerebrais mostrou que antes da infecção malárica, os animais das três linhagens produziram quantidade semelhante dessa citocina ( $p=0,336$ , Kruskal-Wallis), porém uma vez infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA, a produção tornou-se diferente entre os grupos ( $p=0,030$ , Kruskal-Wallis). O camundongo C57BL/6 foi a linhagem que produziu a menor quantidade de IL-1 $\beta$  (89,4 pg/mL), sendo esse resultado oposto aos animais CBA infectados (306,5 pg/mL), que também apresentam a forma cerebral da doença e que produziram a maior quantidade dessa citocina entre as 3 linhagens. Os camundongos BALB/c não suscetíveis à forma cerebral apresentaram produção intermediária (123,6 pg/mL) da citocina (Figura 10).

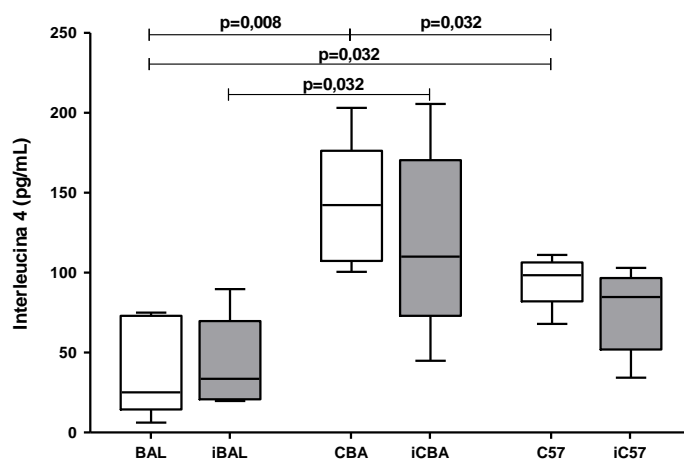
Quando os grupos infectados foram comparados aos seus grupos controle não infectados, observou-se que o padrão de produção da citocina foi diferente entre os animais que desenvolvem a forma neurológica. Enquanto, os camundongos C57BL/6 infectados diminuíram a produção dessa citocina em relação ao seu controle (C57= 338,7 pg/mL *versus* iC57= 89,4 pg/mL,  $p=0,008$ , Mann-Whitney), os camundongos CBA não alteraram a produção dessa citocina ( $p=0,690$ , Mann-Whitney). Nos camundongos BALB/c também não houve diferença entre os grupos infectados e não infectado ( $p=0,690$ , Mann-Whitney).



**Figura 10. Quantificação da Interleucina-1 $\beta$  no homogenato do cérebro e cerebelo de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados (BAL, C57 e CBA) e infectados com o *P. berghei* ANKA (iBAL, iC57 e iCBA) no sexto dia da infecção.** Camundongos BALB/c e CBA: não houve diferença estatística na produção de IL-1 $\beta$  entre os grupos de animais infectados e não infectados. Camundongos C57BL/6: os animais infectados apresentaram produção de IL-1 $\beta$  menor do que os não infectados. Entre os animais infectados, os camundongos CBA apresentaram uma produção maior da IL-1 $\beta$  do que os animais C57BL/6. Os dados estão representados em medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos. Os valores de p foram apresentados na figura. A comparação entre 2 grupos foi feita pelo teste de Mann-Whitney. Grupos com n=5.

### 5.5.2. Determinação de interleucina-4 nos homogenatos dos cérebros e cerebelos de camundongos suscetíveis (CBA e C57BL/6) ou não (BALB/c) à malária cerebral na infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA

O padrão de produção da IL-4 entre as diferentes linhagens de camundongos infectados ou não infectados foi diferente ( $p=0,005$ , Kruskal-Wallis). Observou-se que os camundongos CBA produziram 5,66 vezes mais IL-4 (142,3 pg/mL) do que os camundongos BALB/c (25,1 pg/mL;  $p=0,008$ , Mann-Whitney) e 1,45 vezes mais do que os camundongos C57BL/6 (98,4 pg/mL;  $p=0,032$ , Mann-Whitney). Já os camundongos BALB/c não infectados produziram 3,9 vezes menos IL-4 do que os camundongos C57BL/6 ( $p=0,032$ , Mann-Whitney). Assim, os camundongos CBA produziram a maior quantidade de IL-4, seguido pelo C57BL/6 e depois pelos camundongos BALB/c. Após a infecção pelo *Plasmodium berghei* esse padrão se manteve entre as linhagens (iBAL: 33,5 pg/mL, iC57: 84,8 pg/mL e iCBA: 110,1 pg/mL;  $p=0,032$ , Kruskal-Wallis). Contudo, após a infecção pelo plasmódio não houve modificação na produção dessa citocina em relação aos seus controles por nenhuma das linhagens ( $p>0,05$ , Mann-Whitney). Figura 11.



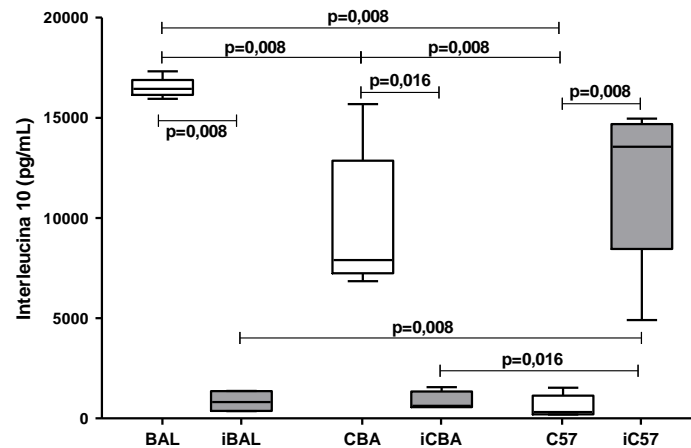
**Figura 11. Determinação de Interleucina-4 no homogenato do cérebro e cerebelo de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados (BAL, C57 e CBA) e infectados com o *P. berghei* ANKA (iBAL, iC57 e iCBA) no sexto dia após infecção.** Camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6: não houve diferença estatística na produção de IL-4 entre os grupos de animais infectados e não infectados. A quantidade da IL-4 variou entre as linhagens de camundongos não infectados (Kruskal-Wallis,  $p=0,005$ ; Segundo Dunn:  $BAL < C57 < CBA$ ;) e infectados (Kruskal-Wallis,  $p=0,032$ ; seguido do método de Dunn:  $iBAL < iCBA$ ). Os dados estão representados em medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos. Os valores de  $p$  foram apresentados na figura. Grupos com  $n=5$ .

### 5.5.3. Determinação de interleucina-10 nos homogenatos dos cérebros e cerebelos de camundongos suscetíveis (CBA e C57BL/6) ou não (BALB/c) à malária cerebral na infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA

O padrão de produção da IL-10 foi variável nas diferentes linhagens de camundongos antes e após a infecção. Antes da infecção, os camundongos BALB/c que são resistentes à malária cerebral produziram uma quantidade muito maior (16443 pg/mL) de IL-10 do que os camundongos suscetíveis (CBA= 7901 pg/mL e C57= 314 pg/mL;  $p=0,002$ , Kruskal-Wallis). Já quando os camundongos suscetíveis foram comparados entre si, a produção basal da citocina nos animais CBA foi 25,16 vezes maior do que nos camundongos C57BL/6 ( $p=0,009$ , Mann-Whitney). No sexto dia da infecção, houve alteração desse padrão no grupo de animais infectados ( $p=0,01$ , Kruskal-Wallis). Os camundongos C57BL/6 infectados passaram a produzir 21,79 vezes mais IL-10 (13.562 pg/mL) do que os camundongos CBA infectados (622 pg/mL;  $p=0,016$ , Mann-Whitney) e 16,58 vezes mais do que os camundongos BALB/c (818 pg/mL;  $p=0,009$ , Mann-Whitney).

Comparando os animais infectados com seus controles observamos que enquanto nos camundongos BALB/c e nos CBA a produção de IL-10 diminuiu no sexto dia de infecção nos animais infectados ( $p=0,008$  e  $p=0,016$ , respectivamente,

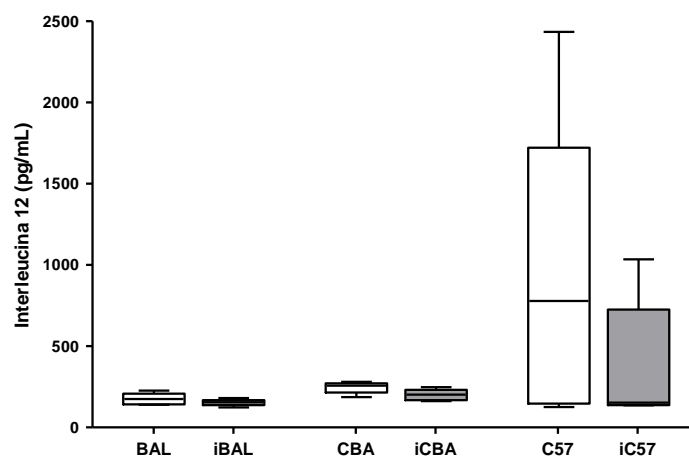
Mann-Whitney), nos animais C57BL/6, a infecção provocou um aumento na produção desta citocina no mesmo período ( $p=0,008$ , Mann-Whitney; Figura 12).



**Figura 12.** Determinação de Interleucina-10 no homogenato do cérebro e cerebelo de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados (BAL, C57 e CBA) e infectados com o *P. berghei* ANKA (iBAL, iC57 e iCBA) no sexto dia após a infecção. Camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6: houve diferença estatística na produção de IL-10 entre os grupos de animais infectados e não infectados (Mann-Whitney, BAL>iBAL:  $p=0,008$ , CBA>iCBA : $p=0,016$  e C57<iC57:  $p=0,008$ ). A quantidade da IL-10 variou entre as linhagens de camundongos não infectados (Kruskal-Wallis,  $p=0,002$ ; seguido pelo método de Dunn: BAL>CBA>C57) e infectados (Kruskal-Wallis,  $p=0,011$ ; seguido pelo método de Dunn: iBAL=iCBA<iC57). Os dados estão representados em medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos. Os valores de p foram apresentados na figura. Grupos com  $n=5$ .

#### 5.5.4. Determinação de interleucina-12 nos homogenatos dos cérebros e cerebelos de camundongos suscetíveis (CBA e C57BL/6) ou não (BALB/c) à malária cerebral na infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA

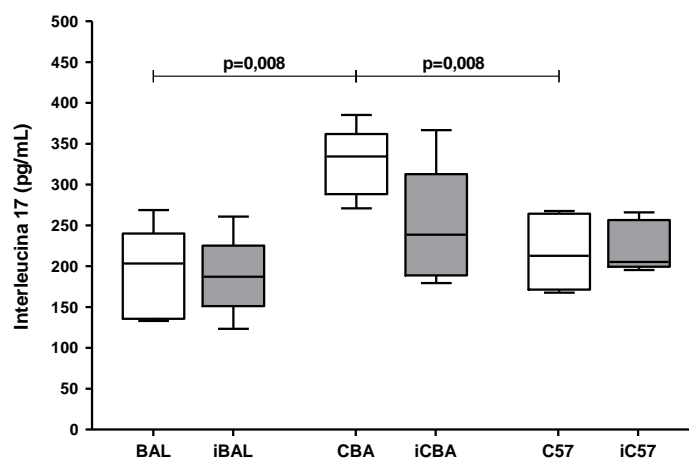
Nas diferentes linhagens, a produção da IL-12 foi semelhante entre os animais não infectados ( $p=0,218$ , Kruskal-Wallis) e entre os animais infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA ( $p=0,184$ , Kruskal-Wallis). Após a infecção, não foi observada alteração na quantidade de citocina nos homogenatos do tecido cerebral, avaliada no sexto dia da infecção malárica (BAL x iBAL:  $p=0,218$ ; CBA x iCBA:  $p=0,095$  e C57 x iC57:  $p=0,548$ , Mann-Whitney; Figura 13).



**Figura 13. Determinação de Interleucina-12 no homogenato do cérebro e cerebelo de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados (BAL, C57 e CBA) e infectados com o *P. berghei* ANKA (iBAL, iC57 e iCBA) no sexto dia da infecção.** Não houve diferença estatística entre os grupos não infectados e infectados (Mann-Whitney e Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ). Os dados estão representados em medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos. Grupos com  $n=5$ .

### **5.5.5. Determinação de interleucina-17 nos homogenatos dos cérebros e cerebelos de camundongos suscetíveis (CBA e C57BL/6) ou não (BALB/c) à malária cerebral na infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA**

A mediana da produção basal da IL-17 nos homogenatos do tecido cerebral dos camundongos C57BL/6 não infectados foi de 212 pg/mL, semelhante ao dos camundongos BALB/c (203 pg/mL;  $p=0,548$ , Mann-Whitney), enquanto a mediana da IL-17 presente no cérebro dos camundongos CBA foi de 334 pg/mL, significativamente maior do que os camundongos C57BL/6 ( $p=0,008$ , Mann-Whitney) e do que os camundongos BALB/c ( $p=0,008$ , Mann-Whitney). Contudo, quando os animais foram infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA, não houve diferença estatística entre os grupos ( $p=0,184$ , Kruskal-Wallis; Figura 14).



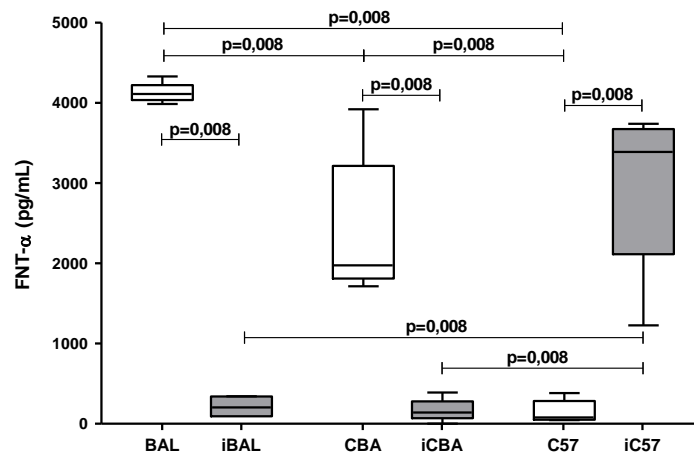
**Figura 14. Determinação de Interleucina-17 no homogenato do cérebro e cerebelo de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados (BAL, C57 e CBA) e infectados com o *P. berghei* ANKA (iBAL, iC57 e iCBA) no sexto dia após infecção.** Não houve diferença estatística na quantidade de IL-17 entre os grupos não infectados e infectados (Mann-Whitney, BAL x iBAL:  $p=0,690$ , CBA x iCBA:  $p=0,095$  e C57 x iC57:  $p=1,000$ ). A produção basal de IL-17 foi maior pelos camundongos CBA (Kruskal-Wallis,  $p=0,008$ ; seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos: BAL=C57<CBA). Os dados estão representados em medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos. Os valores de p foram apresentados na figura. Grupos com  $n=5$ .

### 5.5.6. Determinação de fator de necrose tumoral nos homogenatos dos cérebros e cerebelos de camundongos suscetíveis (CBA e C57BL/6) ou não (BALB/c) à malária cerebral na infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA

O padrão de produção basal do FNT- $\alpha$  foi diferente nas linhagens de camundongos não infectados ( $p=0,002$ , Kruskal-Wallis). Os camundongos BALB/c produziram mais FNT- $\alpha$  (4111pg/mL) do que as linhagens que apresentam a malária cerebral, sendo essa quantidade 2,08 vezes maior do que a dos camundongos CBA (1975 pg/mL;  $p=0,008$ , Mann-Whitney) e 52 vezes maior do que a dos camundongos C57BL/6 (79 pg/mL;  $p=0,008$ , Mann-Whitney). Contudo, a infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA modificou esse padrão de produção ( $p=0,009$ , Kruskal-Wallis). Em resposta à infecção, a quantidade de FNT- $\alpha$  no cérebro dos camundongos C57BL/6 (3390 pg/mL) foi significativamente maior do que no cérebro dos animais não infectados (79 pg/mL) ( $p=0,008$ , Mann-Whitney); e foi também maior do que no cérebro dos camundongos CBA (141 pg/mL;  $p=0,008$ , Mann-Whitney) e dos camundongos BALB/c infectados (204 pg/mL;  $p=0,009$ , Mann-Whitney). A produção do FNT- $\alpha$  pelos camundongos infectados das linhagens CBA e BALB/c foi semelhante ( $p=0,841$ , Mann-Whitney) e, ao contrário do que observado nos camundongos C57BL/6, houve menor produção de FNT- $\alpha$  no sexto dia da infecção



nos cérebros dos animais dessas linhagens (BAL x iBAL e CBA x iCBA:  $p=0,008$ , Mann-Whitney; Figura 15).



**Figura 15. Determinação do FNT- $\alpha$  no homogenato do cérebro e cerebelo de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados (BAL, C57 e CBA) e infectados com o *P. berghei* ANKA (iBAL, iC57 e iCBA) no sexto dia após infecção.** Camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6: houve diferença estatística na produção de FNT- $\alpha$  entre os grupos de animais infectados e não infectados (Mann-Whitney; BAL>iBAL, CBA>iCBA, C57<iC57:  $p=0,008$ ). A quantidade da FNT- $\alpha$  variou entre as linhagens de camundongos não infectados (Kruskal-Wallis,  $p=0,002$ ; Segundo Dunn: BAL>CBA>C57) e infectados (Kruskal-Wallis,  $p=0,009$ ; Segundo Dunn: iBAL=iCBA<iC57). Os dados estão representados em medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos. Os valores de  $p$  foram apresentados na figura. Grupos com  $n=5$ .

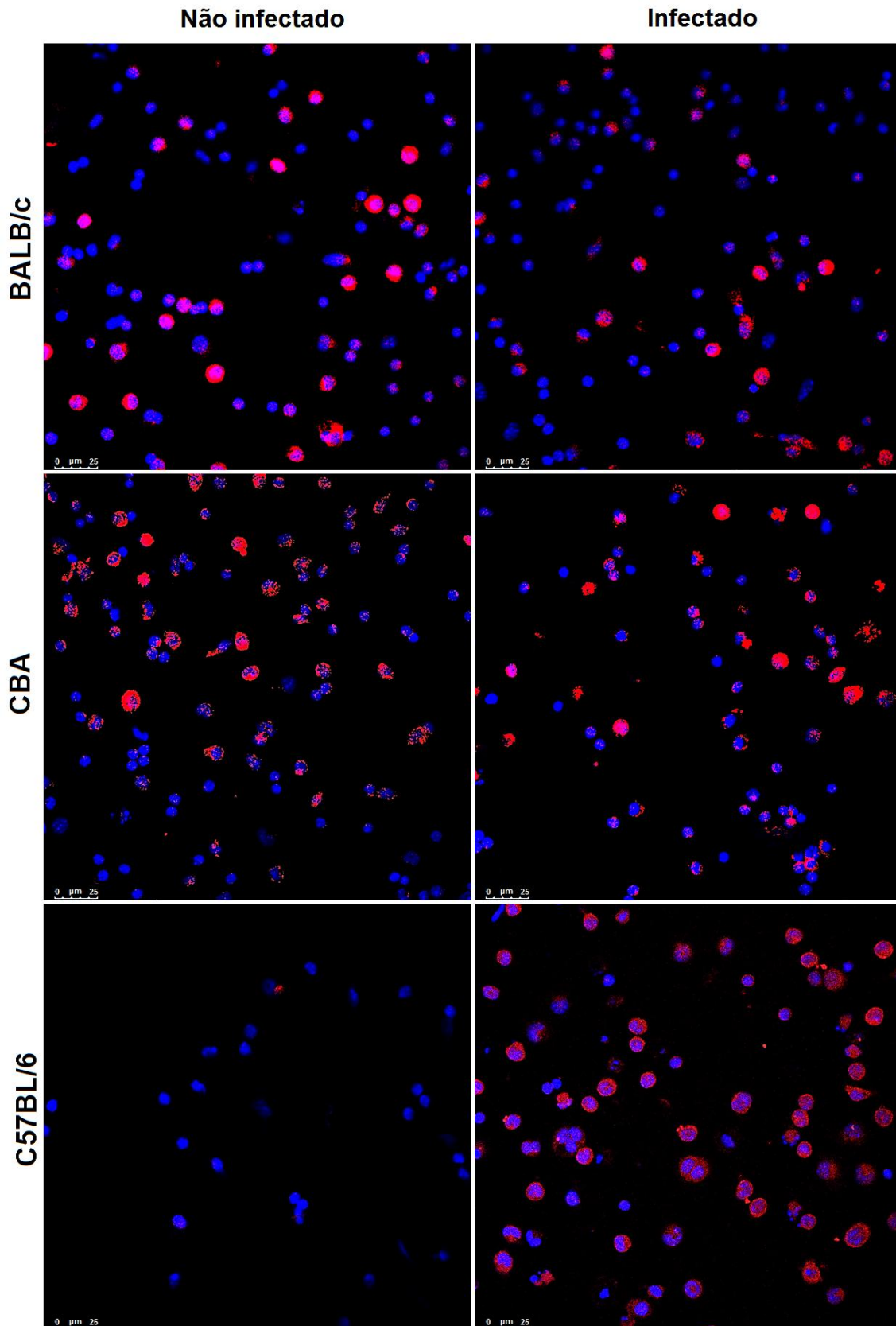
## 5.6. Avaliação do inflamassoma

O inflamassoma é um complexo multiprotéico formado por proteínas que se adaptam umas às outras para formar uma superfície de ativação da Interleucina-1. Para avaliar a ativação do inflamassoma NALPR1 na malária murina, as proteínas do complexo inflamassômico: NALPR1, ASC e caspase-1 foram marcadas nos macrófagos peritoneais coletados de animais não infectados (BAL, CBA e C57) e infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA (iBAL, iCBA e iC57) no sexto dia da infecção e avaliadas por microscopia confocal. A proteína NALPR1 é um receptor NOD que inicia a cascata de ativação de um dos tipos de inflamassoma; a caspase-1 é a proteína que cliva proteoliticamente o RNAm da pró-IL-1 $\beta$ ; e a ASC é a proteína que adapta as duas anteriores. As imagens foram capturadas por microscopia confocal e quantificadas utilizando o programa ImageJ, que foi utilizado para obter a intensidade média de fluorescência das imagens. A intensidade média de fluorescência de controles negativos foi subtraída do resultado dos grupos em

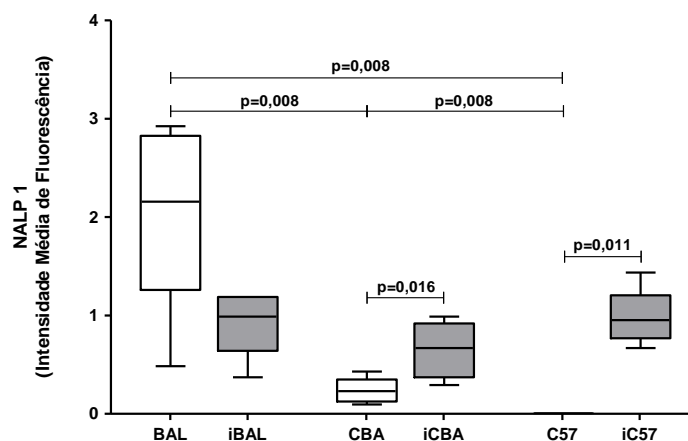
estudo para excluir a fluorescência basal. Um controle positivo representado por células estimuladas com LPS e ATP foi feito como controle do experimento.

### 5.6.1. Quantificação da proteína NALPR1

Na figura 16 encontram-se imagens de microscopia confocal de macrófagos peritoneais representativas dos animais não infectados e infectados dos três modelos estudados, incubadas com anticorpos para o NALPR1, marcados com ALEXA flúor 546. Pela quantificação da intensidade de fluorescência média (IFM) pelo software ImageJ, observamos maior expressão do NALPR1 nos macrófagos obtidos dos camundongos BALB/c (2,16), do que nos macrófagos dos camundongos CBA (0,23) e C57BL/6 (0,0) antes da infecção pelo plasmódio. Contudo, após a infecção, houve aumento da expressão dessa proteína somente nos macrófagos obtidos dos animais suscetíveis à malária cerebral (Figura 17). A expressão do NALPR1 foi 1,9 vezes maior nos camundongos CBA infectados com o *Plasmodium berghei* (0,67) do que no grupo não infectado (0,23) ( $p=0,016$ , Mann-Whitney) no sexto dias da infecção. A expressão do NALPR1 nos macrófagos dos camundongos C57BL/6 foi 9,5 vezes maior nos animais infectados do que nos animais não infectados (C57: 0,0 e iC57: 0,95;  $p=0,011$ , Mann-Whitney).



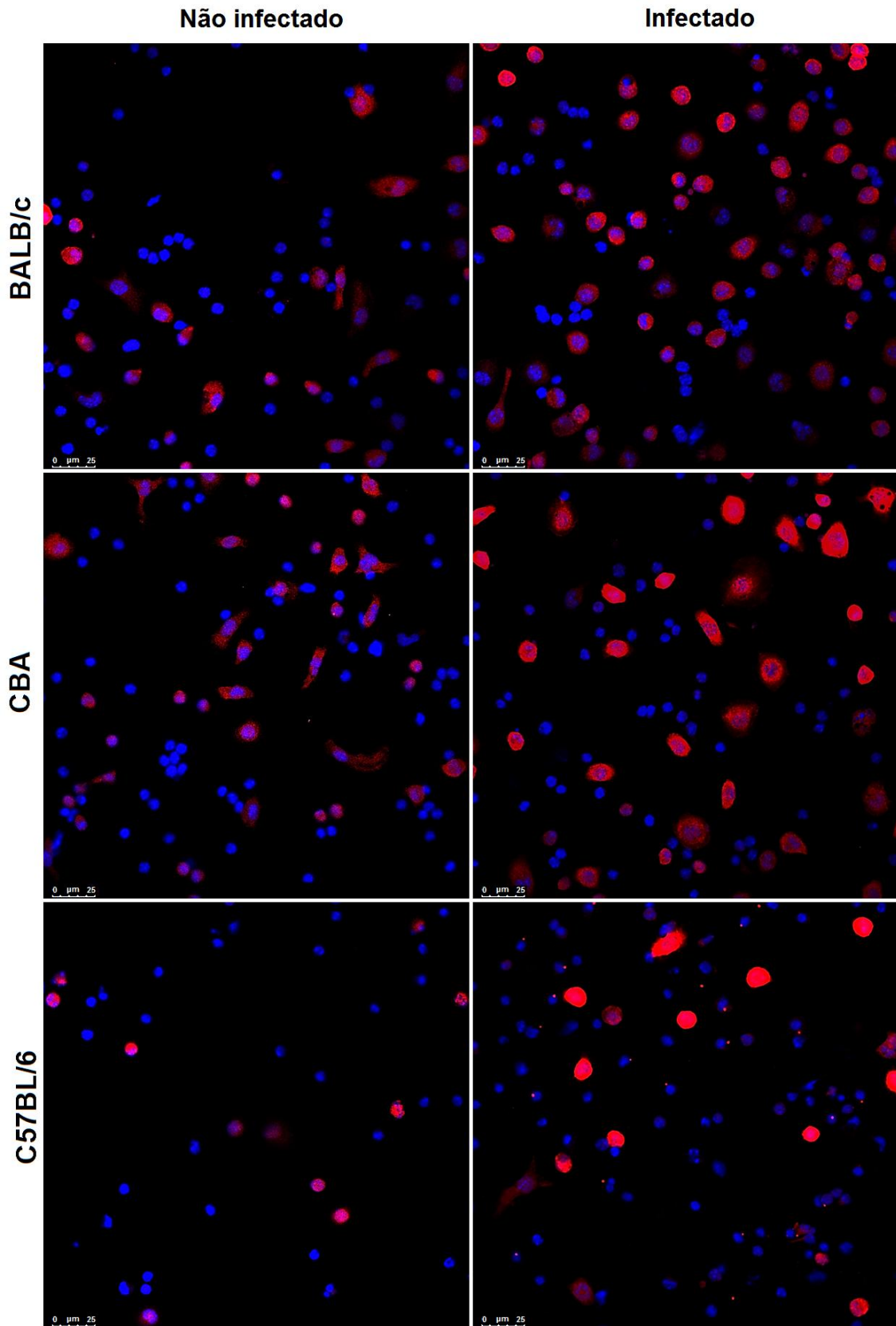
**Figura 16. Expressão da NALPR1 nos macrófagos peritoneais dos camundongos infectados ou não com o *Plasmodium berghei* ANKA.** Os macrófagos dos camundongos infectados iBAL, iCBA e iC57 e dos não infectados BAL, CBA e C57 foram coletados no sexto dia após infecção e marcados com anticorpo primário anti-NALPR1 (1:200) e secundário acoplado com ALEXA flúor 546 que fluoresce em vermelho (1:3000). Os núcleos foram marcados com DAPI em azul (1:5000). A primeira coluna mostra imagens representativas dos macrófagos peritoneais dos animais não infectados e a segunda coluna, dos animais infectados com *Plasmodium berghei* ANKA. As imagens foram capturadas no microscópio confocal Leica SP5 e o tratamento das mesmas foi realizado com o programa ImageJ. Pin hole 1,26 Airy, 1 frame average, 3 lines average, zoom de 1X. Escala: 25  $\mu$ m.



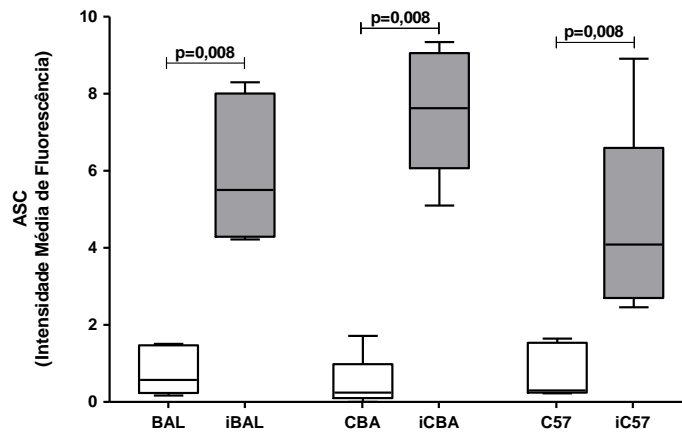
**Figura 17. Intensidade de Fluorescência Média da NALP1 nos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados (BAL, C57 e CBA) e infectados com o *P. berghei* ANKA (iBAL, iC57 e iCBA) no sexto dia após infecção.** A quantidade basal de NALP1 foi diferente entre as linhagens de camundongos ( $p=0,002$ , Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn: BAL>CBA>C57). Após a infecção, os camundongos CBA e C57 produziram uma quantidade maior da proteína (Mann-Whitney,  $p=0,016$  e  $p=0,011$ , respectivamente). Os dados estão representados em medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos. Os valores de  $p$  foram apresentados na figura. Grupos com  $n=5$ .

### 5.6.2. Quantificação da proteína ASC

Na figura 18 encontram-se imagens de microscopia confocal de macrófagos peritoneais representativas dos animais não infectados e infectados dos três modelos estudados, incubadas com anticorpos contra o ASC, marcados com ALEXA flúor 546. Pela quantificação da proteína ASC utilizando o software imageJ observamos que não houve diferença na Intensidade Fluorescência Média para o ASC entre as três linhagens de camundongos não infectados ( $p=0,471$ , Kruskal-Wallis) ou após a infecção pelo *Plasmodium berghei* ( $p=0,121$ , Kruskal-Wallis). Porém, em todas as linhagens a IFM foi maior nos animais infectados do que nos controles não infectados (Figura 19). Houve um aumento de 8,59 vezes nos macrófagos dos camundongos BALB/c (BAL: 0,57 x iCBA: 5,50;  $p=0,008$ , Mann-Whitney); de 0,24 para 7,63 ( $p=0,008$ , Mann-Whitney) nos macrófagos dos camundongos CBA; e, de 0,30 para 4,08 nos camundongos C57BL/6 ( $p=0,008$ , Mann-Whitney).



**Figura 18. Expressão da ASC nos macrófagos peritoneais dos camundongos infectados ou não com o *Plasmodium berghei* ANKA.** Os macrófagos dos camundongos infectados iBAL, iCBA e iC57 e dos não infectados BAL, CBA e C57 foram coletados no sexto dia após infecção e marcados com anticorpo primário anti-ASC (1:200) e secundário acoplado com ALEXA flúor 546 que fluoresce em vermelho (1:3000). Os núcleos foram marcados com DAPI em azul (1:5000). A primeira coluna mostra imagens representativas dos macrófagos peritoneais dos animais não infectados e a segunda coluna, dos animais infectados com *Plasmodium berghei* ANKA. As imagens foram capturadas no microscópio confocal Leica SP5 e o tratamento das mesmas foi realizado com o programa ImageJ. Pin hole 1,26 Airy, 1 frame average, 3 lines average, zoom de 1X. Escala: 25  $\mu$ m.

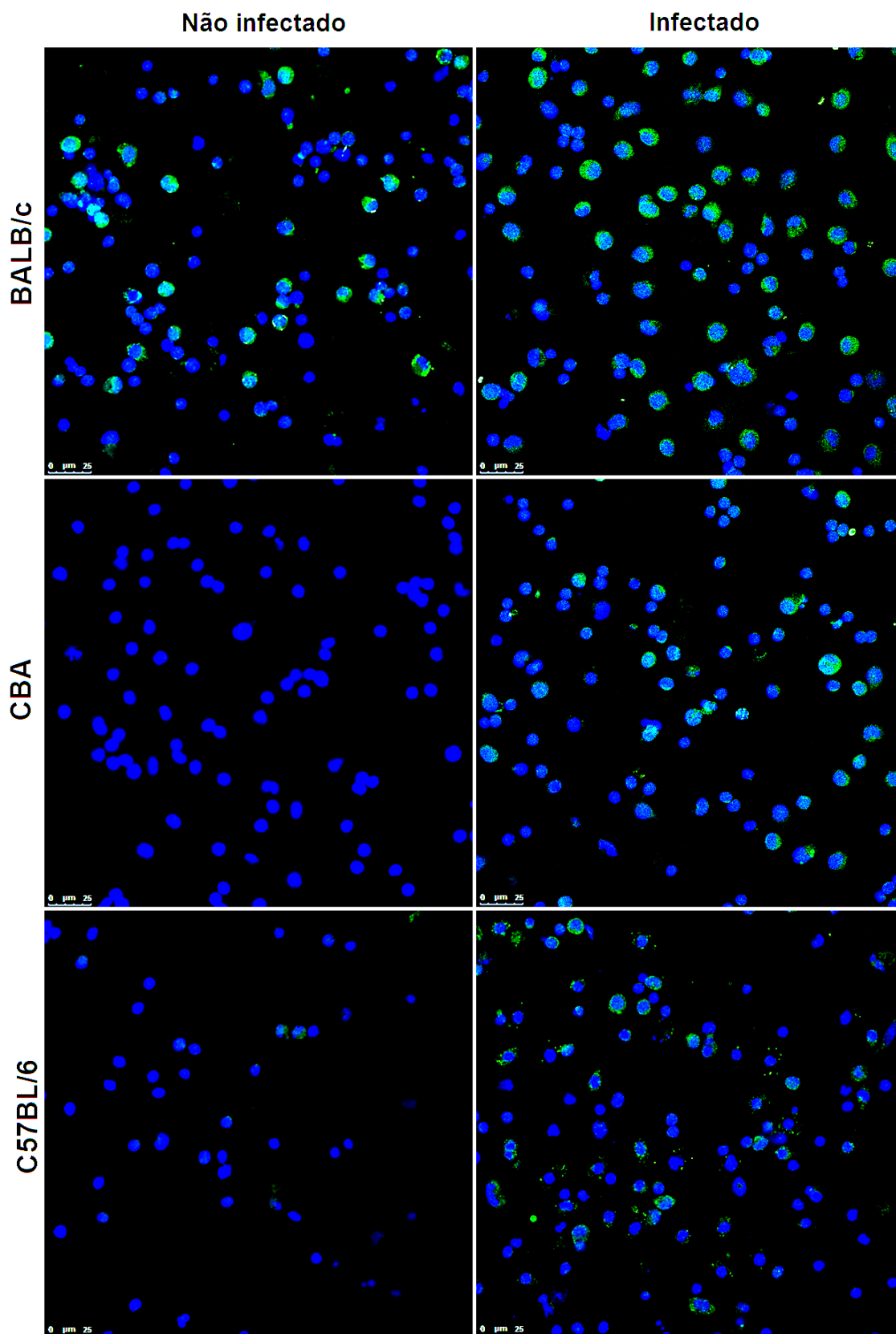


**Figura 19. Intensidade de Fluorescência Média da ASC nos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados (BAL, C57 e CBA) e infectados com o *P. berghei* ANKA (iBAL, iC57 e iCBA) no sexto dia após infecção.** A quantidade de ASC não foi diferente entre as três linhagens não infectadas ou infectadas (Kruskal-Wallis,  $p=0,471$  e  $0,121$ , respectivamente); porém, aumentou nas três linhagens após a infecção (Mann-Whitney). Os dados estão representados em medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos. Os valores de  $p$  foram apresentados na figura. Grupos com  $n=5$ .

### 5.6.3. Quantificação da proteína Caspase-1

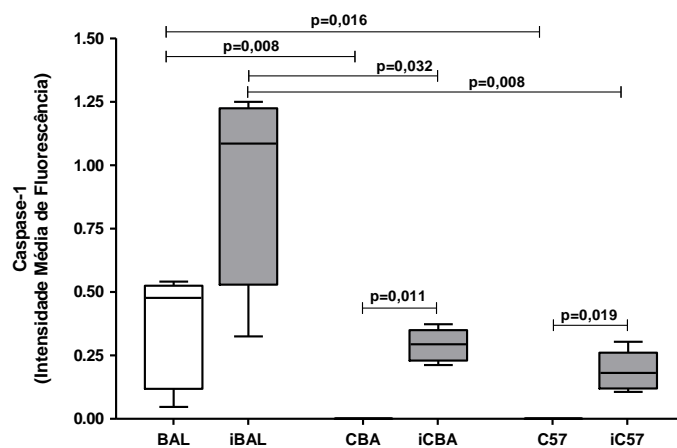
Na figura 20 encontram-se imagens de microscopia confocal de macrófagos peritoneais representativas dos animais não infectados e infectados dos três modelos estudados, incubadas com anticorpos para o caspase-1, marcados com FITC. A Intensidade de Fluorescência Média da caspase-1 para os camundongos BALB/c foi maior do que nos animais CBA e C57BL/6 (BAL: 0,48 e CBA e C57: 0,00;  $p=0,008$ , Kruskal-Wallis). No sexto dia de infecção pelo *Plasmodium berghei*, esse padrão se manteve (iBAL: 1,08, iCBA: 0,29 e iC57: 0,18;  $p=0,008$ , Kruskal-Wallis).

A infecção produziu um aumento estatisticamente significativo na expressão da caspase-1 nos camundongos CBA e C57BL/6 respectivamente, 2,94 e 1,81 vezes (CBA x iCBA:  $p=0,011$  e C57 x iC57:  $p=0,019$ , Mann-Whitney). O aumento ficou no limite da significância estatística nos camundongos BALB/c ( $p=0,056$ , Mann-Whitney; Figura 21).



**Figura 20. Expressão da proteína caspase-1 nos macrófagos peritoneais dos camundongos infectados ou não com o *Plasmodium berghei* ANKA.** Os macrófagos dos camundongos infectados iBAL, iCBA e iC57 e dos não infectados BAL, CBA e C57 foram coletados no sexto dia após infecção e marcados com anticorpo anti-caspase-1 marcado com FITC (1:200). Os núcleos foram marcados com DAPI em azul (1:5000). A primeira coluna mostra imagens representativas dos macrófagos peritoneais dos animais não infectados e a segunda coluna, dos animais infectados com *Plasmodium berghei* ANKA. As imagens foram capturadas no microscópio confocal Leica SP5 e o tratamento das mesmas foi realizado com o programa ImageJ. Pin hole 1,26 Airy, 1 frame average, 3 lines average, zoom de 1X. Escala: 25 µm.





**Figura 21. Intensidade de Fluorescência Média da caspase-1 nos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA, não infectados (BAL, C57 e CBA) e infectados com o *P. berghei* ANKA (iBAL, iC57 e iCBA) no sexto dia após infecção.** A quantidade de caspase-1 foi diferente entre as três linhagens não infectadas (Kruskal-Wallis,  $p=0,008$ ; seguido pelo método de Dunn: BAL>CBA~C57); e infectadas (Kruskal-Wallis,  $p=0,008$ ; seguido do método de Dunn: iBAL>CBA~iC57). A infecção promoveu um aumento da proteína nos animais infectados (Mann-Whitney). Os dados estão representados em medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos. Os valores de p foram apresentados na figura. Grupos com  $n=5$ .

## 5.7. Avaliação da via do NF $\kappa$ B

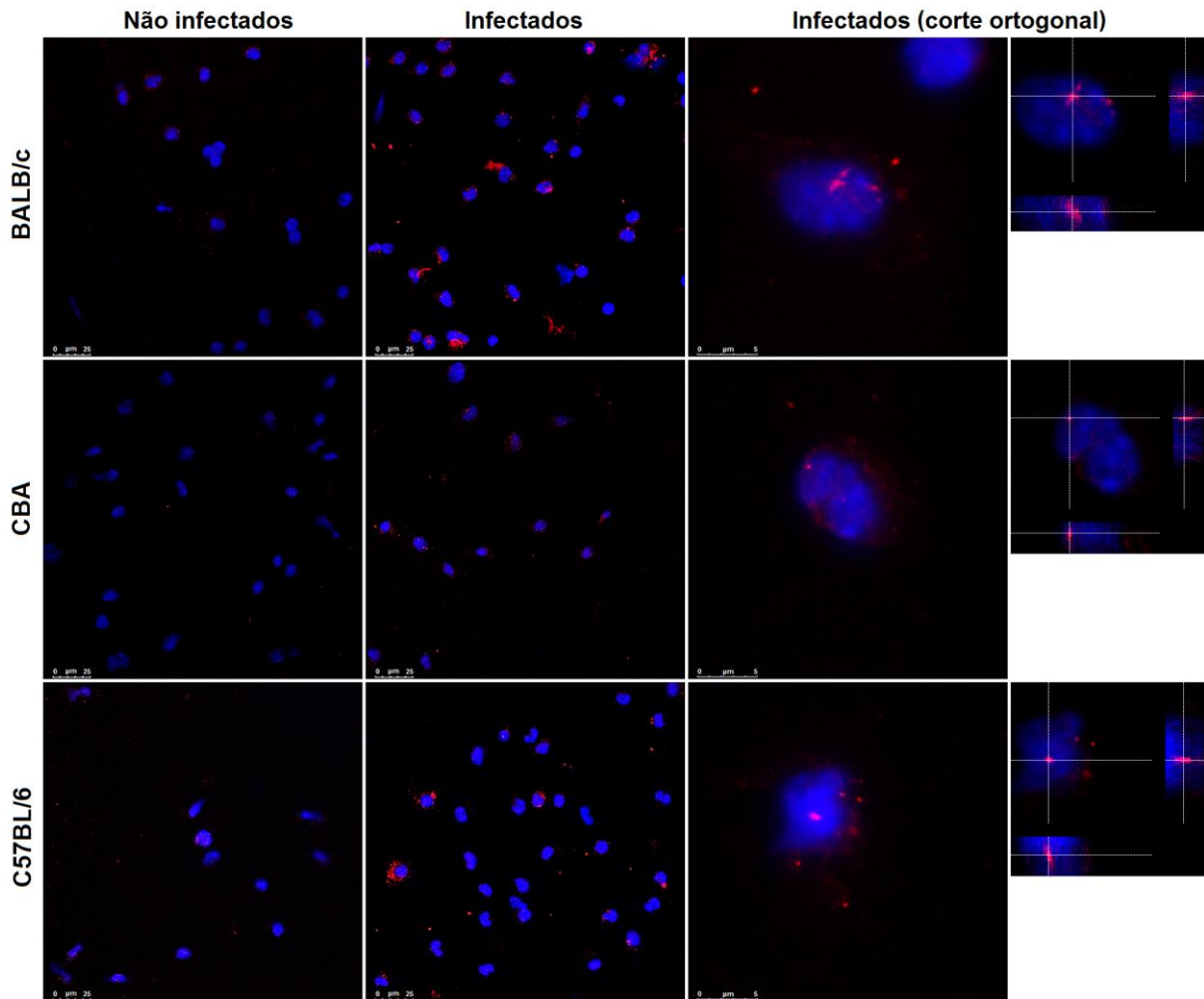
A via do NF $\kappa$ B possui várias proteínas que translocam para o núcleo e promovem a expressão de genes em regiões específicas do DNA estimulando a resposta inflamatória. Suas proteínas se organizam em diferentes vias que são acionadas dependendo da célula e do receptor na membrana celular. Assim, o p65 (RelA) participa das vias clássicas e atípicas de ativação, enquanto, o p52 (NF $\kappa$ B2) e o RelB (p68) participam da via não clássica. A expressão das proteínas p52, RelA e RelB foram avaliadas nos macrófagos peritoneais coletados no sexto dia de infecção de animais não infectados (BAL, CBA e C57) e infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA (iBAL, iCBA e iC57). As imagens foram coletadas por microscopia confocal e o programa ImageJ foi utilizado para quantificar a intensidade média de fluorescência total, nuclear e citoplasmática. A intensidade média de fluorescência de controles negativos também foi obtida e o valor mediano dessas imagens foi subtraído do resultado dos grupos em estudo. Um controle positivo representado por células estimuladas com LPS foi utilizado para controle do experimento.



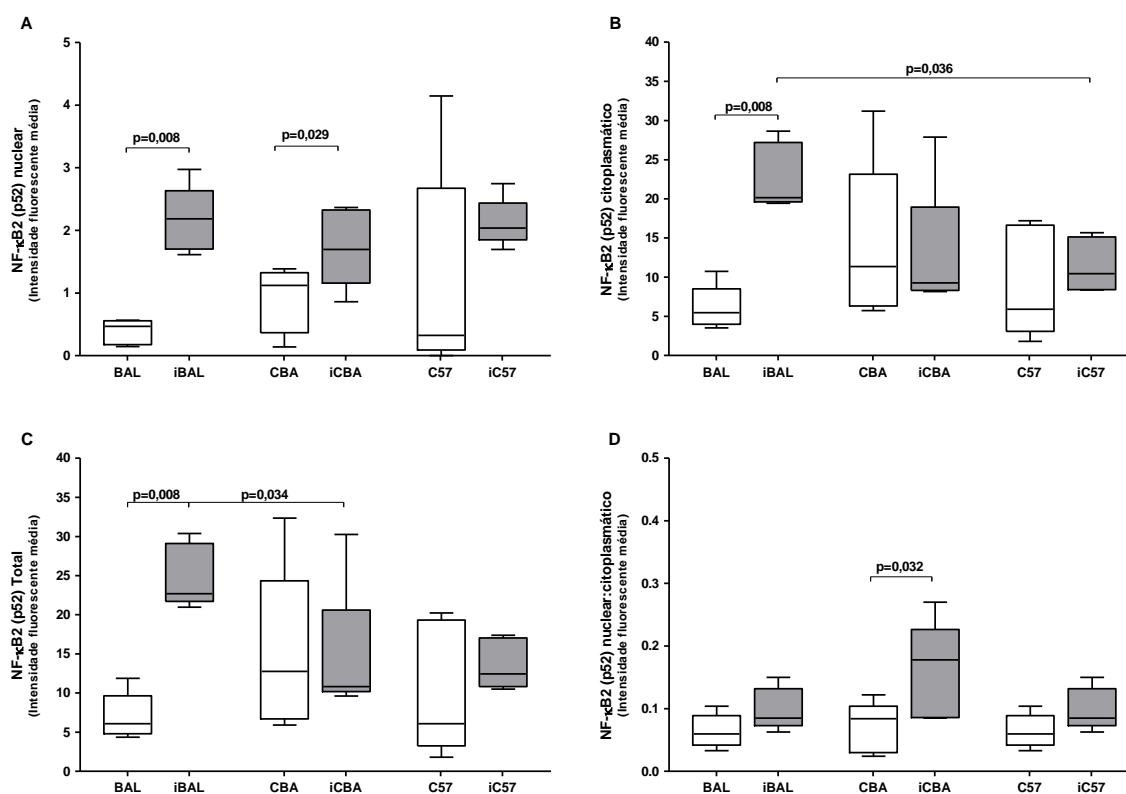
### 5.7.1. Quantificação da proteína p52 (NFκB2)

Na figura 22 encontram-se imagens de microscopia confocal de macrófagos peritoneais representativas dos animais não infectados e infectados dos três modelos estudados, incubadas com anticorpos para o p52, marcados com ALEXA flúor 546. O núcleo da célula está marcado com DAPI. Estão representados também cortes ortogonais confirmando a marcação do p52 intranuclear.

Houve aumento da expressão total de p52 nos camundongos BALB/c após a infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA, enquanto não houve alteração na expressão total desse promotor gênico nos camundongos suscetíveis (Figura 23). Nos camundongos BALB/c infectados, o aumento total da p52 ( $p=0,0008$ , Kruskal-Wallis) foi paralelo à maior expressão da proteína tanto no núcleo ( $p=0,008$ , Mann-Whitney), quanto no citoplasma ( $p=0,008$ , Mann-Whitney), sugerindo que após a infecção no modelo resistente houve aumento na síntese da p52 e que houve translocação do promotor para o núcleo, na mesma proporção que permaneceu no citoplasma dos camundongos BALB/C ( $p=0,095$ , Mann-Whitney). Nos camundongos CBA, não houve aumento na expressão total do p52 ( $p=1,000$ , Mann-Whitney); contudo, houve aumento da quantidade da proteína no núcleo, embora no limite da significância estatística ( $p=0,056$ , Mann-Whitney), mas não houve alteração da sua quantidade no citoplasma ( $p=1,000$ , Mann-Whitney), sugerindo que houve translocação para o núcleo do p52 nos camundongos CBA. O que é comprovado pela maior razão núcleo:citoplasma que ocorreu nos camundongos CBA ( $p=0,056$ , Mann-Whitney). Já nos camundongos C57BL/6, não houve modificação na expressão total de p52 ( $p=0,690$ , Mann-Whitney) e nem houve diferença na quantidade da proteína nos compartimentos nucleares ( $p=0,151$ , Mann-Whitney) ou nos citoplasmáticos ( $p=0,690$ , Mann-Whitney), sugerindo que nesse modelo a via não canônica do NFκB está regulada e/ou não foi ativada.



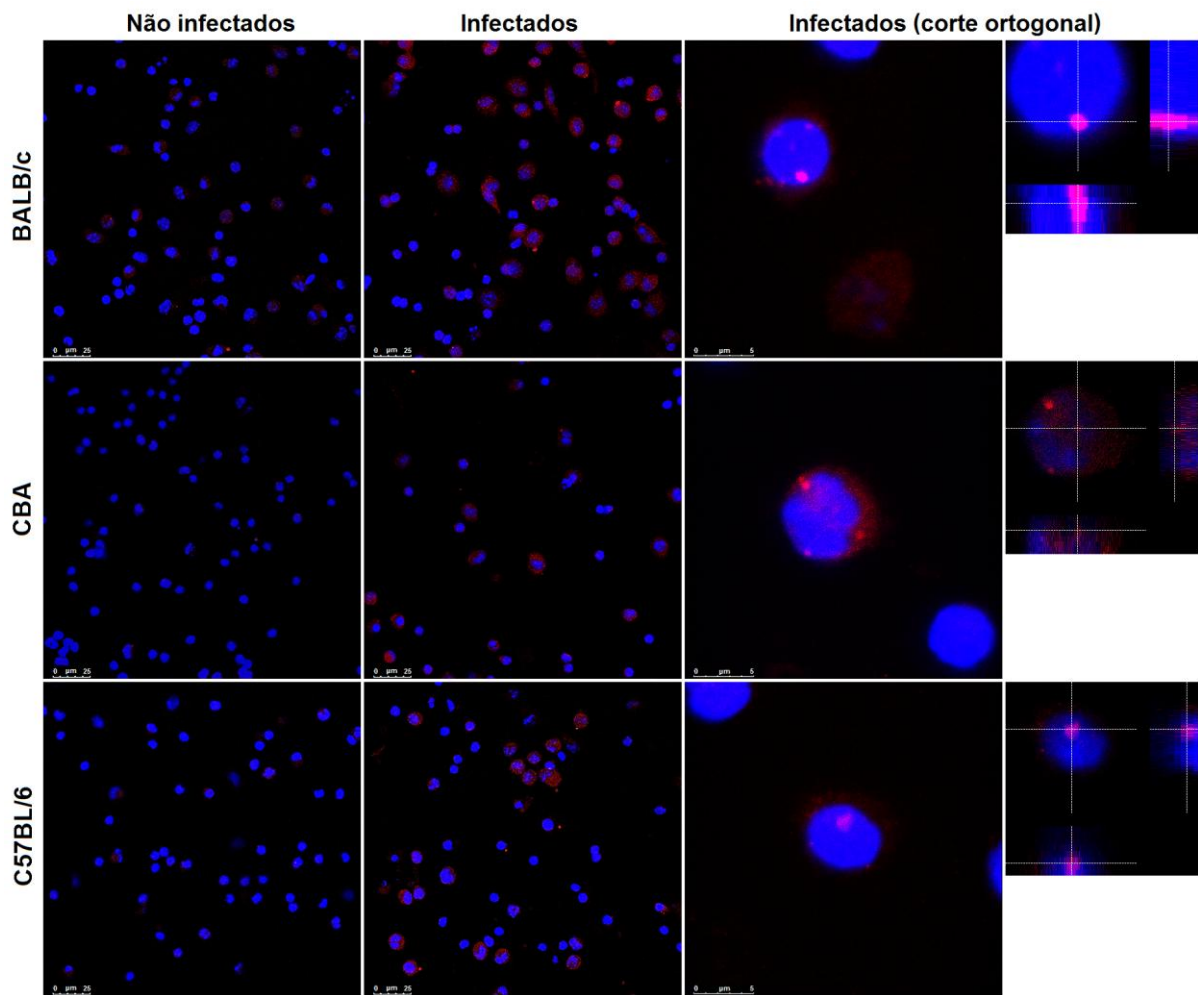
**Figura 22. Expressão do p52 nos macrófagos peritoneais na malária experimental.** Os macrófagos dos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 não infectados e infectados com *Plasmodium berghei* ANKA foram coletados no sexto dia após infecção e marcados com anticorpo primário anti-p52 (1:200) e secundário acoplado com ALEXA flúor 546 que fluoresce em vermelho (1:3000). Os núcleos foram marcados com DAPI em azul (1:5000). Primeira coluna mostra imagens representativas dos macrófagos peritoneais dos animais não infectados e na segunda coluna, dos animais infectados, utilizadas para análise no ImageJ. Zoom de 1x. (Escala: 25  $\mu\text{m}$ ). A terceira coluna mostra imagens de macrófagos de animais infectados com zoom de 8x utilizados para o corte ortogonal (Escala: 5  $\mu\text{m}$ ). As imagens menores mostram os cortes ortogonais. As imagens foram capturadas no microscópio confocal Leica SP5 e o corte ortogonal foi realizado no programa LAS AF Leica. Pin hole 1,26 Airy, 1 frame average, 3 lines average.



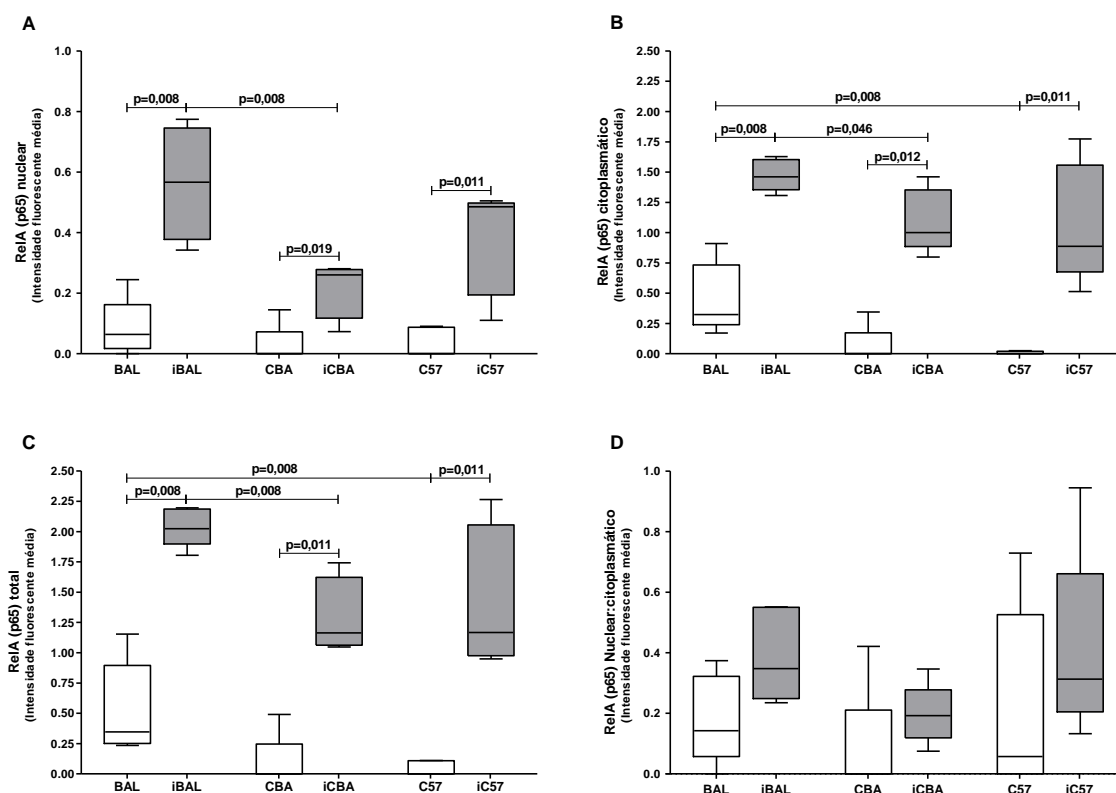
**Figura 23. Intensidade de Fluorescência Média de p52 nos macrófagos peritoneais dos camundongos infectados ou não com o *Plasmodium berghei* ANKA.** A) p52 nuclear. B) p52 citoplasmático. C) p52 total. D) Razão núcleo:citoplasma. Os dados estão representados em medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos da análise de 5 grandes campos de imagens com zoom de 1x, ajustados para 100 células. Métodos estatísticos: Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Grupos com n=5. Avaliação em duplicata. Os valores de p foram apresentados na figura.

### 5.7.2. Quantificação da proteína RelA (p65)

A análise das imagens capturada pelo microscópio confocal e tratadas pelo programa ImageJ (Figura 24) mostrou que a expressão total, a mobilização citoplasmática e a translocação nuclear do RelA aumentou em todas as linhagens; porém, o aumento dessa expressão após a infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA foi muito maior nos camundongos resistentes BALB/c do que nos camundongos suscetíveis CBA. Em todas as três linhagens, o aumento da expressão total de RelA foi reflexo do aumento tanto no citoplasma quanto no núcleo (Em todas as análises o  $p < 0,01$ , Mann-Whitney), entretanto, esses aumentos não refletiram em maior translocação do RelA para o núcleo ( $p > 0,1$  para todos, Mann-Whitney; Figura 25), sugerindo que a via canônica do NF $\kappa$ B tenha sido ativada nas três linhagens, porém de forma diferente, durante a infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA e que uma parte da proteína sintetizada está no citoplasma, enquanto, uma parte foi translocada na mesma proporção para o núcleo.



**Figura 24. Expressão do RelA nos macrófagos peritoneais na malária experimental.** Os macrófagos dos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 não infectados e infectados com *Plasmodium berghei* ANKA foram coletados no sexto dia após infecção e marcados com anticorpo primário anti-p65 (RelA) (1:200) e secundário acoplado com ALEXA flúor 546 que fluoresce em vermelho (1:3000). Os núcleos foram marcados com DAPI em azul (1:5000). Primeira coluna mostra imagens representativas dos macrófagos peritoneais dos animais não infectados e na segunda coluna, dos animais infectados, utilizadas para análise no ImageJ. Zoom de 1x. (Escala: 25  $\mu$ m). A terceira coluna mostra imagens de macrófagos de animais infectados com zoom de 8x utilizados para o corte ortogonal (Escala: 5  $\mu$ m). As imagens menores mostram os cortes ortogonais. As imagens foram capturadas no microscópio confocal Leica SP5 e o corte ortogonal foi realizado no programa LAS AF Leica. Pin hole 1,26 Airy, 1 frame average, 3 lines average.



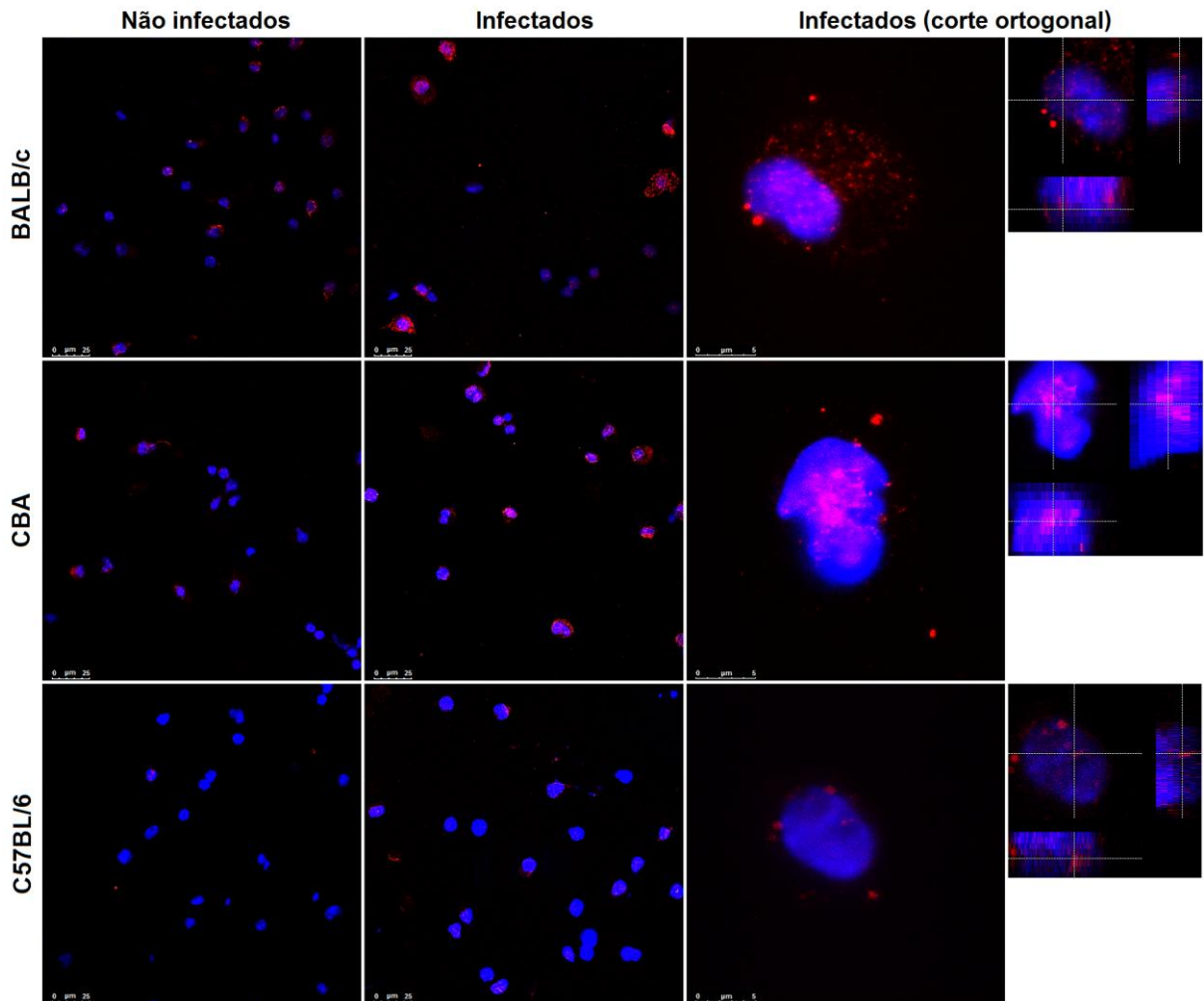
**Figura 25. Intensidade de Fluorescência Média de RelA nos macrófagos peritoneais dos camundongos infectados ou não com o *Plasmodium berghei* ANKA. A) RelA nuclear. B) RelA citoplasmático. C) RelA total. D) Razão núcleo:citoplasma. Os dados estão representados em medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos da análise de 5 grandes campos de imagens com zoom de 1x, ajustados para 100 células. Métodos estatísticos: Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Grupos com n=5. Avaliação em duplicata. Os valores de p foram apresentados na figura.**

### 5.7.3. Quantificação da proteína RelB (p68)

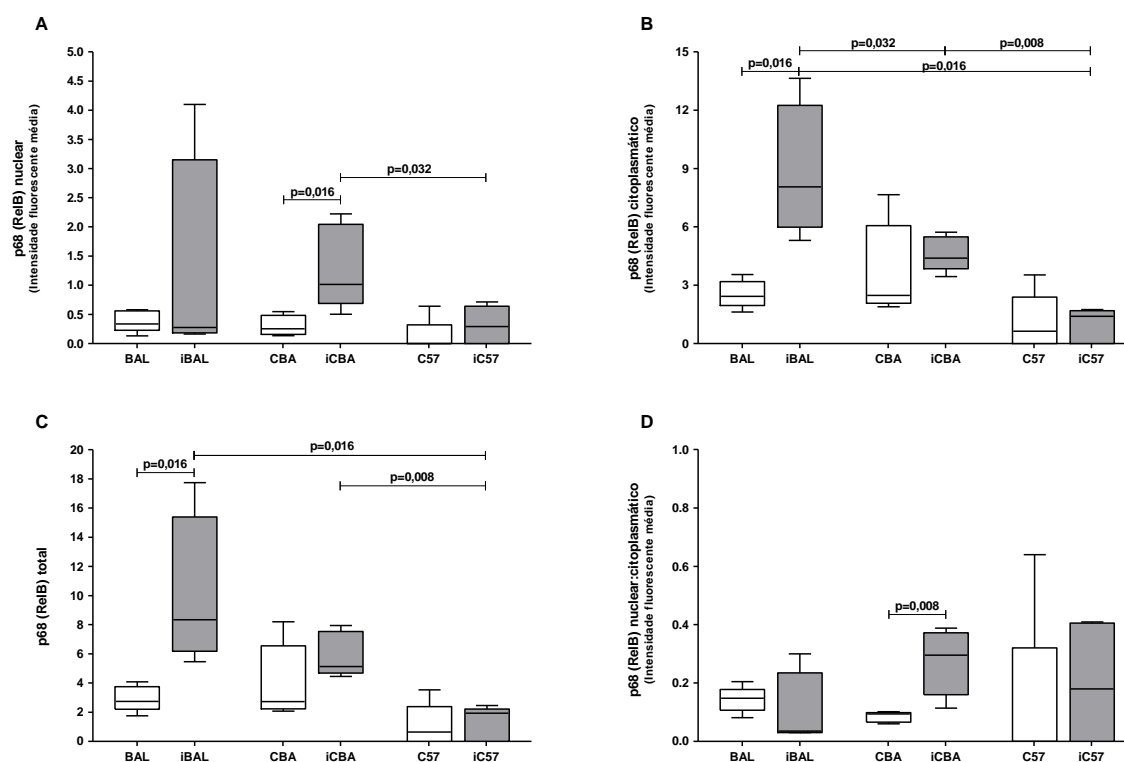
As imagens do promotor gênico RelB capturadas por microscopia confocal e tratadas pelo programa ImageJ (Figura 26) mostraram que após a infecção deflagrada pelo *Plasmodium berghei* ANKA, a expressão total, a citoplasmática e a quantidade nuclear do RelB foi diferente entre os camundongos infectados, sendo que os animais BALB/c apresentaram uma expressão maior da proteína do que os animais suscetíveis.

Nos camundongos BALB/c, o aumento da expressão total de RelB (p=0,016, Mann-Whitney) ocorreu devido o aumento da proteína no citoplasma (p=0,016, Mann-Whitney), sem aumento concomitante no núcleo (p=0,730, Mann-Whitney; Figura 27), sugerindo que embora a síntese do RelB tenha ocorrido, os mecanismos reguladores mantiveram a proteína mobilizada no citoplasma sem haver translocação para o núcleo. Os camundongos CBA infectados apresentaram

um padrão de produção intermediária. Nesse modelo, não houve alteração na expressão total do RelB após a infecção ( $p=0,222$ , Mann-Whitney), mas houve aumento da proteína no núcleo ( $p=0,016$ , Mann-Whitney), sem aumento paralelo no citoplasma ( $p=0,421$ , Mann-Whitney), sugerindo que houve translocação da RelB do citoplasma para o núcleo (R:C:  $p=0,008$ , Mann-Whitney). Esses dados sugerem que nos camundongos CBA, ou não houve aumento da síntese da RelB, apesar de existir atividade transcricional do NF $\kappa$ B; ou a proteína total havia aumentado em um momento anterior ao sexto dia de infecção, se estabilizou e a quantidade em excesso ainda estava translocada no núcleo. Nos camundongos C57BL/6, a expressão total do RelB foi menor em relação às outras linhagens. Contudo, a expressão nuclear e a citoplasmática da proteína não se modificaram após a infecção pelo plasmódio (respectivamente,  $p=0,346$  e  $p=0,829$ , Mann-Whitney) e consequentemente, não houve aumento na quantidade total do RelB nos macrófagos ( $p=0,829$ , Mann-Whitney), sugerindo que o RelB não participa do mecanismo de ativação do NF $\kappa$ B no modelo C57BL/6.



**Figura 26. Expressão do RelB nos macrófagos peritoneais na malária experimental.** Os macrófagos dos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 não infectados e infectados com *Plasmodium berghei* ANKA foram coletados no sexto dia após infecção e marcados com anticorpo primário anti-p68 (RelB) (1:200) e secundário acoplado com ALEXA flúor 546 que fluoresce em vermelho (1:3000). Os núcleos foram marcados com DAPI em azul (1:5000). A primeira coluna mostra imagens representativas dos macrófagos peritoneais dos animais não infectados e na segunda coluna, dos animais infectados, utilizadas para análise no ImageJ. Zoom de 1x. (Escala: 25 µm). A terceira coluna mostra imagens de macrófagos de animais infectados com zoom de 8x utilizados para o corte ortogonal (Escala: 5 µm). As imagens menores mostram os cortes ortogonais. As imagens foram capturadas no microscópio confocal Leica SP5 e o corte ortogonal foi realizado no programa LAS AF Leica. Pin hole 1,26 Airy, 1 frame average, 3 lines average.



**Figura 27. Intensidade de Fluorescência Média de RelB nos macrófagos peritoneais dos camundongos infectados ou não com o *Plasmodium berghei* ANKA. A) RelB nuclear. B) RelB citoplasmático. C) RelB total. D) Razão núcleo:citoplasma. Os dados estão representados em medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos da análise de 5 grandes campos de imagens com zoom de 1x, ajustados para 100 células. Métodos estatísticos: Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Grupos com n=5. Avaliação em duplicata. Os valores de p foram apresentados na figura.**

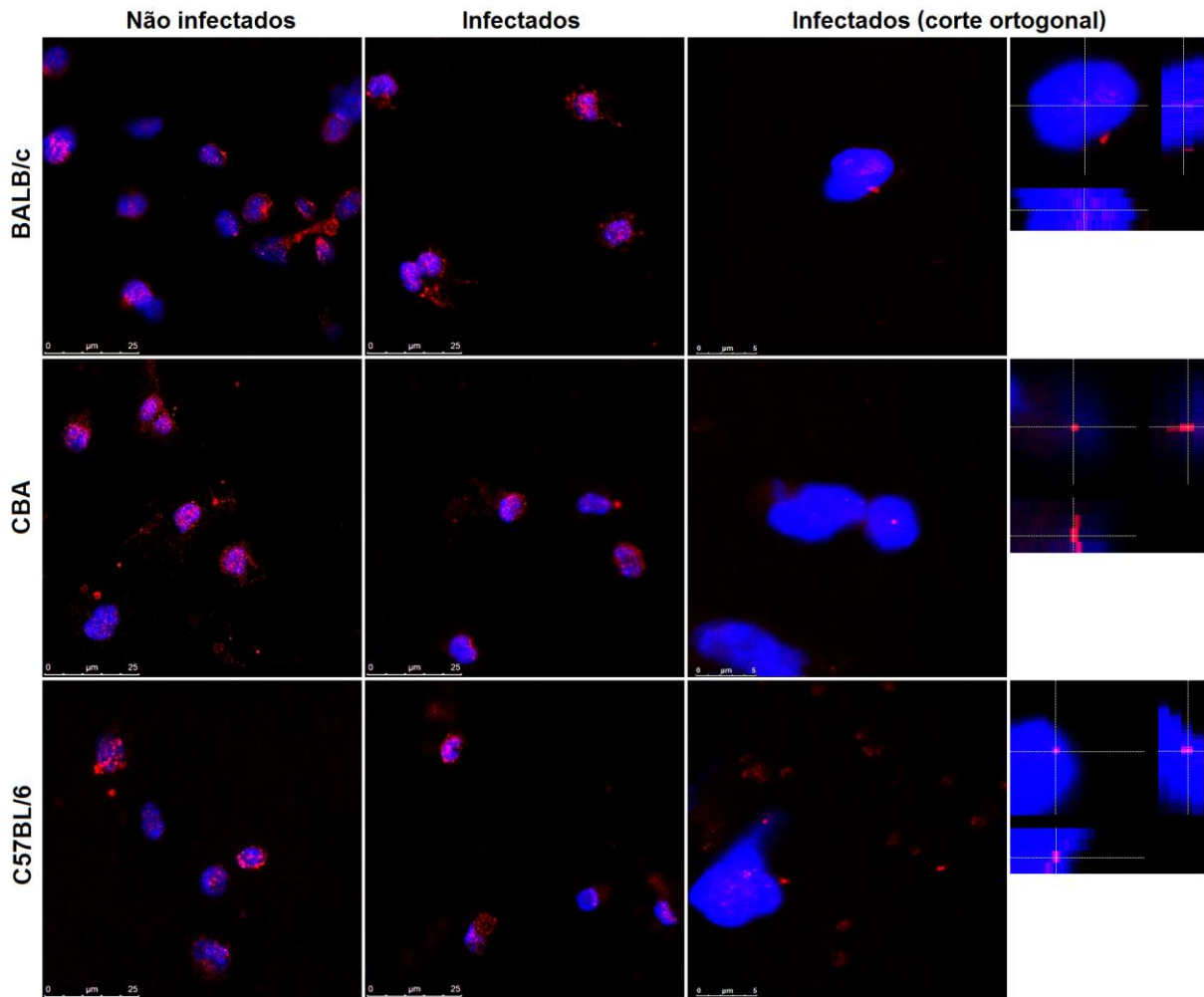
## 5.8. Avaliação do promotor nuclear PPAR- $\gamma$

A análise das imagens capturada pelo microscópio confocal e tratadas pelo programa ImageJ (Figura 28) mostrou que a expressão total, a degradação citoplasmática e a translocação nuclear do PPAR- $\gamma$  foi diferente tanto nos animais não infectados quanto nos animais infectados. A expressão total de PPAR- $\gamma$  diminuiu nos camundongos BALB/c e CBA infectados, sugerindo que existe uma maior utilização ou uma menor síntese dessa proteína degradada pelo *Plasmodium* (BAL x iBAL e CBA x iCBA: p=0,016, Mann-Whitney), enquanto que o mesmo não ocorreu para a linhagem C57BL/6 (p=0,222, Mann-Whitney; Figura 29).

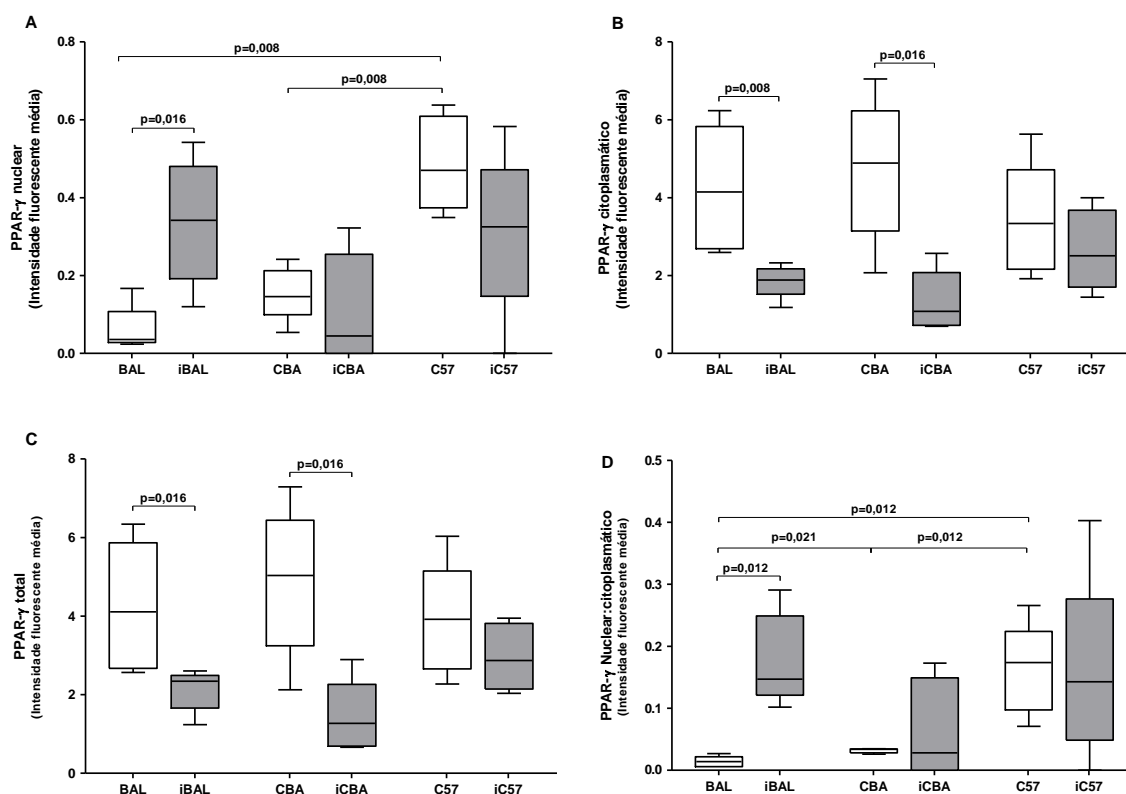
Nos camundongos BALB/c, observou-se que um aumento de PPAR- $\gamma$  ocorreu no núcleo (p=0,016, Mann-Whitney), enquanto no citoplasma houve



diminuição da expressão do PPAR- $\gamma$  ( $p=0,008$ , Mann-Whitney). Esses dados sugerem que, independente de existir alguma degradação ou uma produção menor da molécula, ocorreu também uma maior translocação do PPAR- $\gamma$  do citoplasma para o núcleo nos camundongos BALB/c após a infecção. Isso pode ser confirmado pelo aumento da razão nuclear:citoplasmática nos camundongos BALB/c infectados ( $p=0,012$ , Mann-Whitney). Já nos camundongos CBA, a diminuição do PPAR- $\gamma$  total nos macrófagos foi acompanhada por uma diminuição da molécula no citoplasma ( $p=0,016$ , Mann-Whitney), sem aumento paralelo no núcleo após infecção pelo *Plasmodium berghei* ( $p=0,548$ , Mann-Whitney), sugerindo que ocorreu uma maior degradação do PPAR- $\gamma$  no citoplasma no modelo CBA. Nos camundongos C57BL/6, a quantidade total de PPAR- $\gamma$  não foi degradada no citoplasma ( $p=0,690$ , Mann-Whitney) nem translocada para o núcleo ( $p=0,151$ , Mann-Whitney), porém, antes da infecção a quantidade nuclear da proteína era maior do que nos camundongos BALB/c ( $p=0,008$ , Mann-Whitney), sugerindo que o camundongo C57BL/6, que apresenta a forma mais agressiva da doença, tem um padrão de produção basal elevado do PPAR- $\gamma$ .



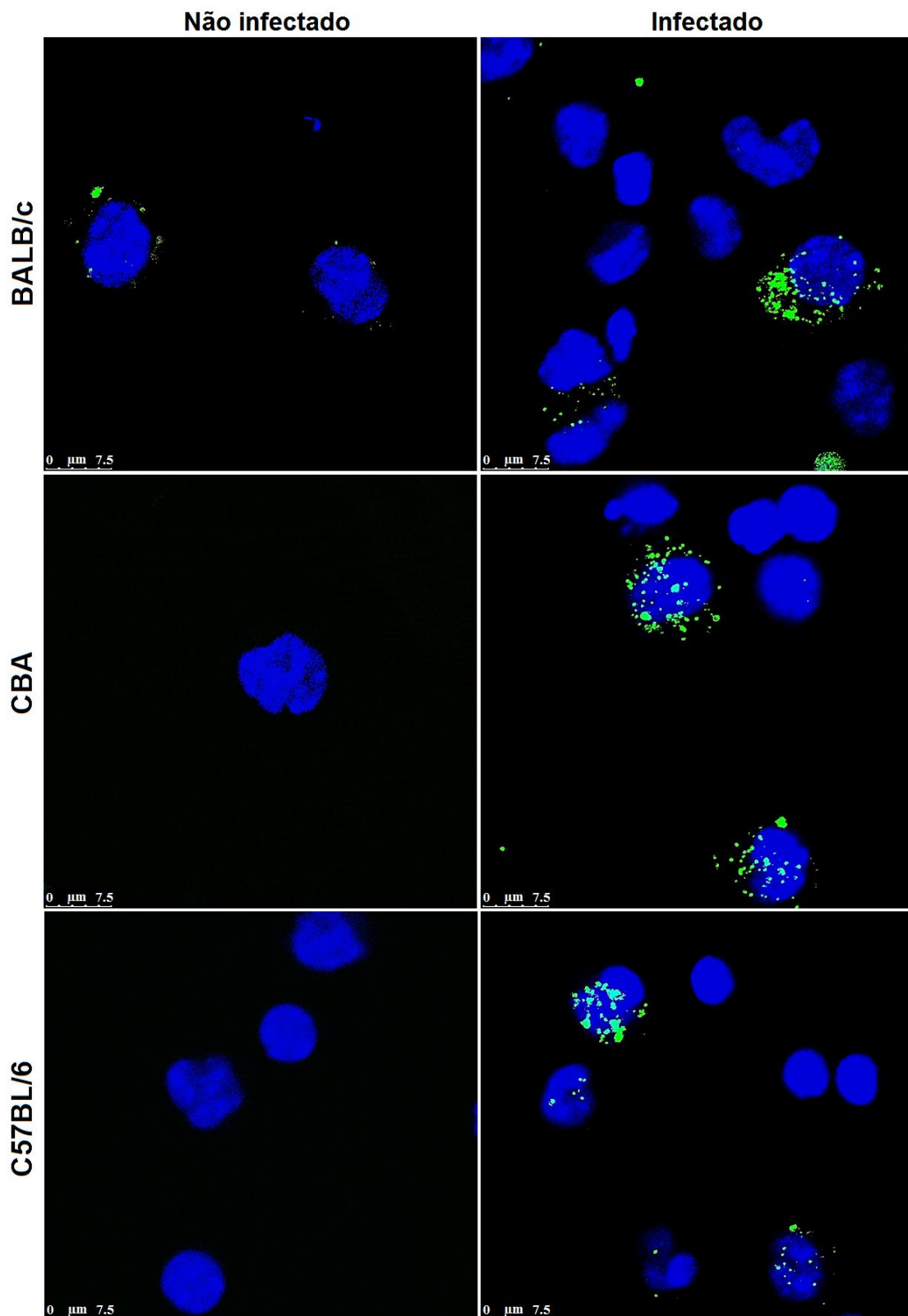
**Figura 28. Expressão do PPAR- $\gamma$  nos macrófagos peritoneais na malária experimental.** Os macrófagos dos camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 não infectados e infectados com *Plasmodium berghei* ANKA foram coletados no sexto dia após infecção e marcados com anticorpo primário PPAR- $\gamma$  (1:200) e secundário acoplado com ALEXA flúor 546 que fluoresce em vermelho (1:3000). Os núcleos foram marcados com DAPI em azul (1:5000). A primeira coluna mostra imagens representativas dos macrófagos peritoneais dos animais não infectados e na segunda coluna, dos animais infectados, utilizadas para análise no ImageJ. Zoom de 2,5x. (Escala: 25  $\mu$ m). A terceira coluna mostra imagens de macrófagos de animais infectados com zoom de 8x utilizados para o corte ortogonal (Escala: 5  $\mu$ m). As imagens menores mostram os cortes ortogonais. As imagens foram capturadas no microscópio confocal Leica SP5 e o corte ortogonal foi realizado no programa LAS AF Leica. Pin hole 1,26 Airy, 1 frame average, 3 lines average.



**Figura 29.** Intensidade de Fluorescência Média de PPAR- $\gamma$  nos macrófagos peritoneais dos camundongos infectados ou não com o *Plasmodium berghei* ANKA. A) PPAR- $\gamma$  nuclear. B) PPAR- $\gamma$  citoplasmático. C) PPAR- $\gamma$  total. D) Razão núcleo:citoplasma. Os dados estão representados em medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos da análise de 5 grandes campos de imagens com zoom de 1x, ajustados para 100 células. Métodos estatísticos: Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Grupos com n=5. Avaliação em duplicata. Os valores de p foram apresentados na figura.

## 5.9. Corpúsculos lipídicos

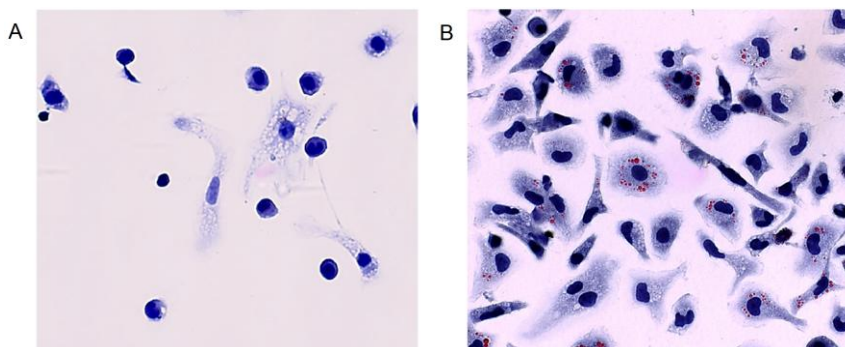
A presença de corpúsculos lipídicos nos macrófagos peritoneais foi avaliada no sexto dia da infecção, inicialmente utilizando a sonda fluorescente BODIPY que marca lipídeos neutros. Por essa metodologia, observamos que houve um aumento do padrão de fluorescência nas três linhagens após a infecção com o *Plasmodium berghei*. Contudo, esse padrão foi similar entre as três linhagens. Já nos controles, somente nos macrófagos dos camundongos BALB/c foram encontrados alguns poucos corpúsculos lipídicos no citoplasma da célula (Figura 30).



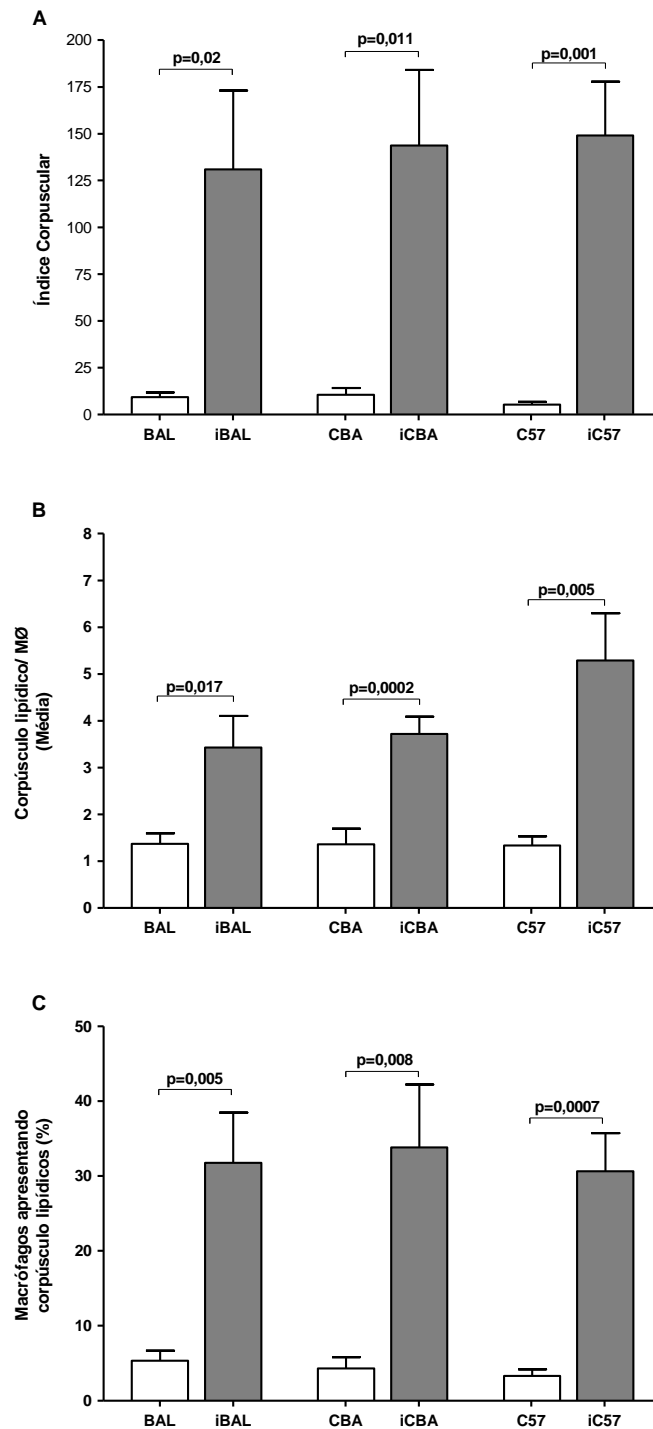
**Figura 30. Presença de corpúsculos lipídicos nos macrófagos peritoneais de camundongos infectados ou não com o *Plasmodium berghei* ANKA no sexto dia de infecção.** A coloração verde mostra os lipídios neutros marcados com a sonda fluorescente BODIPY, enquanto a coloração em azul mostra os núcleos marcados com DAPI. A primeira coluna mostra a marcação observada nos macrófagos peritoneais dos camundongos não infectados (BAL, CBA, C57) e, na segunda, os macrófagos dos animais infectados (iBAL, iCBA e iC57). Todos os três grupos infectados apresentaram uma intensidade maior de marcação dentro do citoplasma das células. As imagens foram capturadas no microscópio confocal Leica SP5 e o tratamento das mesmas foi realizado com o programa ImageJ. Pin hole 1,26 Airy, 1 frame average, 3 lines average, zoom de 5X. Escala: 7,5  $\mu$ m.

Para quantificar os corpúsculos lipídicos, foi feita a coloração com óleo vermelho (oil red) que cora os lipídios neutros presentes na membrana e interior dos corpúsculos lipídicos (Figura 31). Em todos os animais não infectados, uma pequena quantidade de corpúsculos lipídicos foi observada no citoplasma, contudo essa quantidade basal não foi diferente entre os camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 ( $p=0,996$ , ANOVA), assim como não foi diferente a quantidade de macrófagos com os corpúsculos em seu interior ( $p=0,518$ , ANOVA).

Por outro lado, a infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA aumentou a produção de corpúsculos lipídicos em todas as três linhagens, porém, nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos infectados. Na linhagem de camundongos BALB/c, a infecção promoveu um aumento de 10,1 vezes do Índice corpuscular (IC) em relação aos animais não infectados (BAL:10,1 x iBAL: 102,4;  $p=0,02$ , teste *t* com correção de Welch). Esse aumento ocorreu devido a um maior número percentual de células apresentando corpúsculos ( $p=0,005$ , teste *t* com correção de Welch) e uma maior quantidade de corpúsculos em cada macrófago ( $p=0,017$ , teste *t* com correção de Welch). O mesmo foi observado para os outros grupos infectados. O IC do grupo infectado CBA foi 18,2 vezes maior do que o grupo não infectado (CBA: 5,0 x iCBA: 90,8;  $p=0,011$ , teste *t* com correção de Welch). Já o IC do grupo infectado C57BL/6 foi 30,3 vezes maior do que seu grupo não infectado (C57: 5,4 x iC57: 163,8;  $p=0,001$ , teste *t* com correção de Welch). Quando os animais infectados foram comparados entre si, nenhuma diferença estatística foi observada em relação aos IC, à porcentagem de células apresentando corpúsculos e o número médio de corpúsculos por macrófago ( $p=0,941$ , ANOVA;  $p=0,946$ , ANOVA; e  $p=0,269$ , Kruskal-Wallis, respectivamente; Figura 32).



**Figura 31.** Imagens representativas da coloração de corpúsculos lipídicos com óleo vermelho (*Oil red*). Os macrófagos coletados no sexto dia da infecção foram fixados em formalina, corados com *oil red* e contracorados com hematoxilina de Mayer. A figura acima mostra o aspecto da coloração nos animais não infectados (A) e infectados (B). As imagens foram capturadas em um microscópio Axiophot Leica TCS SP5. Aumento: 620X.



**Figura 32. Índice corpuscular dos animais infectados ou não pelo *Plasmodium berghei* ANKA.**

Os macrófagos foram corados por *Oil red* para evidenciar os corpúsculos lipídicos. A quantificação do número de macrófagos apresentando corpúsculos lipídicos e a média dos corpúsculos por macrófago foi realizada por microscopia óptica de luz em objetiva de imersão por três indivíduos diferentes. O IC representa o produto da multiplicação da média de corpúsculos por célula pela porcentagem de macrófagos apresentando corpúsculos lipídicos. (A) Índice Corpuscular. A infecção aumentou o IC em todos os grupos. (B) Número de corpúsculos lipídicos por macrófago. (C) Porcentagem de macrófagos com corpúsculos lipídicos. Nenhuma diferença foi observada entre os animais não infectados ou entre os infectados. Os dados estão representados em média e SEM. Os valores de p foram apresentados na figura e os testes estatísticos utilizados foram o teste t com correção por Welch. Grupos com n= 9.

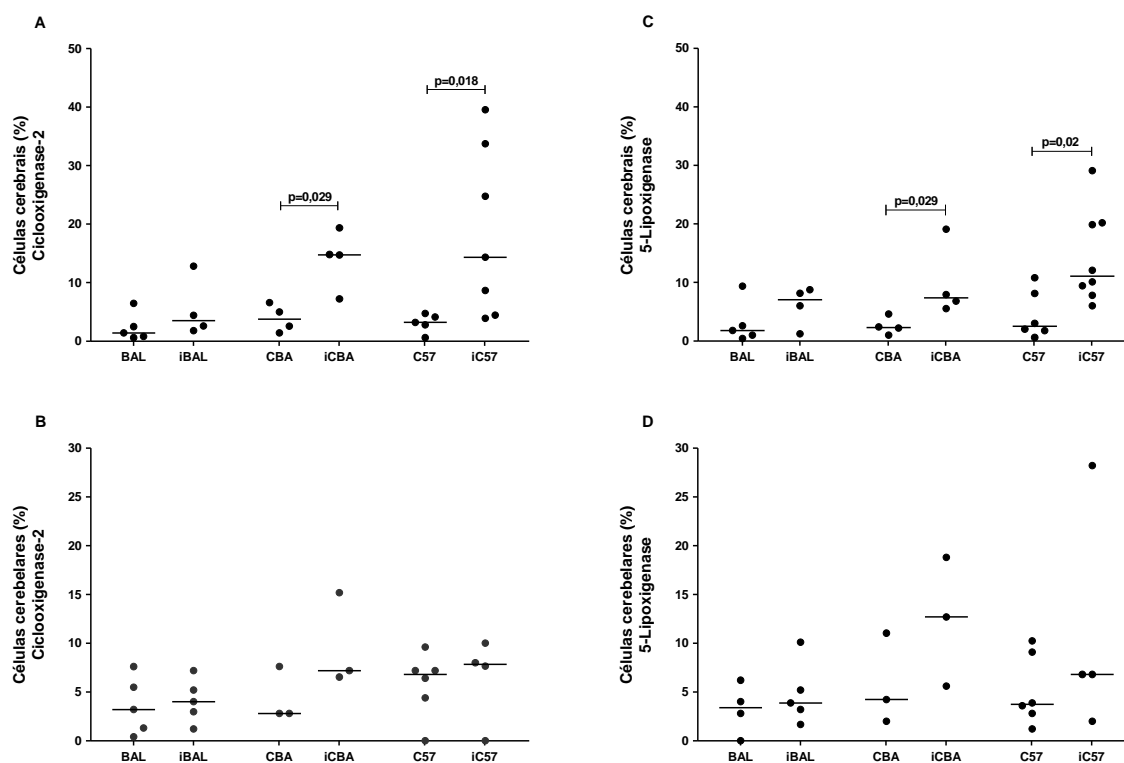
## 5.10. Expressão de COX-2 e 5-LOX

As enzimas ciclooxigenase 2 e 5-lipoxigenase são responsáveis junto com outras pela formação de prostaglandinas e leucotrienos, respectivamente; sendo produzidas e estocadas principalmente nos corpúsculos lipídicos. Para avaliar a produção dessas enzimas na malária, o COX-2 e o 5-LOX foram marcados nos macrófagos peritoneais e nas micróglia, no cérebro e no cerebelo coletados de animais não infectados (BAL, CBA e C57) ou infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA (iBAL, iCBA e iC57) após seis dias de infecção, por imunohistoquímica, e foi quantificada a porcentagem de células positivas no tecido cerebral e cerebelar e nos vasos. A avaliação da COX-2 e a 5-LOX nos macrófagos peritoneais e na micróglia foi realizada por citometria de fluxo.

Para melhor descrever os resultados da imunohistoquímica, os dados da COX-2 e 5-LOX no cérebro e no cerebelo foram descritos separadamente. Os resultados encontrados no tecido cerebral e a expressão destas enzimas nos vasos também foram individualizados.

### 5.10.1. Quantificação de COX-2 e 5-LOX nas células do tecido cerebral e cerebelar por imunohistoquímica

Antes da infecção, a produção basal de COX-2 e 5-LOX foi semelhante em todas as linhagens, porém após a infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA, somente os camundongos que desenvolvem a forma cerebral da malária apresentaram aumento na porcentagem de neurônios e células gliais positivas (Figura 33A). Houve um aumento da quantidade de células positivas para COX-2 de 3,8% nos camundongos não infectados para 14,8% nos camundongos infectados da linhagem CBA ( $p=0,028$ , Mann-Whitney) e de 3,2% para 14,3% nos camundongos C57BL/6 infectados ( $p=0,018$ , Mann-Whitney). Já em relação à enzima 5-LOX, houve aumento da quantidade de células positivas de 2,9% para 7,4% nos camundongos CBA infectados ( $p=0,029$ , Mann-Whitney) e de 2,5% para 11,1% nos camundongos C57BL/6 infectados ( $p=0,018$ , Mann-Whitney; Figura 33C). Contudo, no cerebelo nenhuma diferença foi observada na quantidade de COX-2 e 5-LOX entre as três linhagens infectadas pelo *Plasmodium berghei* ANKA ou não infectadas (Figura 33B e D).



**Figura 33. Quantificação de células cerebrais e cerebelares com marcação positiva para COX-2 e 5-LOX por imunohistoquímica.** No sexto dia de infecção, cortes coronais de 5  $\mu$ m de espessura abrangendo regiões do córtex, hipocampo, tálamo e cerebelo de animais não infectados (BAL, CBA e C57) ou infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA (iBAL, iCBA e iC57) foram imunomarcados com anti-COX-2 e anti-5-LOX. Foram analisadas 500 células nas regiões de córtex, hipocampo e tálamo e 250 células no cerebelo com o auxílio do programa ImageScope (Aperio Technologies Inc, Vista, CA, USA). Porcentagem de células cerebrais (A) e cerebelares (B) imunomarcadas com COX-2; Porcentagem de células cerebrais (C) e cerebelares (D) imunomarcadas 5-LOX. Nos camundongos suscetíveis à malária cerebral houve aumento da quantidade de células cerebrais positivas para COX-2 e 5-LOX, mas o mesmo não ocorreu no cerebelo (Mann-Whitney).

### 5.10.2. Avaliação da expressão de COX-2 e 5-LOX nos macrófagos peritoneais e na micróglia

A avaliação por citometria de fluxo mostrou que somente a intensidade de fluorescência da 5-LOX nos macrófagos peritoneais variou nos animais não infectados ou infectados (Tabela 06). Antes da infecção, os camundongos C57BL/6 apresentaram uma intensidade de fluorescência de 5-LOX nos macrófagos (2542) maior do que a dos macrófagos dos camundongos BALB/c (505) e CBA (1619) ( $p=0,038$ , Kruskal-Wallis). Nos animais C57BL/6 infectados pelo *Plasmodium berghei* houve diminuição significativa da intensidade de fluorescência para a 5-LOX (1060) nos macrófagos em relação ao seu grupo não infectado ( $p=0,029$ , Mann-Whitney), sendo que esse valor foi menor do que aqueles apresentados pelos camundongos CBA (1773) e BALB/c (2371) infectados pelo plasmódio ( $p=0,031$ ,



Kruskal-Wallis). Além disso, a intensidade de fluorescência dos macrófagos peritoneais foi maior do que da micróglia.

**Tabela 06. Quantificação da COX-2 e 5-LOX nos macrófagos peritoneais e micróglia por citometria de fluxo.** Análise realizada por citometria de fluxo indicando a intensidade fluorescência média (IFM) das enzimas em macrófagos peritoneais e micróglia cerebrais e cerebelares de camundongos das linhagens BALB/c, CBA e C57BL/6 não infectados ou infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA no sexto dia da infecção.

Ciclooxigenase-2						
Grupo	Macrófagos peritoneais positivos (IFM) Mediana (quartis)			Micróglia positiva (IFM) Mediana (quartis)		
	BALB/c (n=5)	CBA (n=5)	C57BL/6 (n=5)	BALB/c (n=5)	CBA (n=5)	C57BL/6 (n=5)
Não infectado	1461 (881 – 2445)	767 (652 – 1217)	1644 (723 – 3994)	23,1 (15,7 – 36,4)	34,8 (27,4 – 36,9)	24,9 (18,7 – 36,8)
Infectado	2308 (978 – 2361)	621 (449 – 1794)	1389 (908 – 2406)	23,4 (9,6 – 28,3)	28,8 (21,9 – 41,4)	24,6 (17,6 – 29,4)
**Teste (p)	0,786	0,556	0,548	0,556	0,463	1,000
BAL x CBA x C57***	p=0,221			p=0,336		
iBAL x iCBA x iC57***	p=0,155			p=0,349		
5-Lipoxigenase						
Grupo	Macrófagos peritoneais positivos (IFM) Mediana (quartis)			Micróglia positiva (IFM) Mediana (quartis)		
	BALB/c (n=5)	CBA (n=5)	C57BL/6 (n=5)	BALB/c (n=5)	CBA (n=5)	C57BL/6 (n=5)
Não infectado	505 (327 – 2369)	1619 (1162 – 1961)	2542 (2469 – 2836)	6,0 (5,2 – 12,8)	9,9 (7,4 – 11,7)	12,2 (7,1 – 13,8)
Infectado	2371 (1852 – 2642)	1773 (1422 – 2004)	1060 (595 – 1589)	6,9 (4,8 – 23,6)	9,6 (7,1 – 10,9)	11,5 (10,3 – 19,6)
**Teste (p)	0,250	0,556	0,029*	0,857	0,730	1,000
BAL x CBA x C57***	p=0,038*			p=0,427		
iBAL x iCBA x iC57***	p=0,031*			p=0,364		

\*p significativo \*\* Mann-Whitney \*\*\* Kruskal-Wallis.

### 5.10.3. Avaliação da expressão de COX-2 e 5-LOX nos vasos cerebrais e cerebelares

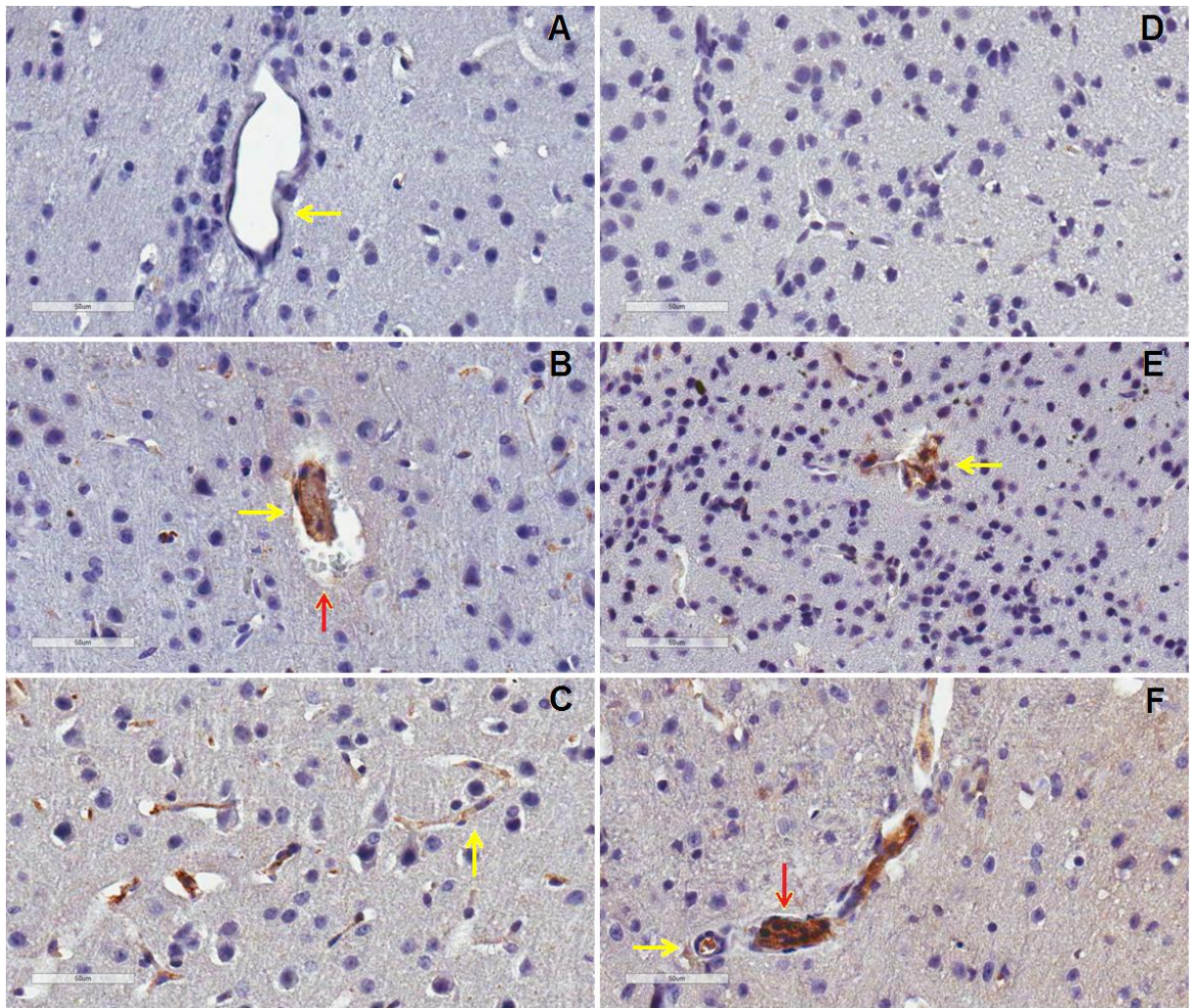
Nos vasos cerebrais uma pequena quantidade de COX-2 e 5-LOX foi expressa de maneira semelhante nas células endoteliais dos animais não infectados. No sexto dia da infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA, houve aumento do número de vasos cerebrais apresentando COX-2 nos animais CBA e C57BL/6. A frequência de vasos com os padrões 2 e 3, que estão associados à vasos congestionados ou à células aderidas ao endotélio, foram mais frequentes nos

animais suscetíveis à forma cerebral. Houve aumento do padrão 3, que representa vasos com forte marcação do endotélio e das células no seu interior, nos animais CBA infectados (1,7% para 21,7%;  $p=0,028$ , Mann-Whitney), enquanto que predominou o padrão 2 que representa vasos com uma marcação parcial nos animais da linhagem C57BL/6 infectados (6,7% para 18,3%;  $p=0,047$ , Mann-Whitney; Figura 34 e tabela 07).

No cerebelo, nos animais não infectados, alguns vasos apresentaram o padrão 1, no qual somente as células endoteliais estavam marcadas para COX-2, sendo que os camundongos resistentes BALB/c expressaram uma quantidade menor do que os animais das linhagens suscetíveis (Kruskal-Wallis,  $p=0,023$ , seguido pelo método de Dunn: BAL<C57<

CBA). O mesmo padrão ocorreu nos animais infectados, contudo o modelo C57BL/6 apresentou a maior quantidade de vasos com a marcação no endotélio (Kruskal-Wallis,  $p=0,033$ , seguido pelo método de Dunn: iBAL<iCBA <iC57. Tabela 07). Já o padrão de produção de COX-2 foi semelhante entre os animais suscetíveis à forma cerebral, porém quando infectados, somente os camundongos da linhagem CBA apresentam vasos com o padrão 3 ( $p=0,040$ , Kruskal-Wallis).

Apesar da 5-LOX ser produzida em pequenas quantidades nos vasos cerebrais, nos camundongos C57BL/6 infectados, essa produção foi mais intensa, sendo o padrão 3 o preponderantemente observado nesses animais (0 para 19,0%;  $p=0,005$ , Mann-Whitney). O mesmo ocorreu no cerebelo, porém, o padrão 1 em que as células endoteliais estão positivas para 5-LOX foi o que predominou na linhagem C57BL/6 dos animais infectados (C57: 26,7% versus iC57: 48,1%;  $p=0,04$ , Mann-Whitney; Figura 34 e tabela 08).



**Figura 34. Imagens representativas da expressão de COX-2 e 5-LOX nos vasos cerebrais na malária experimental.** Imunohistoquímica realizada em cortes coronais de 5  $\mu$ m do cérebro e cerebelo de camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 não infectados e infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA no sexto dia da infecção. Foram analisados vasos no córtex, no hipocampo, no tálamo e no cerebelo. Células positivas apresentam marcação em marrom. As imagens foram capturadas com o scanner Aperio ScanScope®. Escala: 50  $\mu$ m. Aumento de 400x. Em A (COX-2) e D (5-LOX): BALB/c infectados: predomínio de vasos com padrão 0 e 1. Ausência de congestão, sequestro ou vasodilatação. Seta amarela indica vasos com o padrão 0. Em B (COX) e E (LOX): CBA infectados: Setas amarelas representam o padrão 3 onde os vasos estavam congestionados com eritrócitos aderidos. Note a micro-hemorragia na região perivascular (seta vermelha). Em C (COX) e F (LOX): C57BL/6 infectados: setas amarelas mostrando vasos com padrão 2. Note a marcação nos microcapilares. Em F, a seta vermelha mostra vaso com o padrão 3.

**Tabela 07. Quantificação da COX-2 nos vasos cerebrais e cerebelares.** Imunomarcção realizada em cortes coronais de 5 µm de cérebros e cerebelos de camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 não infectados ou infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA, no sexto dia de infecção. Foram analisados 30 vasos nas regiões de córtex, hipocampo e tálamo e 15 no cerebelo com o auxílio do programa ImageScope (Aperio Technologies Inc, Vista, CA, USA). Os resultados foram apresentados em porcentagem (%).

Ciclooxigenase-2 - Cérebro					
Grupos	Padrão				
	0 Mediana (quartis)	1 Mediana (quartis)	2 Mediana (quartis)	3 Mediana (quartis)	
BALB/c	Não infectados (n=5)	70,0 (68,3 – 81,7)	13,3 (10,0 – 21,7)	0,0 (0,0 – 11,7)	0,0 (0,0 – 5,0)
	Infectados (n=4)	60,0 (42,3 – 68,3)	23,3 (15,0 – 31,7)	11,2 (5,0 – 15,6)	3,3 (0,0 – 14,2)
	**Teste (p)	0,062	0,211	0,211	0,589
CBA	Não infectados (n=4)	63,3 (42,5 – 81,7)	28,3 (12,5 – 41,7)	6,7 (3,3 – 15,0)	1,7 (0,0 – 3,4)
	Infectados (n=4)	30,0 (17,5 – 32,5)	40,0 (24,2 – 48,3)	15,0 (10,8 – 21,7)	21,7 (9,2 – 29,2)
	**Teste (p)	*0,029	0,378	0,186	*0,028
C57BL/6	Não infectados (n=5)	60,0 (31,7 – 85,0)	13,3 (13,3 – 40,0)	6,7 (1,7 – 11,7)	0,0 (0,0 – 0,0)
	Infectados (n=8)	19,1 (4,6 – 55,0)	40,8 (27,5 – 53,6)	18,3 (11,7 – 26,7)	8,3 (0,0 – 15,8)
	**Teste (p)	0,091	0,090	*0,047	0,095
*** (p)	BAL x CBA x C57	0,048*	0,523	0,539	0,499
	iBAL x iCBA x iC57	0,119	0,128	0,271	0,178
Ciclooxigenase-2 - Cerebelo					
Grupos	Padrão				
	0 Mediana (quartis)	1 Mediana (quartis)	2 Mediana (quartis)	3 Mediana (quartis)	
BALB/c	Não infectados (n=5)	80,0 (66,7 – 96,7)	13,3 (10,0 – 21,7)	0,0 (0,0 – 13,3)	0,0 (0,0 – 0,0)
	Infectados (n=5)	47,1 (46,4 – 86,7)	20,0 (8,8 – 28,7)	15,4 (3,3 – 22,2)	0,0 (0,0 – 6,8)
	**Teste (p)	0,172	0,461	0,280	0,723
CBA	Não infectados (n=3)	40,0 (26,7 – 53,3)	40,0 (40,0 – 41,0)	20,0 (6,7 – 33,3)	0,0 (0,0 – 0,0)
	Infectados (n=3)	26,7 (6,7 – 33,3)	33,3 (33,3 – 46,7)	13,3 (6,7 – 26,7)	33,3 (6,7 – 33,3)
	**Teste (p)	0,268	0,658	0,825	0,076
C57BL/6	Não infectados (n=5)	70,0 (28,3 – 80,0)	26,7 (10,0 – 30,0)	0,0 (0,0 – 6,7)	0,0 (0,0 – 0,0)
	Infectados (n=5)	40,0 (16,7 – 60,0)	50,0 (30,0 – 63,3)	20,0 (6,7 – 20,0)	0,0 (0,0 – 3,3)
	**Teste (p)	0,173	0,074	0,057	1,000
*** (p)	BAL x CBA x C57	0,053	0,023*	0,075	>0,05
	iBAL x iCBA x iC57	0,061	0,033*	0,931	0,040*

\*p significativo \*\* Mann-Whitney \*\*\* Kruskal-Wallis.

**Tabela 08. Quantificação da 5-LOX nos vasos cerebrais e cerebelares.** Imunomarcção realizada em cortes coronais de 5 µm de cérebros e cerebelos de camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 não infectados ou infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA no sexto dia de infecção. Foram analisados 30 vasos nas regiões de córtex, hipocampo e tálamo e 15 no cerebelo com o auxílio do programa ImageScope (Aperio Technologies Inc, Vista, CA, USA). Os resultados foram apresentados em porcentagem (%).

5-Lipoxigenase - Cérebro					
Grupos	Padrão				
	0 Mediana (quartis)	1 Mediana (quartis)	2 Mediana (quartis)	3 Mediana (quartis)	
BALB/c	Não infectados (n=4)	69,1 (48,9 - 90,6)	18,3 (4,9 - 32,5)	9,90 (2,2 - 15,3)	1,8 (0,0 - 4,1)
	Infectados (n=4)	43,34 (31,7 - 70,0)	38,3 (21,7 - 42,5)	15,0 (8,3 - 26,7)	0,00 (0,0 - 2,5)
	**Teste (p)	0,200	0,114	0,486	0,408
CBA	Não infectados (n=4)	61,65 (39,8 - 80,8)	22,0 (14,1 - 29,3)	11,6 (5,0 - 23,8)	3,3 (0,0 - 8,5)
	Infectados (n=4)	41,67 (30,0 - 43,3)	36,7 (23,3 - 40,0)	20,0 (15,0 - 25,0)	6,7 (0,8 - 17,5)
	**Teste (p)	0,200	0,114	0,343	0,459
C57BL/6	Não infectados (n=5)	66,7 (57,5 - 78,3)	33,3 (15,0 - 39,2)	3,3 (0,0 - 8,3)	0,0 (0,0)
	Infectados (n=6)	43,3 (27,3 - 63,3)	22,2 (16,7 - 27,3)	11,1 (6,7 - 19,0)	19,0 (0,0 - 30,0)
	**Teste (p)	0,073	0,268	0,073	0,005
*** (p)	BAL x CBA x C57	0,819	0,418	0,179	0,376
	iBAL x iCBA x iC57	0,807	0,111	0,348	0,075
5-Lipoxigenase - Cerebelo					
Grupos	Padrão				
	0 Mediana (quartis)	1 Mediana (quartis)	2 Mediana (quartis)	3 Mediana (quartis)	
BALB/c	Não infectados (n=4)	64,4 (13,9 - 88,3)	14,4 (1,7 - 25,6)	0,0 (0,0 - 16,7)	0,0 (0,0)
	Infectados (n=5)	46,7 (33,3 - 83,3)	26,7 (6,7 - 33,3)	20,0 (3,3 - 26,7)	0,0 (0,0 - 16,7)
	**Test (p)	0,905	0,387	0,306	0,560
CBA	Não infectados (n=3)	46,1 (40,0 - 60,0)	40,0 (30,8 - 40,0)	0,0 (0,0 - 23,1)	0,0 (0,0 - 20,0)
	Infectados (n=3)	26,7 (13,3 - 50,0)	30,0 (20,0 - 46,7)	26,7 (20,0 - 33,3)	6,7 (0,0 - 26,7)
	**Test (p)	0,400	0,658	0,184	0,643
C57BL6	Não infectados (n=5)	60,0 (56,7 - 86,7)	26,7 (13,3 - 36,7)	0,0 (0,0 - 13,3)	0,0 (0,0)
	Infectados (n=4)	34,8 (26,7 - 48,2)	48,1 (35,7 - 58,3)	15,5 (13,6 - 19,2)	0,0 (0,0)
	**Test (p)	0,019*	0,049*	0,133	0,456
*** (p)	BAL x CBA x C57	0,326	0,072	0,931	0,223
	iBAL x iCBA x iC57	0,272	0,067	0,183	0,208

\*p significativo    \*\* Mann-Whitney    \*\*\* Kruskal-Wallis.

## 5.11. Análise histopatológica e micro-estrutural

A análise por microscopia eletrônica de varredura foi realizada nos cérebros e a análise histopatológica foi realizada em secções cerebrais e cerebelares de 5 µm dos animais não infectados (BAL, CBA e C57) ou infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA (iBAL, iCBA e iC57) no sexto dia da infecção. O perímetro total da secção avaliada variou entre 26,3 a 34,1 mm, compreendendo uma área total analisada de 25,4 a 45,9 mm<sup>2</sup>. Uma quantidade entre 29 a 35 vasos foi analisada por animal, totalizando entre 146 a 177 vasos avaliados por grupo de estudo. Os vasos foram estudados nas regiões corticais, talâmicas, hipocampais e cerebelares e possuíam um perímetro em torno de 30 a 80 µm. Tanto vênulas pós-capilares como arteríolas foram avaliadas no trabalho e os principais achados como a congestão, obstrução por leucócitos, aderência de leucócitos e eritrócitos foram observados nas vênulas pós-capilares. O tratamento estatístico não revelou diferença na quantidade de vasos avaliada entre os grupos de animais e os dados morfométricos foram semelhantes entre os grupos (Tabela 09).

O estudo histopatológico mostrou que no sexto dia de infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA, alguns animais infectados de cada linhagem apresentaram pequena quantidade de focos micro-hemorrágicos que ocorreram principalmente no cerebelo. O infiltrado inflamatório foi observado somente no tálamo de alguns animais do grupo iBAL e no cerebelo de alguns animais do grupo iC57. Nenhuma região com necrose neuronal ou parenquimatosa foi observada nos animais (tabela 10 e A-57 e A-58 no apêndice).

Os dois modelos que desenvolvem a forma cerebral da malária quando infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA apresentaram diferenças em alguns parâmetros histopatológicos (Figura 35). Após a infecção, os camundongos C57BL/6 apresentaram, em uma área de 1mm<sup>2</sup>, uma média de 20,2% de leucócitos aderidos em microvasos ( $p=0,01$ , Mann-Whitney, Figura 35I), 6,1% de vasos obstruídos por leucócitos ( $p=0,026$ , Mann-Whitney, Figura 35F), 20,1% de congestão vascular ( $p=0,032$ , Mann-Whitney, Figura 35L) e nenhuma alteração na quantidade de eritrócitos aderidos quando comparados com os animais não infectados ( $p=0,518$ , Mann-Whitney, tabela 11). O córtex e o hipocampo desses animais apresentaram uma quantidade significativa de vasos com aderência de leucócitos (Mann-Whitney,  $p=0,015$  e  $p=0,045$ , respectivamente, tabela 12) e a obstrução vascular por

leucócitos e a congestão foram observadas principalmente no córtex (respectivamente,  $p=0,026$  e  $p=0,019$ , Mann-Whitney; tabela 13).

Os camundongos CBA apresentaram, em uma área de  $1 \text{ mm}^2$ , uma média de 15,2% de microvasos congestionados ( $p=0,0004$ , Mann-Whitney; Figura 35 K), principalmente pela presença de grande quantidade de eritrócitos aderidos (21,7%;  $p=0,012$ , Mann-Whitney; Figura 35E) e também pela aderência de leucócitos (9,4%;  $p=0,011$ , Mann-Whitney; Figura 35H e tabela 11). A aderência de eritrócitos foi observada principalmente no córtex e hipocampo ( $p=0,029$  e  $p=0,009$ , Mann-Whitney, respectivamente), já a congestão vascular foi mais frequente no hipocampo ( $p=0,045$ , Mann-Whitney) (Tabelas 14 e 15).

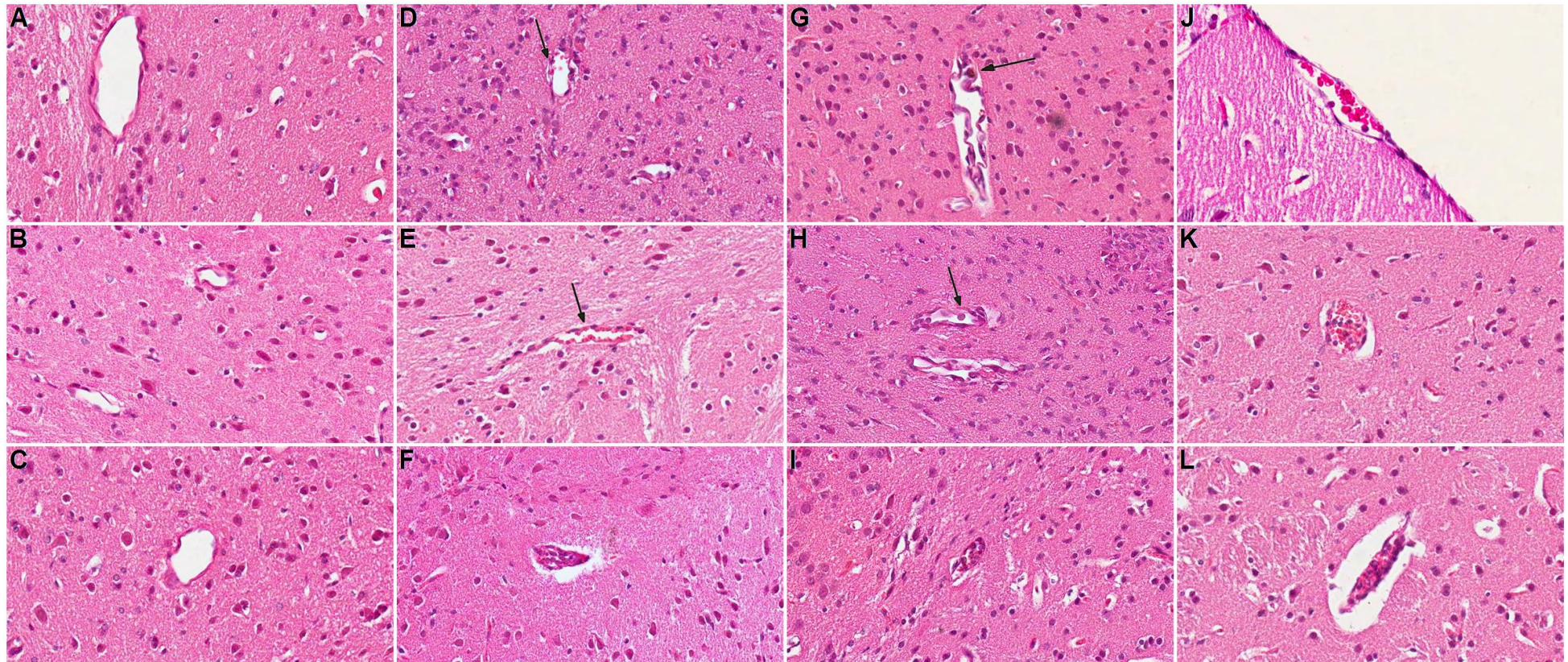
Contudo, apesar da aderência leucocitária ocorrer nos dois modelos suscetíveis, nos animais C57BL/6, a quantidade aderida foi 2,15 vezes maior (média: 20,2%) do que nos animais CBA (9,4%), em uma área de  $1 \text{ mm}^2$ . Além disso, os dois modelos diferem primeiro pela presença de eritrócitos aderidos nos vasos, que não foi significativo nos camundongos C57BL/6, mas que esteve presente em maior quantidade (média: 21,7%) nos camundongos CBA; e depois pela obstrução vascular por leucócitos, que esteve presente nos camundongos C57BL/6, mas que foi praticamente inexistente nos camundongos CBA. Esses mesmos achados foram observados pelas análises no microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Figura 36 E e F).

No modelo de camundongos resistente, os dois achados mais importantes após a infecção, tanto no MEV (Figura 36 D) quanto na histopatologia, foram a aderência de eritrócitos e leucócitos. Os camundongos BALB/c apresentaram em média 10,1% de vasos com aderência de eritrócitos por  $1 \text{ mm}^2$  ( $p=0,011$ , Mann-Whitney; Figura 35D; Tabela 11), principalmente na região cortical e talâmica ( $p=0,026$ , Mann-Whitney; Tabela 15). Essa ocorrência foi maior do que a observada nos camundongos C57BL/6 (6,4%) e menor do que a observada nos camundongos CBA (21,7%) ( $p=0,007$ , Kruskal-Wallis). Já a aderência de leucócitos foi visualizada em 6,7% dos vasos/ $\text{mm}^2$  ( $p=0,01$ , Mann-Whitney; Figura 35G), principalmente no tálamo ( $p=0,026$ , Mann-Whitney; Tabela 12). Porém, essa quantidade foi 1,4 e 3,0 vezes menor do que o observado nos camundongos CBA e C57BL/6, respectivamente ( $p=0,025$ , Kruskal-Wallis).

**Tabela 09. Análise morfométrica das secções histológicas e dos vasos cerebrais e cerebelares na malária experimental.** A análise foi realizada vaso a vaso em grupos de animais BALB/c, CBA e C57BL/6 não infectados e infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA no sexto dia de infecção.

Grupos (n=5)		Quantidade total de vasos analisados	Quantidade média de vasos analisados por animal	Secção				Vaso			
				Perímetro (mm)		Área (mm <sup>2</sup> )		Perímetro (µm)		Área (µm <sup>2</sup> )	
				Mediana	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	Média ± DP
<b>BALB/c</b>	Não infectados	172	34	31,4	30,1 (3,1)	45,9	40,9 (7,8)	59,7	60,5 (0,9)	184,5	199,2 (6,0)
	Infectados	152	30	29,9	26,8 (3,6)	38,8	33,7 (7,1)	50,5	52,1 (1,1)	108,0	119,6 (4,5)
<b>CBA</b>	Não infectados	177	35	34,1	29,1 (3,9)	33,6	35,6 (7,1)	60,2	59,5 (0,9)	179,0	189,2 (5,5)
	Infectados	146	29	26,4	24,3 (2,1)	25,4	28,9 (5,3)	58,5	56,6 (1,1)	141,5	157,8 (6,0)
<b>C57BL/6</b>	Não infectados	162	32	32,7	30,9 (4,3)	37,6	36,4 (8,2)	53,9	55,2 (1,0)	158,0	168,5 (5,7)
	Infectados	153	31	26,3	26,6 (0,9)	28,1	30,1 (3,1)	56,9	57,7 (1,0)	148,0	162,2 (5,5)





**Figura 35. Análise histopatológica dos cérebros.** No sexto dia de infecção, os cérebros foram coletados, após perfusão, de animais não infectados (BAL, CBA e C57) e infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA (iBAL, iCBA e iC57), fixados em paraformaldeído e emblocados em parafina. Cortes de 5 µm foram corados com hematoxilina-eosina e analisados em microscópio óptico de luz (Aumento 400x). Imagens A, B, C representam vasos vazios: (A) BALB/c não infectado; (B) CBA não infectado e (C) C57BL/6 não infectado. A aderência de eritrócitos foi observada em menor quantidade nos camundongos do grupo iBAL (D) e em maior quantidade nos camundongos do grupo iCBA. A seta mostra um vaso com eritrócitos aderidos. (E). A obstrução do vaso por leucócitos foi visualizada em maior quantidade no grupo iC57 (F). A aderência de leucócitos foi observada nos três grupos infectados: iBAL (G), iCBA (H) e iC57 (I), A seta em G mostra um leucócito com hemozoína no seu interior e, em H, a aderência de um leucócito. Os camundongos BALB/c apresentaram alguns vasos com eritrócitos, mas sem muita congestão (J) e os camundongos iCBA (K) e iC57 (L) apresentaram vários vasos congestionados.

**Tabela 10. Achados histopatológicos nos cérebros e cerebelos na malária experimental.** A presença de micro-hemorragia, obstrução por leucócitos e infiltrado inflamatório foi avaliada, vaso a vaso, em secções de 5 µm do cérebro e cerebelo de grupos de camundongos não infectado (BAL, CBA e C57) e infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA (iBAL, iCBA e iC57), no sexto dia de infecção. Os parâmetros micro-hemorragia e infiltrado inflamatório foram avaliados na região perivascular.

Grupos (n=5)	Micro-hemorragia (%)		Obstrução por Leucócitos (%)		Infiltrado Inflamatório (%)		
	Mediana (quartis)	Média ± DP	Mediana (quartis)	Média ± DP	Mediana (quartis)	Média ± DP	
BALB/c	Não infectados	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0
	Infectados	0,0 (0,0 - 5,9)	2,4 ± 1,4	0,0 (0,0 – 1,9)	0,8 ± 0,7	0,0 (0,0 – 0,7)	0,3 ± 0,3
	**Teste (p)	0,441		1,000		1,000	
CBA	Não infectados	0,0 (0,0 -0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 -0,0)	0,0 ± 0,0
	Infectados	0,0 (0,0 – 5,3)	2,1 ± 1,4	0,0 (0,0 – 1,8)	0,7 ± 0,7	0,0 (0,0 -0,0)	0,0 ± 0,0
	**Teste (p)	0,441		1,000		1,000	
C57BL/6	Não infectados	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 -0,0)	0,0 ± 0,0
	Infectados	0,0 (0,0 - 1,4)	0,6 ± 0,3	6,3 (0,0 – 9,9)	6,1 ± 2,2	0,0 (0,0 – 0,7)	0,3 ± 0,2
	**Teste (p)	0,441		*0,026		1,000	
*** (p)	BAL x CBA x C57	—		—		—	
	iBAL x iCBA x iC57	0,858		*0,043		0,985	

Estudo histopatológico por microscopia óptica em cortes corados com hematoxilina-eosina. \*p significativo \*\* Mann-Whitney \*\*\* Kruskal-Wallis

**Tabela 11. Achados histopatológicos nos cérebros e cerebello.** A presença de congestão vascular, aderência de eritrócitos e de leucócitos foi avaliada, vaso a vaso, em secções de 5µm do cérebro e cerebello de grupos de camundongos não infectado (BAL, CBA e C57) e infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA (iBAL, iCBA e iC57), no sexto dia de infecção.

Grupos (n=5)	Congestão Vascular (%)		Aderência de Eritrócitos (%)		Aderência de Leucócitos (%)		
	Mediana (quartis)	Média ± DP	Mediana (quartis)	Média ± DP	Mediana (quartis)	Média ± DP	
BALB/c	Não infectados	5,0 (0,0 – 8,1)	4,2 ± 1,9	0,0 (0,0 – 2,1)	0,8 ± 0,5	0,0 (0,0 - 00)	0,0 ± 0,0
	Infectados	8,3 (2,2 – 13,7)	8,1 ± 3,0	11,1 (5,3 – 14,3)	10,1 ± 2,1	6,2 (3,6 – 10,0)	6,7 ± 1,5
	**Teste (p)	0,524		*0,011		*0,010	
CBA	Não infectados	3,9 (1,2 – 4,3)	3,0 ± 0,8	3,9 (3,1 – 5,6)	4,3 ± 0,6	0,0 (0,0 – 1,3)	0,5 ± 0,3
	Infectados	14,8 (11,9 – 19,0)	15,2 ± 1,8	21,2 (18,6 – 25,1)	21,7 ± 1,5	3,9 (3,6 – 17,8)	9,4 ± 3,6
	**Teste (p)	*0,0004		*0,012		*0,011	
C57BL/6	Não infectados	3,8 (0,6 – 4,6)	2,9 ± 1,0	1,9 (0,0 – 4,7)	2,3 ± 1,2	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0
	Infectados	22,4 (8,5 – 29,4)	20,1 ± 5,6	5,7 (0,0 – 13,1)	6,4 ± 2,9	19,2 (18,4 – 22,3)	20,2 ± 0,9
	**Teste (p)	*0,032		0,518		*0,010	
*** (p)	BAL x CBA x C57	0,757		0,050		0,543	
	iBAL x iCBA x iC57	0,134		*0,007		*0,025	

Estudo histopatológico por microscopia óptica em cortes corados com hematoxilina-eosina. \*p significativo \*\* Mann-Whitney \*\*\* Kruskal-Wallis

**Tabela 12. Quantidade de regiões cerebrais e cerebelares com aderência de leucócitos na malária experimental.** Após seis dias de infecção, a presença de leucócitos aderidos em vasos foi avaliada em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

Grupos (n=5)	Aderência de Leucócitos (%)								
	Córtex		Tálamo		Hipocampo		Cerebelo		
	Med (quartis)	Média ± DP	Med (quartis)	Média ± DP	Med (quartis)	Média ± DP	Med (quartis)	Média ± DP	
<b>BALB/c</b>	Não infectados	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0
	Infectados	8,4 (0,0 – 10,2)	6,2 ± 3,1	7,9 (7,9 – 15,0)	10,3 ± 2,4	0,0 (0,0 – 14,2)	5,7 ± 3,6	6,2 (0,0 – 8,2)	4,5 ± 1,9
**Teste (p)	0,172		*0,026		0,441		0,158		
<b>CBA</b>	Não infectados	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 3,5)	1,4 ± 1,4
	Infectados	4,2 (0,0 – 31,6)	11,9 ± 9,4	0,0 (0,0 – 12,7)	5,1 ± 3,1	14,0 (0,0 – 24,6)	12,7 ± 5,6	3,5 (0,0 – 9,5)	4,5 ± 2,7
**Teste (p)	0,308		0,441		0,373		0,346		
<b>C57BL/6</b>	Não infectados	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0
	Infectados	25,3 (15,8 – 36,6)	25,9 ± 5,4	13,1 (1,3 – 25,6)	13,4 ± 6,4	19,2 (4,3 – 34,8)	19,5 ± 7,0	18,0 (1,1 – 36,0)	18,4 ± 9,4
**Teste (p)	*0,015		0,081		*0,044		0,081		

Estudo histopatológico por microscopia óptica em cortes corados com hematoxilina-eosina. \*p significativo \*\* Mann-Whitney

**Tabela 13. Quantidade de regiões cerebrais e cerebelares com obstrução por leucócitos na malária experimental.** Após seis dias de infecção, a presença de vasos obstruídos por leucócitos foi avaliada em camundongos não susceptíveis (BALB/c) e susceptíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

Grupos (n=5)	Obstrução por Leucócitos (%)								
	Córtex		Tálamo		Hipocampo		Cerebelo		
	Med (quartis)	Média ± DP	Med (quartis)	Média ± DP	Med (quartis)	Média ± DP	Med (quartis)	Média ± DP	
<b>BALB/c</b>	Não infectados	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0
	Infectados	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 – 5,9)	2,4 ± 2,4	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0
**Teste (p)		—		—		—		—	
<b>CBA</b>	Não infectados	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0
	Infectados	0,0 (0,0 – 3,1)	1,0 ± 1,0	0,0 (0,0 – 7,0)	2,8 ± 2,8	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 – 14,5)	5,8 ± 5,8
**Teste (p)		—		—		—		—	
<b>C57BL/6</b>	Não infectados	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0
	Infectados	6,8 (5,5 – 14,3)	8,9 ± 2,7	6,9 (0,0 – 15,7)	7,5 ± 4,4	0,0 (0,0 – 8,6)	3,5 ± 3,5	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0
**Teste (p)		*0,026		0,308		1,000		—	

Estudo histopatológico por microscopia óptica em cortes corados com hematoxilina-eosina. \*p significativo \*\* Mann-Whitney



**Tabela 14. Quantidade de regiões cerebrais e cerebelares com congestão vascular na malária experimental.** Após seis dias de infecção, a presença de vasos congestionados foi avaliada em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

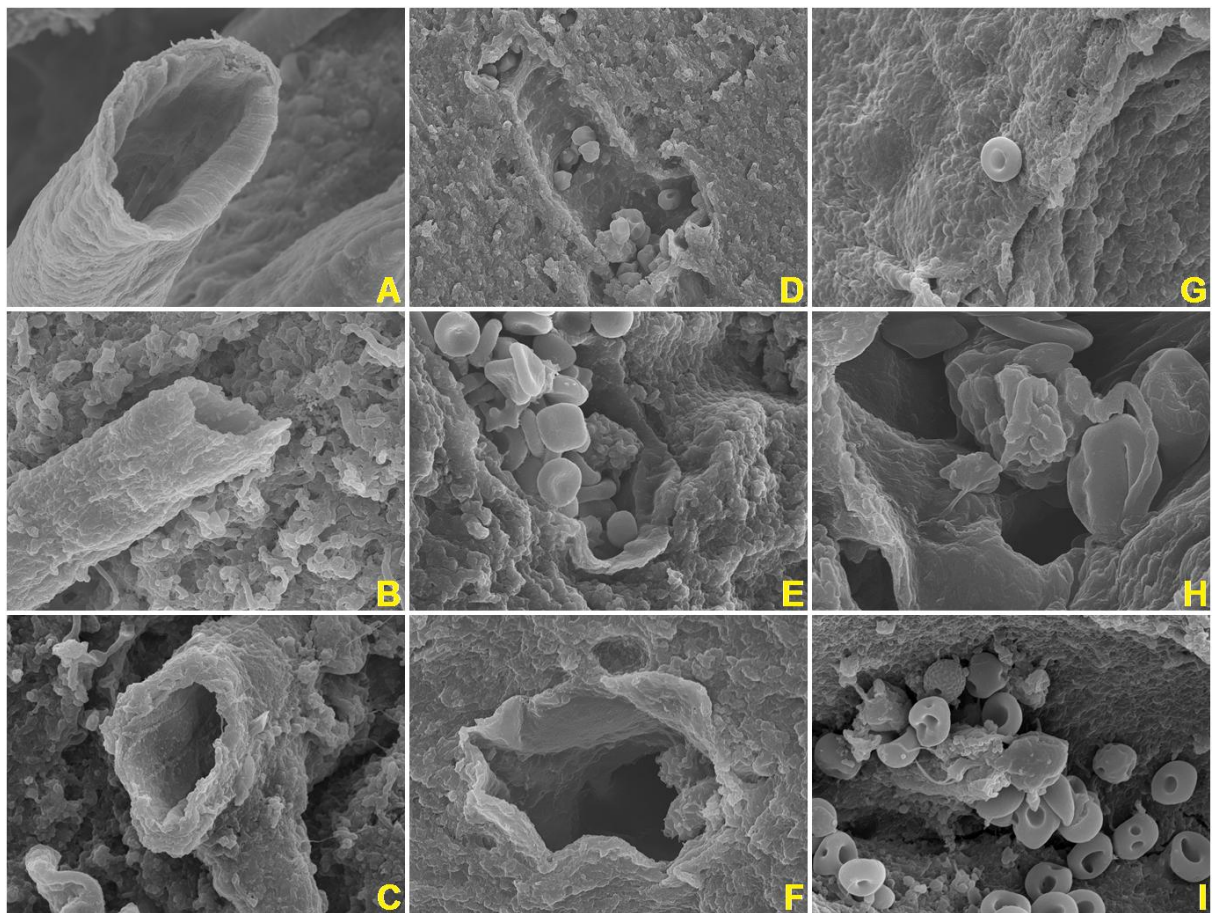
Grupos (n=5)		Congestão Vascular (%)							
		Córtex		Tálamo		Hipocampo		Cerebelo	
		Med (quartis)	Média ± DP	Med (quartis)	Média ± DP	Med (quartis)	Média ± DP	Med (quartis)	Média ± DP
<b>BALB/c</b>	Não infectados	0,0 (0,0 – 11,6)	4,6 ± 2,8	5,8 (0,0 – 9,4)	4,9 ± 2,4	0,0 (0,0 – 6,0)	2,4 ± 1,6	0,0 (0,0 – 14,9)	6,0 ± 4,2
	Infectados	5,1 (0,0 – 7,7)	4,3 ± 2,3	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0	16,7 (0,0 – 21,2)	11,8 ± 5,0	0,0 (0,0 – 17,0)	6,8 ± 4,6
**Teste (p)		0,874		—		0,265		0,906	
<b>CBA</b>	Não infectados	6,1 (0,0 – 11,0)	5,6 ± 2,7	6,2 (0,0 – 8,5)	4,6 ± 2,0	0,0 (0,0 – 3,9)	1,6 ± 1,6	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0
	Infectados	15,8 (11,6 – 20,0)	15,8 ± 2,2	11,3 (0,0 – 21,8)	11,0 ± 5,3	22,3 (8,5 – 30,5)	20,1 ± 5,7	4,4 (0,0 – 11,5)	5,5 ± 3,2
**Teste (p)		0,065		0,389		*0,045		0,158	
<b>C57BL/6</b>	Não infectados	3,7 (0,0 – 7,1)	3,6 ± 1,6	6,0 (0,0 – 7,2)	4,1 ± 1,7	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 – 8,4)	3,4 ± 2,3
	Infectados	30,5 (15,5 – 38,9)	28,3 ± 6,3	9,7 (1,3 – 40,2)	17,1 ± 11,0	0,0 (0,0 – 27,1)	10,8 ± 6,6	19,8 (4,4 – 24,2)	16,1 ± 5,6
**Teste (p)		*0,019		0,533		0,440		0,125	

Estudo histopatológico por microscopia óptica em cortes corados com hematoxilina-eosina. \*p significativo \*\* Mann-Whitney

**Tabela 15. Quantidade de regiões cerebrais e cerebelares com aderência de eritrócitos na malária experimental.** Após seis dias de infecção, a presença de vasos com eritrócitos aderidos foi avaliada em camundongos não susceptíveis (BALB/c) e susceptíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

Grupos (n=5)		Aderência de Eritrócitos (%)							
		Córtex		Tálamo		Hipocampo		Cerebelo	
		Med (quartis)	Média ± DP	Med (quartis)	Média ± DP	Med (quartis)	Média ± DP	Med (quartis)	Média ± DP
<b>BALB/c</b>	Não infectados	0,0 (0,0 – 1,5)	0,6 ± 0,6	0,0 (0,0 – 3,0)	1,2 ± 1,2	0,0 (0,0 – 3,9)	1,6 ± 1,6	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0
	Infectados	16,8 (15,4 – 30,7)	20,9 ± 4,9	15,0 (7,9 – 15,7)	12,9 ± 2,5	11,1 (2,9 – 21,3)	11,9 ± 4,3	0,0 (0,0 – 7,1)	2,8 ± 1,8
**Teste (p)		*0,026		*0,026		0,075		0,441	
<b>CBA</b>	Não infectados	4,1 (3,3 – 6,4)	4,6 ± 0,9	0,0 (0,0 – 4,1)	1,4 ± 1,4	0,0 (0,0 – 2,1)	0,8 ± 0,8	3,0 (0,0 – 9,0)	4,2 ± 2,1
	Infectados	18,5 (8,5 – 39,1)	22,0 ± 8,4	29,0 (11,2 – 63,9)	35,9 ± 12,6	34,0 (25,3 – 55,0)	38,9 ± 7,2	11,4 (1,7 – 25,5)	13,2 ± 5,5
**Teste (p)		*0,029		0,073		*0,009		0,204	
<b>C57BL/6</b>	Não infectados	0,0 (0,0 – 3,7)	1,5 ± 1,5	0,0 (0,0 – 3,3)	1,3 ± 1,3	0,0 (0,0 – 6,9)	2,8 ± 1,8	0,0 (0,0 – 8,4)	3,4 ± 2,7
	Infectados	11,4 (2,7 – 13,3)	9,1 ± 3,1	0,0 (0,0 – 4,0)	1,3 ± 1,3	13,0 (0,0 – 19,2)	10,3 ± 4,4	9,3 (0,0 – 21,2)	10,2 ± 5,9
**Teste (p)		0,081		0,867		0,265		0,502	

Estudo histopatológico por microscopia óptica em cortes corados com hematoxilina-eosina. \*p significativo \*\* Mann-Whitney

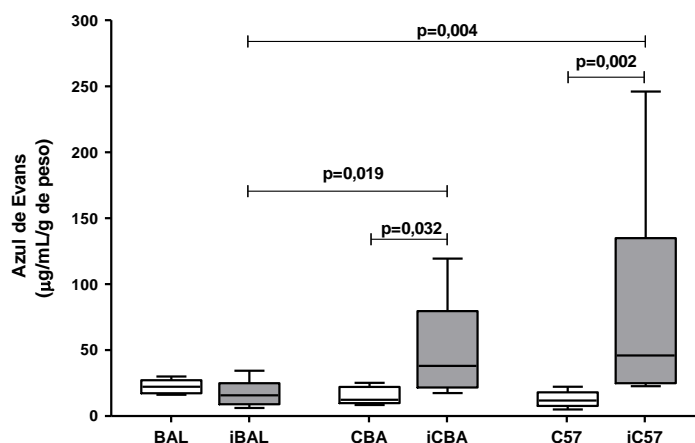


**Figura 36. Avaliação micro-estrutural por microscopia eletrônica de varredura.** Cérebros coletados de camundongos não infectados (BAL, CBA e C57) ou infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA (iBAL, iCBA e iC57) após perfusão com solução de Karnovsky. O cérebro foi lavado com tampão cacodilato de sódio, fixado com tetróxido de ósmio, desidratado em gradientes de acetona, levado ao ponto crítico com CO<sub>2</sub> e depois metalizado com ouro. As imagens dos vasos do córtex foram capturadas com o microscópio eletrônico de varredura a laser JEOL JSM-7001F. Imagens (A, B e C): Vasos vazios de camundongos não infectados da linhagem (A) BALB/c (aumento: 1.500x), (B) CBA (3.000x) e (C) C57BL/6 (3.000x); (D) iBAL: leito de um vaso mostrando eritrócitos e um leucócito aderidos (2.000x); (E) iCBA: vaso mostrando congestão vascular e presença de um leucócito e eritrócitos aderidos (3.500x); (F) iC57: presença de dois leucócitos aderidos no vaso (3.500x); (G) Eritrócito não infectado no cérebro de um camundongo do grupo BAL (3.500x); (H) Imagem destacando a aderência de eritrócito e leucócito no vaso de um camundongo iCBA (9.000 x); (I) Extravasamento de eritrócitos para região perivascular em um camundongo iC57 (3.500x).



## 5.12. Permeabilidade

Para avaliar a integridade da parede vascular cerebral, a técnica do azul de Evans foi realizada no sexto dia após a infecção em camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 não infectados ou infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA. Como era esperado, nos animais não infectados não houve diferença na permeabilidade vascular entre os grupos ( $p=0,108$ , Kruskal-Wallis), mas após a infecção, os grupos de animais suscetíveis à malária cerebral apresentaram maior permeabilidade no cérebro quando comparados ao camundongo resistente BALB/c ( $p=0,005$ , Kruskal-Wallis; Figura 37). Os camundongos C57BL/6 apresentaram o maior aumento de permeabilidade em relação ao seu grupo controle, saindo de 11,8 para 45,9  $\mu\text{g/mL/g}$  de peso cerebral ( $p=0,002$ , Mann-Whitney). Houve aumento da permeabilidade vascular nos animais CBA, após a infecção, de 12,3 para 38,1  $\mu\text{g/mL/g}$  de peso cerebral ( $p=0,032$ , Mann-Whitney). Já nos camundongos BALB/c não foi observada alteração da integridade vascular cerebral após a infecção ( $p=0,190$ , Mann-Whitney).



**Figura 37. Permeabilidade vascular na malária experimental.** Cérebros coletados de camundongos não infectados (BAL, CBA e C57) ou infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA (iBAL, iCBA e iC57) após injeção endovenosa de azul de Evans. Os cérebros foram coletados após 1 hora, lavados e deixados por 48 horas em formamida para extração do corante. Os dados estão representados em medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos. Métodos estatísticos: Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Grupos com  $n=9$ . Os valores de  $p$  foram apresentados na figura.

### **5.13. Sumário dos Resultados Obtidos**

Para uma melhor visualização dos resultados, na tabela 16 estão sintetizados os vários parâmetros estudados nos animais não infectados e após a infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA. A tabela 17 mostra o que ocorre com os parâmetros quando os animais infectados são comparados com os animais não infectados.

**Tabela 16. Comparação dos resultados observados entre os grupos não infectados e os grupos infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA no sexto dia da infecção.**

	Não infectados	Infectados
<b>PARÂMETROS CLÍNICOS</b>		
Início da morte	—	iBAL ~ iCBA > iC57
Tempo mediano de vida	—	iBAL > iCBA ~ iC57
Parasitemia (3º dia)	—	iC57 ~ iCBA > iBAL
Parasitemia (5º dia)	—	iC57 > iCBA ~ iBAL
Parasitemia (8º dia)	—	iC57 > iBAL ~ iCBA
<b>ESPÉCIES REATIVAS</b>		
Óxido Nítrico	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL > iC57
Peróxido de hidrogênio	CBA > C57 ~ BAL	iBAL ~ iCBA > iC57
<b>CORPÚSCULOS LIPÍDICOS</b>		
Índice Corpuscular	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Macrófagos com corpúsculos	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Média de corpúsculos/MØ**	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
<b>RelA (p65)</b>		
Total	BAL > C57 ~ CBA	iBAL > iCBA ~ iC57
Nuclear	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL > iCBA. iC57 (i)
Citoplasmático	BAL > C57 ~ CBA	iBAL > iCBA. iC57 (i)
Razão Nuclear:citoplasmático	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
<b>RelB (p68)</b>		
Total	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA > iC57
Nuclear	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Citoplasmático	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL > iCBA > iC57
Razão Nuclear:citoplasmático	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
<b>NFκB2 (p52)</b>		
Total	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL > iCBA ~ iC57
Nuclear	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Citoplasmático	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL > iC57 ~ iCBA
Razão Nuclear:citoplasmático	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
<b>PPAR-γ</b>		
Total	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Nuclear	C57 > BAL ~ CBA	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Citoplasmático	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Razão Nuclear:citoplasmático	CBA > C57 > BAL	iBAL ~ iCBA ~ iC57
<b>INFLAMASSOMA</b>		
Nalp1	BAL > CBA > C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
ASC	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Caspase1	BAL > CBA ~ C57	iBAL > iCBA ~ iC57
<b>CITOCINAS</b>		
Interleucina 1β	BAL ~ CBA ~ C57	iCBA > iC57. iBAL (i)
Interleucina 4	CBA > C57 > BAL	iCBA > iBAL. iC57 (i)
Interleucina 10	BAL > CBA > C57	iC57 > iBAL ~ iCBA
Interleucina 12	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Interleucina 17	CBA > C57 ~ BAL	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Fator de necrose tumoral	BAL > CBA > C57	iC57 > iBAL ~ iCBA
<b>CICLOOXYGENASE 2</b>		
Células cerebrais	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Células cerebelares	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Micróglia	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Macrófagos	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Vasos cerebrais		
Padrão 0	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Padrão 1	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Padrão 2	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Padrão 3	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Vasos cerebelares		
Padrão 0	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Padrão 1	BAL > CBA. C57 (i)	iC57 > iBAL. iCBA (i)
Padrão 2	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Padrão 3	BAL ~ CBA ~ C57	iCBA > iC57 ~ iBAL
<b>5-LIPOXYGENASE</b>		
Células cerebrais	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Células cerebelares	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Micróglia	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Macrófagos	C57 > CBA ~ BAL	iBAL > iC57. iCBA (i)
Vasos cerebrais		
Padrão 0	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Padrão 1	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Padrão 2	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Padrão 3	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Vasos cerebelares		
Padrão 0	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Padrão 1	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Padrão 2	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Padrão 3	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
<b>PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS</b>		
Permeabilidade vascular	BAL ~ CBA ~ C57	iC57 > iCBA > iBAL
Micro-hemorragia	—	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Congestão vascular	BAL ~ CBA ~ C57	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Obstrução vascular por leucócitos	—	iBAL ~ iCBA ~ iC57
Aderência de eritrócitos	BAL ~ CBA ~ C57	iCBA > iBAL > iC57
Aderência de leucócitos	BAL ~ CBA ~ C57	iC57 > iCBA > iBAL
Infiltrado inflamatório	—	iBAL ~ iCBA ~ iC57

~ : valores foram semelhantes; (i): valores intermediários entre as outras linhagens; — : não apresentou o parâmetro

**Tabela 17. Comparação dos resultados obtidos nas 3 linhagens estudadas, no sexto dia da infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA**

	BALB/c	CBA	C57BL/6
<b>PARÂMETROS CLÍNICOS</b>			
Início da morte	8º dia	8º dia	6º dia
Tempo mediano de vida	18 dias	12 dias	12 dias
Parasitemia (3º dia)	0,2%	1,1%	2,3%
Parasitemia (5º dia)	4,2%	4,3%	15,8%
Parasitemia (8º dia)	16,4%	15,8%	24,9%
<b>ESPÉCIES REATIVAS</b>			
Óxido Nítrico	NA*	NA	↓
Peróxido de hidrogênio	NA	NA	↑
<b>CORPÚSCULOS LIPÍDICOS</b>			
Índice Corpuscular	↑	↑	↑
Macrófagos com corpúsculos	↑	↑	↑
Média de corpúsculos/MØ**	↑	↑	↑
<b>RelA (p65)</b>			
Total	↑	↑	↑
Nuclear	↑	↑	↑
Citoplasmático	↑	↑	↑
Razão Nuclear:citoplasmático	NA	NA	NA
<b>RelB (p68)</b>			
Total	↑	NA	NA
Nuclear	NA	↑	NA
Citoplasmático	↑	NA	NA
Razão Nuclear:citoplasmático	NA	↓	NA
<b>NFκB2 (p52)</b>			
Total	↑	NA	NA
Nuclear	↑	↑	NA
Citoplasmático	↑	NA	NA
Razão Nuclear:citoplasmático	NA	↑	NA
<b>PPAR-γ</b>			
Total	↓	↓	NA
Nuclear	↑	NA	NA
Citoplasmático	↓	↓	NA
Razão Nuclear:citoplasmático	↑	NA	NA
<b>INFLAMASSOMA</b>			
Nalp1	NA	↑	↑
ASC	↑	↑	↑
Caspase1	↑	↑	↑
<b>CITOCINAS</b>			
Interleucina 1β	NA	NA	↓
Interleucina 4	NA	NA	NA
Interleucina 10	↓	↓	↑
Interleucina 12	NA	NA	NA
Interleucina 17	NA	NA	NA
Fator de necrose tumoral	↓	↓	↑
<b>CICLOOXIGENASE 2</b>			
Células cerebrais	NA	↑	↑
Células cerebelares	NA	NA	NA
Micróglia	NA	NA	NA
Macrófagos	NA	NA	NA
Vasos cerebrais			
Padrão 0	NA	↓	NA
Padrão 1	NA	NA	NA
Padrão 2	NA	NA	↑
Padrão 3	NA	↑	NA
Vasos cerebelares			
Padrão 0	NA	NA	NA
Padrão 1	NA	NA	NA
Padrão 2	NA	NA	NA
Padrão 3	NA	NA	NA
<b>5-LIPOXIGENASE</b>			
Células cerebrais	NA	↑	↑
Células cerebelares	NA	NA	NA
Micróglia	NA	NA	NA
Macrófagos	NA	NA	↑
Vasos cerebrais			
Padrão 0	NA	NA	NA
Padrão 1	NA	NA	NA
Padrão 2	NA	NA	NA
Padrão 3	NA	NA	↑
Vasos cerebelares			
Padrão 0	NA	NA	↓
Padrão 1	NA	NA	↑
Padrão 2	NA	NA	NA
Padrão 3	NA	NA	NA
<b>PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS***</b>			
Permeabilidade vascular	NA	↑	↑
Micro-hemorragia	R	R	R
Congestão vascular	—	+	++
Obstrução vascular por leucócitos	R	R	+
Aderência de eritrócitos	+	++	—
Aderência de leucócitos	+	+	++
Infiltrado inflamatório	—	—	—

\* NA: não alterou em relação ao não infectado; \*\* MØ: macrófago; \*\*\* Presença da alteração histopatológica no cérebro e cerebelo: --: Parâmetro não ocorreu; R) 0,5 a 5%; (+) >5 a 20%; (++) >20% a 40%; (+++) >40%.

**DISCUSSÃO**

A malária é uma doença complexa cujo desequilíbrio da resposta imunitária do hospedeiro está associado com um quadro clínico grave que pode levar o indivíduo ao óbito, a despeito do tratamento e condução clínica corretos. Uma das formas mais grave da malária é a cerebral, e o conhecimento de sua imunopatogênese advém principalmente de estudos realizados em modelos experimentais infectados com espécies ou cepas diferentes de plasmódios. Muito se discute sobre a contribuição dos modelos animais na compreensão da malária humana, visto que nem todos os aspectos são compartilhados entre os dois; porém, vários estudos experimentais já mostraram mecanismos imunopatogênicos nos modelos experimentais que também foram encontrados na malária humana. Provavelmente, essa discussão reside no fato de que, assim como na malária humana, a forma clínica da malária no animal dependerá não somente do tipo de plasmódio infectante, mas também de características do próprio indivíduo, como a idade e determinantes genéticos da resposta imunitária que influenciarão a evolução do quadro clínico.

Na tentativa de compreender melhor como os mecanismos imunitários podem contribuir para a imunofisiopatogênese das formas graves, estudamos a malária experimental em camundongos CBA e C57BL/6 que apresentam a forma neurológica da doença quando infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA e em camundongos BALB/c que são resistentes à forma cerebral da malária (Lou e cols, 2001). Nesse trabalho, mostramos que a doença cursa de maneira diferente nas diferentes linhagens de camundongos, devido a uma rede de mecanismos imunitários que se associam e interagem de formas variadas.

Nossos resultados mostraram que as alterações histológicas e imunológicas foram diferentes nos três modelos murinos. Diferenças importantes foram observadas entre os modelos no que diz respeito à sobrevivência, produção de radicais livres e produção de citocinas. Observamos também estimulação diferenciada das vias intracelulares de resposta do NF $\kappa$ B, do PPAR- $\gamma$ , do inflamassoma e do metabolismo lipídico, que são responsáveis pela produção e regulação de produtos como as citocinas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e eicosanóides, e pelos fenômenos observados na microvasculatura cerebral, que também foram diferentes nos três modelos animais estudados. Em conjunto, observamos que os camundongos BALB/c apresentam uma resposta mais equilibrada do que aquelas observadas nos animais CBA e C57BL/6 suscetíveis à malária cerebral. Por outro lado, embora os camundongos CBA e os C57BL/6

apresentem a mesma suscetibilidade à forma cerebral, suas respostas à infecção são diferentes.

No nosso estudo, a infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA promoveu a morte precoce dos camundongos C57BL/6 e um tempo de sobrevivência menor do que os camundongos CBA que só começaram a morrer dois dias depois. Esse resultado sugere que os mecanismos patológicos responsáveis pelas alterações neurológicas nos dois animais são diferentes, e provavelmente mais exacerbados no camundongo C57BL/6 do que nos camundongos CBA. Já os camundongos BALB/c apresentaram um tempo de sobrevivência maior do que os animais suscetíveis, apesar de alguns iniciarem a morte junto com os camundongos CBA. No sexto dia de infecção malárica, 100% dos camundongos BALB/c restavam vivos, sobrevivendo em média 15 dias a mais do que os camundongos CBA. O curso diferente da infecção nos animais infectados está de acordo com a literatura (Lou e cols, 2001; Carvalho e cols, 2000; Pierrot e cols, 2003) e mostram que as alterações neurológicas contribuem para uma doença mais grave e uma letalidade mais precoce nos animais suscetíveis.

Provavelmente, a morte mais precoce dos camundongos C57BL/6 tenha ocorrido em virtude da dificuldade de controlar a parasitemia, uma vez que esses animais apresentaram uma parasitemia maior do que o camundongo suscetível CBA e o resistente BALB/c. De fato, observamos que o padrão de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO foi diferente entre as três linhagens, sugerindo que a produção de reativos de oxigênio e nitrogênio possa estar condicionada a uma capacidade individual de acionar mecanismos eficientes de defesa anti-plasmodial.

Das três linhagens, o modelo C57BL/6 apresentou a menor produção de NO após a infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA; enquanto que o modelo CBA produziu NO de forma semelhante ao BALB/c. A maior produção do NO pelos camundongos BALB/c em relação aos camundongos C57BL/6 também foi relatada por Hanun e cols em 2003. Além disso, a produção diminuída de NO pode explicar a maior parasitemia observada nos animais C57BL/6, uma vez que essa espécie reativa de nitrogênio desempenha um papel microbicida sobre os plasmódios (Anstey e cols, 1999; Awasthi e cols, 2003). Adicionalmente, estudos em camundongos C57BL/6 infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA mostraram que a diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico no modelo C57BL/6 promove a vasoconstrição, a diminuição do fluxo sanguíneo, menor oxigenação no tecido cerebral e alteração do mecanismo de s-nitrosilação e nitração de proteínas que é

importante para a ativação das vias intracelulares (Gramaglia e cols, 2006; Cabrales e cols, 2011; Zanini e cols, 2011).

Se por um lado, a produção de NO foi menor nos camundongos C57BL/6, por outro a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi maior após a infecção pelo *Plasmodium berghei*. O aumento da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ter contribuído para o desenvolvimento da malária cerebral nessa linhagem por ser capaz de ativar a produção de mediadores inflamatórios, agindo na via de sinalização do NFκB e na via STAT (Morgan e Liu, 2011; Park e cols, 2013). De fato, Reis e cols (2010) demonstraram que, na infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA, produtos gerados durante o estresse oxidativo, como o malondialdeído e as espécies conjugadas de dieno se encontram aumentadas nos cérebros dos camundongos C57BL/6 e que esse aumento se relacionou com as sequelas cognitivas observadas após o tratamento antimalárico. Entretanto, o envolvimento das espécies reativas de oxigênio na patogênese da malária cerebral nesse modelo é incerto, pois, os animais C57BL/6 deficientes de NADPH oxidase ou de glutathione peroxidase 1 ainda assim morreram com alterações neurológicas (Potter e cols, 2006).

Apesar de desenvolver a malária cerebral quando infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA, não observamos alteração na produção do NO e nem de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos camundongos CBA pela infecção, sugerido que essas moléculas não estão associadas ao desenvolvimento da malária cerebral nesses animais. A ausência de marcadores de estresse oxidativo no cérebro dos camundongos CBA infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA, juntamente com os relatos de que o tratamento *in vivo* com peróxido de hidrogênio não diminuiu a parasitemia (Dockrell e Playfair, 1983; Sanni e cols, 1999) e ainda que o tratamento com L-N-monomethyl arginine (L-NMMA), um inibidor da iNOS, não preveniu o desenvolvimento das alterações neurológicas (Asensio e cols, 1993; Kremsner e cols, 1993) reforça o nosso argumento inicial. Por outro lado, o aumento de produção do NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por macrófagos peritoneais de camundongos CBA infectados com *Plasmodium berghei* ANKA e tratados com pentoxifilina e talidomida foi paralelo ao aumento da sobrevivência desses animais (Muniz-Junqueira e cols, 2005; Borges, 2006). Esses dados sugerem que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o NO podem não ter um papel destacado na malária cerebral do camundongo CBA, mas a indução dessas moléculas parece desempenhar um papel protetor na malária.

O fato de não ter havido alterações na produção do peróxido de hidrogênio pelos macrófagos dos camundongos BALB/c após a infecção, juntamente



com a observação de que esses animais não apresentaram produtos de estresse oxidativo aumentados no tecido cerebral (Reis e cols, 2010), sugerem que provavelmente os camundongos BALB/c possuem uma capacidade intrínseca de regular a produção de espécies reativas de oxigênio durante a infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA. De fato, estudos prévios propuseram que a resistência à malária cerebral do camundongo BALB/c estava relacionada a uma expressão aumentada de heme oxigenase 1 (HO1) no cérebro (Seixas e cols, 2009), enzima que é importante na proteção dos neurônios contra o dano oxidativo causado pela liberação de heme (Le e cols, 1999). Essa hipótese é reforçada por estudos que mostraram que o nocauteamento do gene codificante *hmox* ou a inibição da atividade enzimática da HO1 promovem o desenvolvimento da malária cerebral no BALB/c e a sua indução promove resistência no camundongo C57BL/6 (Pamplona e cols, 2007).

Em resumo, a pequena produção de espécies reativas no modelo C57BL/6, provavelmente influenciando a alta parasitemia deve ter contribuído para a gravidade da doença. Porém, a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO e a parasitemia semelhante entre o modelo suscetível CBA e o resistente BALB/c sugerem que múltiplos mecanismos devem ser responsáveis pelo desenvolvimento das formas graves nesses animais. Provavelmente, a produção desses radicais dependa de características individuais multifatoriais em cada interação parasito-hospedeiro, que direcionam as respostas imunes responsáveis tanto pela imunidade quanto pela imunopatogenia na malária.

O papel das subpopulações celulares Ta1 e Ta2 tem sido largamente estudado na malária. Os resultados têm demonstrado que ambas são necessárias para controlar a infecção e que os mecanismos patogênicos são gerados pelo desequilíbrio entre as duas, porém a contribuição de cada citocina no desenvolvimento das formas graves é ampla e heterogênea. Em virtude disso, avaliamos o envolvimento de citocinas do ramo de resposta auxiliar 1 (IL-1 $\beta$ , IL-12 e o FNT- $\alpha$ ), auxiliar 2 (IL-4 e a IL-10) e auxiliar 17 (IL-17) nos animais com suscetibilidade diferente à malária cerebral. No nosso estudo, a determinação das citocinas no tecido cerebral, no sexto dia da infecção malárica, mostrou que os camundongos suscetíveis C57BL/6 apresentaram quantidades aumentadas de IL-10 e FNT- $\alpha$  e diminuídas de IL-1 $\beta$ . Não houve alteração nas concentrações de IL-4 e IL-17 e a concentração de IL-12 foi heterogênea entre os animais. Ao contrário deste, no grupo suscetível CBA, houve diminuição das concentrações de IL-10 e FNT- $\alpha$  e

não houve modificação significativa da quantidade de IL-1 $\beta$ . O padrão de produção de IL-4 e IL-17 foi mais elevado no modelo CBA, diferente da IL-12 que não se alterou, mas manteve-se baixa. Assim, como os CBAs, os camundongos resistentes BALB/c diminuíram a produção de FNT- $\alpha$  e IL-10 e a produção das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-12 e IL-17 não se alterou. Esses resultados sugerem que o curso diferente da malária nos animais é reflexo de respostas imunes orquestradas por diferentes perfis de produção de citocinas que atuam de maneira dinâmica, alterando o equilíbrio fisiológico dos diferentes padrões de respostas auxiliares e que consequentemente influenciam a suscetibilidade à malária cerebral. Contudo, as ações das citocinas são pleiotrópicas e envolvem complexos mecanismos de regulação e contra-regulação, além disso, deve-se considerar que suas ações estão sempre na dependência das concentrações liberadas que podem variar na unidade de tempo, na meia vida e nas células responsivas a elas. Portanto, é possível que nossos resultados possam ainda ter sido influenciados por mecanismos não estudados nesse trabalho.

Das citocinas que foram avaliadas nesse trabalho, estudos têm mostrado um importante papel da IL-12 na infecção malárica, devido a suas ações no controle efetivo da parasitemia (Amani e cols, 2000). De maneira geral, a produção da IL-12 foi baixa após a infecção nos três grupos de camundongos, sugerindo que independente da suscetibilidade à forma cerebral, todas as linhagens apresentaram dificuldade de desenvolver uma resposta Th1 que adequadamente ativasse os mecanismos que limitam de maneira eficiente a expansão da parasitemia. Estudos mostram que a produção de IL-12 logo no início da infecção é importante para a liberação de IFN- $\gamma$  pelas células citotóxicas naturais (CN) e linfócitos T citolíticos (Tc) (Doolan e cols, 1999), que por sua vez, ao estimular a ativação de fagócitos e a produção de NO, limita a expansão dos plasmódios no hospedeiro e promove uma imunidade protetora contra a malária cerebral (Cabantous e cols, 2005). Portanto, a baixa concentração da IL-12 provavelmente foi responsável pela diminuição das concentrações do NO e pela maior parasitemia nos camundongos C57BL/6 por limitar a produção do IFN- $\gamma$ . Reforçando essa hipótese, Mitchel e cols (2005) mostraram que os camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA produzem baixas concentrações de IFN- $\gamma$  e mantêm níveis baixos de IL-12 ao longo da infecção. A baixa produção de IL-12 nos camundongos CBA e BALB/c, que também foi relatada por Chen e cols (2000b), pode ter contribuído para a manutenção das concentrações iniciais de espécies reativas ao longo da infecção.

Porém, a menor parasitemia e a maior sobrevivência nos camundongos BALB/c e CBA, sugerem que outros mecanismos de controle anti-plasmodial devem ter sido acionados para compensar a falta dos estímulos protetores provenientes da ação da IL-12.

Interessantemente, nossos estudos demonstraram que tanto o FNT- $\alpha$  quanto a IL-10 que tem ações antagônicas, estavam aumentadas nos camundongos C57BL/6 no sexto dia de infecção, enquanto, nos camundongos CBA que também são suscetíveis à malária cerebral ocorreu justamente ao contrário. A produção diminuída de FNT- $\alpha$  e IL-10 também foi um achado nos camundongos resistentes BALB/c. Níveis aumentados de IL-10 também foram observados nos animais C57BL/6 em outros estudos (Mitchell e cols, 2005; Sarfo e cols, 2011); porém, o aumento concomitante do FNT- $\alpha$  e da IL-10 só havia sido relatado no baço, fígado e rins desses animais (Tan e cols, 2000). Em seres humanos, essa associação também foi observada em alguns estudos (May e cols, 2000). Esses resultados sugerem que a presença das duas citocinas deve responder pelo desenvolvimento da malária cerebral nos camundongos C57BL/6 por mecanismos opostos: por um lado, o FNT- $\alpha$  promove os mecanismos patológicos já descritos na malária tais como o sequestro de células na microvasculatura, a apoptose de células como os astrócitos, neurônios e células endoteliais e desregulação da barreira-hematoencefálica (Gimenez e cols, 2003) e por outro, apesar do FNT- $\alpha$  exercer um efeito antiparasitário (Muniz-Junqueira e cols, 2001), as ações anti-inflamatórias da IL-10 diminuem a defesa anti-plasmodial por interferir na síntese da IL-12 (Tan e cols, 2000; Huggoson e cols, 2004).

Portanto, nos camundongos CBA, era de se esperar que a produção de IL-12 e NO aumentasse em função da diminuição da concentração de IL-10, contudo a IL-12 se manteve em quantidades baixas e não houve alteração na produção do NO. Além disso, também era esperado que a baixa concentração do FNT- $\alpha$  refletisse em um aumento da parasitemia (Muniz-Junqueira e cols, 2008) e que conduzisse os camundongos CBA para a mesma evolução clínica dos camundongos BALB/c, que são resistentes e que morrem dias depois com anemia. Porém, apesar dos camundongos CBA e BALB/c apresentarem o mesmo padrão de produção da IL-12, IL-10, FNT- $\alpha$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO, o modelo CBA desenvolve as alterações neurológicas e sucumbe em média dois dias depois dos camundongos C57BL/6. Esses resultados sugerem fortemente que as alterações neurológicas e o dano cerebral são arquitetados por mecanismos diferentes nas duas linhagens suscetíveis, e ainda que

a suscetibilidade do CBA ou a resistência do BALB/c depende de mecanismos diferentes das citocinas citadas. Diferente dos camundongos C57BL/6 e BALB/c, o grupo dos camundongos CBA infectados mostrou um padrão de produção de IL-17 e IL-4 maior do que as outras duas linhagens, sugerindo que ambas possam ser moléculas chaves no desenvolvimento da doença cerebral neste modelo.

Nos camundongos CBA, uma vez que as citocinas IL-1 $\beta$  e o FNT- $\alpha$ , que normalmente ativam o endotélio vascular, estão diminuídas, a produção de IL-17 pode responder em parte pelo sequestro de leucócitos, já que estimula a produção de quimiocinas envolvidas no recrutamento de neutrófilos e linfócitos T citolíticos CD8<sup>+</sup> (Weaver e cols, 2007; Ouyang e cols, 2008). Particularmente, nos camundongos CBA, o aumento de neutrófilos e linfócitos T CD8<sup>+</sup> no cérebro tem sido relacionado com o desenvolvimento das alterações neurológicas (Waki e cols, 1992; Chen e cols, 2000 a; Randall e cols, 2008). Em seres humanos, estudos anteriores também mostraram a importância dessas células na suscetibilidade e resistência à forma cerebral (Campanella e cols, 2008; Van den Steen e cols, 2008). Por outro lado, essa citocina parece não estar envolvida nos mecanismos imunopatológicos da malária cerebral desenvolvida pelo camundongo C57BL/6, uma vez que no nosso estudo, o grupo iC57 produziu baixas quantidades semelhantes ao grupo iBAL. De fato, Randall e cols, 2008, mostraram que o nocauteamento do gene da IL-17 nos camundongos C57BL/6 não alterou a presença de leucócitos na microvasculatura e não preveniu o desenvolvimento do dano neurológico (Ishida e cols, 2010).

A presença aumentada da IL-4 no grupo iCBA e a baixa concentração nos camundongos C57BL/6 podem responder pelo início um pouco mais tardio da morte nesse grupo por dois mecanismos: a) devido à ação anti-inflamatória da IL-4 sobre a produção de FNT- $\alpha$  por macrófagos (Oh e Chung, 2011), tanto a aderência de células que é estimulada por essa citocina, quanto as alterações no endotélio vascular devem ter sido menores. De fato, observamos no estudo histopatológico uma quantidade menor de leucócitos aderidos na microvasculatura no modelo CBA; b) a IL-4 estimulou a formação de anticorpos contra o plasmódio, o que pode ter mantido uma parasitemia menor nestes animais quando comparados a de camundongos C57BL/6. No entanto, Eisenhut (2010) relacionou a produção de IL-4 a um controle ineficiente da parasitemia, baseado no fato de que essa citocina diminui a fagocitose do parasito por diminuir a expressão de receptores para a imunoglobulina G nos macrófagos. Assim, podemos considerar que a IL-4 tenha

contribuído para a menor parasitemia por um mecanismo indireto produzindo anticorpos que ao opsonizarem os eritrócitos parasitados estimulam a lise dessas células via complemento. Contudo, estudos mais aprofundados devem ser realizados a cerca dessa hipótese.

Uma análise a parte deve ser feita para a IL-1 $\beta$ , pois de todas as citocinas aqui estudadas, ela é a única produzida na forma de um precursor inativo que deve ser ativado para cumprir suas funções biológicas. Por isso, consideramos que as diferentes produções de IL-1 $\beta$  poderiam ser reflexos de alteração no principal mecanismo de processamento da pró-IL-1 $\beta$  que ocorre via caspase-1 (Netea e cols, 2010). Nossos resultados mostraram que houve aumento estatisticamente significativo da caspase-1 nos animais suscetíveis à forma cerebral infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA. Contudo, o aumento da caspase-1 não resultou em aumento significativo da IL-1 $\beta$  nesses animais. Uma possível explicação para essa discrepância pode ser uma possível alteração na formação do complexo inflamassômico, onde a caspase-1 precisa estar inserida para desempenhar sua função.

A ASC é uma proteína adaptadora que é requisitada pela maioria dos inflamassomas já caracterizados e é responsável pela oligomerização da pró-caspase 1 e ligação dessa à plataforma do inflamassoma. Porém, no inflamassoma NALPR1, a caspase-1 pode se juntar ao complexo independentemente da ASC, mas precisa desta para aumentar sua atividade (Faustin e cols, 2007; Khare e cols, 2010). Considerando que a capacidade da caspase-1 de promover a ativação da IL-1 $\beta$  é menor no inflamassoma NALPR1, quando não associada à ASC, avaliamos a presença dessa última nos animais e observamos que houve aumento expressivo da proteína ASC em todos os grupos infectados.

Além de ativar a caspase-1, a proteína ASC serve de ponte entre essa e o domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos (NOD) dos receptores intracelulares NLR que são ativados por estímulos externos (Martinon e Tschopp, 2007), como a hemozoína que se liga aos receptores TLR9 (Coban e cols, 2005) e o glicofosfatidilinositol do *Plasmodium falciparum* que ativa o TLR2 (Zhu e cols, 2011; Greene e cols, 2012). O sinal à jusante gerado por essas ligações do parasito aos receptores semelhantes ao Toll (TLR) são capazes de ativar proteínas adaptadoras na cauda intracitoplasmática do receptor, como o MyD88 que estão envolvidas na ativação de vários inflamassomas, entre eles o inflamassoma NALPR3 e o NALPR4 (Buzoo e cols, 2010; Segovia e cols, 2012).

Na malária, os inflamassomas NALPR3 e NALPR4 já foram estudados, porém, sua contribuição no processo patológico ainda é controversa (Dorstert e cols, 2009; Reimer e cols, 2010), já que o nocauteamento dos genes NALPR3 e NALPR4 não modificou a evolução clínica da doença. Por outro lado, o nocauteamento do gene do MyD88 em camundongos C57BL/6 mostrou que sua presença é importante para desenvolvimento da forma grave (Coban e cols, 2005; Gowda e cols, 2007; Shio e cols, 2009). A importância da MyD88 para a ativação dos inflamassomas, a independência da NALPR3 e NALPR4 para o processo patológico e o aumento da caspase-1/ASC observado no presente estudo, juntos sugerem que outros inflamassomas possam estar envolvidos no desenvolvimento da doença. Desta forma, avaliamos a expressão do NALPR1 nos macrófagos de animais infectados com PbA e observamos que seu aumento somente ocorreu nos animais suscetíveis à forma cerebral. Já nos animais resistentes, é possível que a ativação da caspase-1/ASC esteja associada ainda a outro inflamassoma.

Apesar de o inflamassoma NALPR1 estar ativado na malária cerebral, essa ativação não refletiu em produção da IL-1 $\beta$  no modelo C57BL/6, no qual, ao contrário, observamos diminuição desta citocina. É possível, que na malária, a produção da IL-1 $\beta$  não dependa da ativação da caspase-1 e ASC, como já tem sido observado em outras situações (Griffith e cols, 2007; Reimer e cols, 2010; Kordes e cols, 2011). Entretanto, é importante considerar que as alterações poderiam estar no fornecimento da pró-IL-1 $\beta$  para formação do inflamassoma. Uma possibilidade é que a diminuição da IL-1 $\beta$  nos animais C57BL/6 esteja relacionada à falta de disponibilidade da pró-IL-1 $\beta$ , devido a mecanismos pré-translacionais relacionados, com as vias de sinalização intracitoplasmática, como por exemplo, pela ação da IL-10, que está aumentada nesses animais, e por alterações na via do NF $\kappa$ B, que é responsável pela produção de citocinas inflamatórias (Wang e cols, 1995).

A via intracelular do NF $\kappa$ B é formada por uma rede de proteínas que ao se associarem na forma de dímeros no citoplasma translocam para o núcleo onde cumprem sua função como transcritores gênicos. Na malária, estudos mostram que estímulos provenientes do plasmódio, como a GPI, da lise celular como a hemozoína e o heme livre, ou ainda do estresse oxidativo são importantes indutores da sinalização da via do NF $\kappa$ B (Jaramillo e cols, 2005; Zhu e cols, 2005; Dey e cols, 2012). Todavia, o conhecimento sobre o papel dos fatores nucleares de transcrição  $\kappa$ B na malária ainda é incipiente, pois, esbarra nas complexas redes regulatórias e

repressoras, na taxa de formação de dímeros e na capacidade desses dímeros de cotraduzir genes diferentes (Basak e cols, 2008).

No intuito de esclarecer o papel dos fatores  $\kappa$ B, avaliamos a expressão de RelA, RelB e p52 em macrófagos e observamos que, nos camundongos resistentes BALB/c, as duas vias do NF $\kappa$ B foram ativadas, porém, sobressaiu a expressão da via canônica. Já nos camundongos suscetíveis CBA, a via não-canônica parece predominar, enquanto no modelo suscetível C57BL/6 somente a via canônica está ativada. A expressão diferente dos fatores  $\kappa$ B nessas linhagens sugere que a produção desigual de citocinas e de espécies reativas esteja sendo regulada pela formação distinta de dímeros NF $\kappa$ B. De fato, Hoffmann e cols (2003) mostraram que diferentes dímeros se acoplam em sítios distintos de ligação  $\kappa$ B no ADN, estimulando diferentes produtos gênicos.

No nosso estudo, o RelA, que é o principal fator nuclear da via canônica, estava expresso nos macrófagos peritoneais de todas as três linhagens após a infecção. Na malária, a preponderância da via canônica sobre a não-canônica havia sido observada por Tripathi e cols (2009) estudando a influência *in vitro* de eritrócitos parasitados com trofozoítos de *Plasmodium falciparum* no endotélio cerebral humano. Entre os genes regulados por esta via estão aqueles responsáveis pela produção da IL-12 (Siggers e cols, 2011). Contudo, apesar do RelA estar aumentado no núcleo dos macrófagos dos grupos infectados, a concentração da IL-12 nos homogenatos dos cérebros não aumentou paralelamente. Nossos dados foram semelhantes aos de Xu e cols (2001) que mostraram que a IL-12 foi substancialmente inibida *in vitro* nos macrófagos de camundongos C57BL/6 incubados com eritrócitos infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA, enquanto a ligação do NF $\kappa$ B ao núcleo ocorria em grande quantidade. Isso sugere que outros mecanismos intracelulares agem de forma coparticipativa com o NF $\kappa$ B na transcrição do gene dessa citocina. De fato, estudos mostraram que a GPI do *Plasmodium falciparum* ao se ligar nos receptores TLR2 e TLR4 induzem a expressão de ERK, que por sua vez é capaz de diminuir a interação do I $\kappa$ B $\zeta$  com o dímero p50:p50 necessária para a transcrição do gene *Il12b* (Zhu e cols, 2005; Zhu e cols, 2011).

Diferentemente do RelA que não está envolvido na produção de IL-12, a transcrição do gene *fnt $\alpha$*  é essencialmente regulado pelo dímero RelA:p50 (Falvo e cols, 2010). Porém, apesar da maior expressão de RelA nos macrófagos dos grupos infectados, o FNT- $\alpha$  só aumentou nos animais C57BL/6, sugerindo que as ações da

via canônica nos camundongos BALB/c e CBA devem ter sido reguladas por mecanismos inibidores que não estavam presentes nos camundongos C57BL/6. É possível que a presença dos fatores p52 e RelB que só foram evidenciados nos camundongos, BALB/c e CBA infectados, tenham contribuído para diminuição do FNT- $\alpha$  por dois mecanismos predominantes: no primeiro o RelB dos camundongos CBA pode ter translocado para o núcleo dimerizado com o fator p50 (Kumar e cols, 2003), que juntos têm a capacidade de inibir a produção de FNT- $\alpha$  (Derudder e cols, 2003; Gasparini e cols, 2013) e nos camundongos BALB/c, o RelB formou dímeros com o RelA que não são capazes de se ligar ao ADN (O'Dea e Hoffmann, 2010). Além disso, provavelmente no BALB/c, a presença deste dímero tenha mantido o RelA represado no citoplasma já que não houve translocação do RelB para o núcleo. Já o segundo mecanismo possivelmente ocorreu por meio da proteína precursora do fator p52, a p100 que tem uma atividade I $\kappa$ B $\delta$  repressora do RelA:p50 (Shih e cols, 2011) e conseqüentemente seu aumento no citoplasma pode ter inibido a produção do FNT- $\alpha$  nos dois animais.

Adicionalmente, a maior produção da IL-17 pelos camundongos CBA também pode ter contribuído para a redução do FNT- $\alpha$  nos animais infectados, uma vez que a IL-17 é capaz de estimular a expressão de I $\kappa$ B $\zeta$  (Okamoto e cols, 2010) que inibe a ligação do RelA:p50 ao núcleo (Totzke e cols, 2006). Pelo mesmo mecanismo, o padrão aumentado de produção IL-1 $\beta$  pode ter contribuído para baixas quantidades do FNT- $\alpha$  antes da infecção no modelo C57BL/6. No entanto, a indução de I $\kappa$ B $\zeta$  pelas citocinas IL-1 $\beta$  e IL-17 deveria ter aumentado a IL-12 nos animais CBA, mas ao contrário, esta se manteve em níveis baixos após a infecção. Provavelmente, o padrão aumentado de IL-10 antes da infecção tenha sido o responsável pela manutenção de baixas concentrações da IL-12 nos camundongos CBA, uma vez que *in vitro*, a IL-10 foi capaz de inibir a produção de IL-12p40 em macrófagos incubados com eritrócitos infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA (Xu e cols, 2001) diminuindo a ativação da *Il12b* dependente de I $\kappa$ B $\zeta$  via ERK (Chandra e Naik, 2008). Já nos camundongos C57BL/6, possivelmente a diminuição da IL-1 $\beta$  e o aumento de IL-10 após a infecção cooperaram para a redução da IL-12 via I $\kappa$ B $\zeta$  e para o aumento da produção de FNT- $\alpha$ . Esses dados sugerem a presença de mecanismos compensatórios entre as vias que regulam a transcrição do gene da IL-12 e reforçam a tese de que os estímulos externos devem concorrer para a regulação transcricional da resposta imunitária contra os plasmódios em função do



padrão de resposta de cada indivíduo e do momento em que os estímulos aparecem ou desaparecem na doença.

Nos camundongos C57BL/6, a expressão aumentada de RelA tanto no núcleo quanto no citoplasma dos macrófagos, sem a regulação exercida pela p100, sugere que os dímeros de RelA mantiveram uma taxa de translocação e represamento constante dentro da célula. Esse mecanismo possivelmente ocorreu porque o FNT- $\alpha$ , que estava aumentado nesse modelo após a infecção, tem a capacidade de retroalimentar sua produção ativando a translocação da RelA:p50, mas a formação de dímeros RelA:RelA reprimiu a translocação do RelA por estimular a produção do inibidor da via canônica, o  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  (Bradley e Pober, 2001). Adicionalmente, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  que também aumentou nesse modelo pode ter contribuído para a ativação do RelA, por um mecanismo atípico, independente do IKK (Perkins, 2007). É possível que esse ciclo de síntese e degradação resulte em oscilação da atividade celular (Hoffmann e cols, 2003; O'Dea e Hoffmann, 2010), promovendo mecanismos apoptóticos de células endoteliais cerebrais, leucócitos intravasculares e neurônios (Punsawad e cols, 2013) que contribuem para o desenvolvimento das alterações neurológicas observadas nesse modelo. A intensa ativação da via canônica no modelo C57BL/6 deve ainda ter contribuído para o recrutamento e aderência de leucócitos, uma vez que relatos anteriores associaram o RelA ao aumento de adesinas como o ICAM-1, de quimiocinas como RANTES e MIP-1 $\alpha$  e de citocinas como as IL-6 e IL-8 (Tripathi e cols, 2006; Tripathi e cols, 2009).

Nos camundongos CBA, a presença de RelA e p52 no núcleo dos macrófagos após a infecção sugere que dímeros de RelA:p52 possam ter sido formados também nos fagócitos no tecido cerebral e essa ativação provavelmente estimulou o recrutamento local de leucócitos, já que entre os genes regulados pela RelA:p52 estão os das quimiocinas Rantes, MIP-1 e MCP-1 (Hoffmann e cols, 2003).

A produção diferente de espécies reativas também pode ter sido reflexo da atividade diferenciada do  $\text{NF}\kappa\text{B}$  nos modelos murinos. A capacidade dos dímeros RelB:p52 e RelA:p50 de estimular a síntese de enzimas pró- e anti-oxidantes (Anrather e cols, 2006; Morgan e Liu, 2011) pode explicar a produção equilibrada de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nos camundongos CBA e BALB/c. Já o padrão de produção menor de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nos camundongos C57BL/6 pode ter sido resultado da atividade anti-oxidante regulada pelo dímero RelA:p50 que é responsável pela síntese de enzimas como a catalase, glutathiona redutase e peroxiredoxinas (Morgan e Liu, 2011). Os dímeros de RelA podem ainda estimular a síntese de iNOS (Jaramillo e cols, 2003) que é

responsável pela produção de NO, contudo, o aumento do RelA no núcleo dos macrófagos não refletiu em aumento de NO nos camundongos BALB/c e CBA, e não explica a diminuição dessa espécie reativa nos camundongos C57BL/6.

Outro mecanismo de sinalização intracitoplasmática que poderia influenciar a produção de citocinas e também de espécies reativas envolve a ativação do fator PPAR- $\gamma$  (Szanto e Nagy, 2008). Dentro do núcleo, o PPAR- $\gamma$  ao se ligar com o receptor X do ácido retinóico (RXR) (Pineda e cols, 2001) regula a transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória através de interferência negativa em diferentes vias intracitoplasmáticas, tais como a do NF $\kappa$ B, do ERK e do MAPK (Gardner e cols, 2005; Burns e Heuvel, 2007). Assim, os PPARs são capazes de influenciar a produção de citocinas inflamatórias e o recrutamento de células para os locais inflamatórios.

Nossos dados mostraram que a infecção pelo *P. berghei* promoveu a translocação do PPAR- $\gamma$  do citoplasma para o núcleo nos camundongos BALB/c, o mesmo não ocorrendo nos camundongos suscetíveis CBA e C57BL/6. Além disso, houve diferença na expressão do PPAR- $\gamma$  entre as duas linhagens suscetíveis. Enquanto nos camundongos CBA, o PPAR- $\gamma$  total diminuiu como resultado de uma baixa expressão do fator no compartimento citoplasmático; nos camundongos C57BL/6, a quantidade total do PPAR- $\gamma$  foi maior do que no modelo CBA, mas se manteve constante após a infecção, não havendo modificação da sua expressão no núcleo e nem no citoplasma.

No camundongo BALB/c, a grande translocação do PPAR- $\gamma$  para o núcleo sugere que a regulação de genes relacionados com a atividade inflamatória ocorreu intensamente ao nível transcricional. Possivelmente, essa atividade nuclear explique as baixas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO observadas nos camundongos BALB/c, já que o PPAR- $\gamma$  pode regular diretamente os genes envolvidos na síntese de iNOS, NADPH oxidase e SOD (Aleshin e Reiser, 2013). Além disso, esse receptor também deve ter contribuído para a diminuição do FNT- $\alpha$  por agir de forma transrepressora sobre os dímeros do NF $\kappa$ B. Esse mecanismo não envolve alteração da translocação ou da ligação dos dímeros ao ADN, mas envolve um processo pós-transcricional de sumolização que modifica as proteínas NF $\kappa$ B (Mabb e Miyamoto, 2007; Hong e Tontonoz, 2008), justificando a presença de RelA no núcleo, sem o aumento de citocinas inflamatórias. Ao contrário disso, encaminha-os do citoplasma para o compartimento nuclear. Contudo, a diminuição da quantidade do PPAR- $\gamma$  total e

citoplasmática sugere que o receptor foi degradado no citoplasma ou que a síntese do receptor não ocorreu na mesma taxa em que está sendo utilizado no núcleo. A sumolização é um processo de modificação de proteínas dependente de ATP, que diferente da ubiquitinização, não direciona os substratos modificados à degradação proteolítica pelo proteassoma.

Existem duas possibilidades para explicar a diminuição do PPAR- $\gamma$  citoplasmático observado nos camundongos BALB/c e CBA: ou a molécula foi degradada ou a sua síntese foi prejudicada. Na verdade, tem-se mostrado que o FNT- $\alpha$  é capaz de inibir as ações do PPAR- $\gamma$  pela via do IKK/NF $\kappa$ B (Ye, 2008). Provavelmente, nos camundongos CBA e BALB/c, o padrão inicial de FNT- $\alpha$  tenha contribuído para a diminuição do PPAR- $\gamma$  após a infecção. Além disso, a degradação do PPAR- $\gamma$  pode ter sido regulada pela atividade de diferentes cinases que ao estimular o processamento do receptor pelo sistema de ubiquitina-proteassoma acabam por modular a atividade transcricional do PPAR- $\gamma$  (Blanquart e cols, 2003; Burns e Heuvel, 2007). Em comparação com os camundongos BALB/c e CBA, a maior quantidade do PPAR- $\gamma$  nos camundongos C57BL/6 deve ter contribuído para um padrão mais baixo de produção de espécies reativas e FNT- $\alpha$  durante a infecção.

A infecção pelo plasmódio determinou alterações semelhantes na expressão do PPAR- $\gamma$  nos modelos CBA e BALB/c, enquanto não houve alteração desta molécula no modelo C57BL/6. Esses resultados podem ser explicados por um conjunto de mecanismos que juntos são capazes de interferir na produção do PPAR- $\gamma$ : a) é possível que a progressão da infecção tenha aumentado os estímulos antigênicos desencadeadores da sinalização pela via canônica do NF $\kappa$ B e promovido um aumento do metabolismo energético que culminou em maiores quantidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; b) A falta de regulação exercida pela p100 pode ter possibilitado uma maior atividade da via canônica, estimulando a produção do FNT- $\alpha$ ; c) A maior quantidade do FNT- $\alpha$  e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que são capazes de diminuir o PPAR- $\gamma$  (Ye, 2008; Blanquicett e cols, 2010), juntamente com a maior produção de IL-10 que tem o efeito contrário, podem ter agido de forma antagônica mantendo regulados os níveis de PPAR- $\gamma$ , contudo, sem alterar a capacidade desse receptor de manter uma atividade regulatória sobre a enzima iNOS, o que explicaria as concentrações reduzidas de NO.

As alterações nas concentrações do PPAR- $\gamma$  podem ser explicadas também pela sua capacidade de aumentar a adipogênese e a estocagem de lipídios

estimulando a formação dos corpúsculos lipídicos no interior da célula. Durante, o metabolismo lipídico, o PPAR- $\gamma$  vai sendo degradado à medida que ele estimula a síntese da proteína reguladora de diferenciação adiposa (ADRP) que mobiliza lipídios como o triacilglicerol (TAG) e o colesterol no interior do corpúsculo (de Assis e cols, 2003; Maya-Monteiro e cols, 2008). É possível que esse mecanismo, tenha sido responsável pelo aumento dos corpúsculos lipídicos observados nos macrófagos dos animais CBA, C57BL/6 e BALB/c após a infecção. Adicionalmente, Palacpac e cols (2004) e Jackson e cols (2004) mostraram que o *Plasmodium falciparum* pode estimular a formação de corpúsculos lipídicos nos eritrócitos parasitados e o aumento de TAG foi observado após a infecção plasmodial (Vial e Ancelin, 1992; Nawabi e cols, 2003; Vial e cols, 2003).

O aumento da biogênese dos corpúsculos lipídicos em todos os animais infectados demonstra a condição inflamatória tanto nos modelos suscetíveis quanto no modelo resistente. Embora, tenha havido aumento dos corpúsculos lipídicos em todas as três linhagens, a produção de eicosanóides que ocorre no interior dos corpúsculos lipídicos deve ter sido diferente, pois as enzimas COX-2 e 5-LOX relacionadas com essa via foram expressas de maneira diferente entre os três modelos dos animais.

No grupo CBA houve predomínio da expressão de COX-2. Esse aumento de COX-2 também havia sido observado nos cérebros desse mesmo modelo experimental por Ball e cols (2004). A quantidade de COX-2 no nosso modelo foi observada principalmente em vasos congestionados com eritrócitos, contudo, a expressão aumentada da enzima não ocorreu devido a uma atividade maior da micróglia ou dos macrófagos e sim em resposta a um aumento em células no tecido cerebral. Esse fato sugere que a ativação da COX-2 ocorreu localmente no cérebro pela ativação de células como os astrócitos, neurônios e células endoteliais em resposta à congestão dos vasos. De fato, Deininger e cols (2000) mostraram que as células endoteliais e os astrócitos, e não os macrófagos, são responsáveis pelo acúmulo focal de COX-2 no cérebro de indivíduos que morreram com malária cerebral. Provavelmente, as baixas concentrações de COX-2 nos macrófagos e micróglias observada nas três linhagens foram reflexos dos estímulos gerados pela a hemozoína (Keller e cols, 2004). Nos camundongos C57BL/6, a infecção produziu o aumento de COX-2 de forma semelhante ao observado nos camundongos CBA, sendo que a diferença entre os dois se restringiu, nos camundongos C57BL/6, à presença de COX-2 em vasos não congestionados, mas com células aderidas. No

camundongo BALB/c, o baixo padrão de produção da COX-2, pode ter sofrido influência do aumento da atividade do PPAR- $\gamma$  no núcleo. Uma vez que o PPAR- $\gamma$  pode impedir a síntese de COX-2 via transrepressão do NF $\kappa$ B e da AP-1 (Han e cols, 2003).

A COX-2 é a enzima que gera as prostaglandinas, a partir do ácido araquidônico, que agem de maneira diferente sobre a síntese de NO e de FNT- $\alpha$  (di Battista e cols, 1999, Hsiao e cols, 2007, Kunisch e cols, 2009) por dois mecanismos: o primeiro pela ação das prostaglandinas sobre a atividade do NF $\kappa$ B e o segundo por aumentar a fosforilação do PPAR- $\gamma$  pelas proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), diminuindo a atividade reguladora desse receptor (Knopfová e Smarda, 2010). Portanto, é provável que esse mecanismo possa responder, em parte, pelo aumento do FNT- $\alpha$  observado nos camundongos C57BL/6; e pela diminuição do PPAR- $\gamma$  no citoplasma dos camundongos CBA. Contudo, a diminuição do NO nos camundongos C57BL/6 e a diminuição do FNT- $\alpha$  nos camundongos CBA sugerem novamente que vários mecanismos reguladores devem interferir na síntese desses produtos. É possível que a interface PPAR- $\gamma$ /NF $\kappa$ B seja um ponto chave para o entendimento desse mecanismo, porém, estudos mais aprofundados devem ser realizados.

Nos camundongos do grupo iC57, o aumento do 5-LOX foi observado em vasos congestionados, no endotélio vascular e nas células cerebrais. A atividade da 5-LOX pode resultar em aumento da síntese de leucotrienos e outros hidroxiácidos, o que provoca a adesão e ativação de leucócitos, o aumento da permeabilidade vascular e a produção de citocinas pró-inflamatórias (Gerritsen, 1996), que estão envolvidos na patogênese da malária cerebral e que foram observados nos camundongos C57BL/6. Xiao e cols (1999) observaram que, no auge da malária cerebral, camundongos ICR infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA tinham níveis mais altos de leucotrieno B4 no soro do que o controle. Além disso, a menor expressão de COX-2 e 5-LOX nos camundongos resistentes BALB/c sugere a importância da exacerbação dessas duas vias no desenvolvimento da doença cerebral. Nossos resultados mostram que possivelmente os eicosanóides possam desempenhar um papel importante no desenvolvimento da malária cerebral.

Para melhor compreensão das diferentes evoluções da doença comparamos as alterações histopatológicas do tecido cerebral e cerebelar nos três modelos. Regiões com micro-hemorragia e com infiltrado inflamatório foram raramente encontradas em alguns animais infectados de todas as linhagens

estudadas. Vale ressaltar que, independente da quantidade, se a localização do processo hemorrágico e do infiltrado inflamatório ocorrer em regiões vitais pode causar alterações nas funções do sistema nervoso e no comportamento dos animais (Carroll e cols, 2010). Entretanto, chama atenção o fato de que a hemorragia e o infiltrado inflamatório ocorreram, embora raramente, também em alguns animais BALB/c, visto que esse achado segue na linha contrária de vários estudos anteriores (Grau e cols, 1987, Nacer e cols, 2012). Porém, nossos resultados foram semelhantes aos de Lacerda-Queiroz e cols (2011), que mostraram que a hemorragia e o infiltrado inflamatório podem ocorrer de maneira moderada em camundongos BALB/c infectados com o *Plasmodium berghei* NK65, uma cepa letal que não causa a malária cerebral.

A comparação das alterações histopatológicas no sexto dia da infecção malárica pelo *Plasmodium berghei* ANKA mostrou diferenças entre os modelos estudados. Os principais achados ocorreram em vênulas pós-capilares de tamanho pequeno a grande (intervalo de 20µm a 80µm), segundo a classificação de Kaul e cols (1995), corroborando resultados anteriores que observaram a aderência celular, congestão e oclusão em vasos desse tamanho (Kaul e cols, 1998; Cabrales e Carvalho, 2010; Zanini e cols, 2011).

No modelo suscetível C57BL/6, as alterações foram mais evidentes do que nos outros dois modelos. A permeabilidade vascular, a congestão vascular, a aderência de leucócitos e a presença de vasos obstruídos por leucócitos foram maiores do que nos animais CBA. Provavelmente, esses achados no C57BL/6 tenham sido reflexo da concentração aumentada do FNT- $\alpha$  nos animais infectados. Já no modelo CBA, a aderência de eritrócitos foi um achado importante, que não foi visualizado nos animais C57BL/6. Ao contrário dos animais suscetíveis, os camundongos resistentes BALB/c não apresentaram congestão vascular importante e nem aumento da permeabilidade vascular, porém, uma pequena quantidade de eritrócitos e leucócitos foi visualizada aderida na microvasculatura do cérebro.

Vários aspectos histopatológicos que observamos nos animais suscetíveis à malária cerebral são semelhantes aos achados post-mortem em cérebros de indivíduos que morreram por malária cerebral. A congestão vascular observada nos animais suscetíveis foi relatada em indivíduos com malária cerebral e sua quantidade foi relacionada com o coma profundo e evolução mais rápida para a morte (Menezes e cols, 2012; Ponsford e cols, 2012). De fato, os animais C57BL/6 que começaram a morrer mais cedo, apresentaram uma maior quantidade de vasos

congestionados em comparação ao grupo dos animais CBA, em que os animais começaram a morrer dois dias mais tarde. Podemos sugerir que a congestão observada nos dois modelos foi decorrente da maior aderência de leucócitos, eritrócitos e plaquetas nos vasos, já que observamos nos dois modelos de malária cerebral uma grande quantidade de vasos cerebrais e cerebelares com muitos eritrócitos e/ou leucócitos aderidos quando comparados ao modelo resistente BALB/c.

Os relatos das alterações histopatológicas cerebrais em indivíduos que morreram de malária cerebral sugerem que a aumentada aderência e o sequestro de eritrócitos parasitados ou não na microvasculatura cerebral estão relacionados com a forma clínica cerebral da malária (Silamut e cols, 1999; Tripathi e cols, 2007; Dorovini-Zis e cols, 2011). Diferentemente, no modelo murino de malária cerebral ocorre sequestro de leucócitos e eritrócitos, sendo esse um dos motivos do ceticismo dos pesquisadores em relação aos estudos que utilizam o modelo experimental para entender os mecanismos fisiopatogênicos e a resposta à terapêutica na malária (White e cols, 2010, Graig e cols, 2012). Nossos dados mostraram que no camundongo C57BL/6 ocorre aderência de leucócitos em 20,2% dos vasos estudados, que com grande frequência estão presentes nos vasos congestionados e ocluídos, principalmente nas regiões corticais e hipocampais, não apresentando número significativo de eritrócitos aderidos. Entretanto, é importante considerar que apesar da predominância de sequestro de eritrócitos parasitados, vários estudos histopatológicos mostraram que os leucócitos e plaquetas também podem ser encontrados aderidos na microvasculatura cerebral, tanto em crianças quanto em adultos (Patnaik e cols, 1994; Grau e cols, 2003; Armah e cols, 2005; Dorovini-Zis e cols, 2011).

Os camundongos C57BL/6 apresentaram uma grande quantidade de leucócitos aderidos nos vasos cerebrais e cerebelares. Entretanto, embora não estudado neste trabalho, é possível que o tipo de leucócito recrutado localmente e o momento em que isso ocorre contribua para a evolução da doença. De fato, tem sido sugerido que, no modelo animal, a presença de monócitos, neutrófilos e células CN não são essenciais para o desenvolvimento das alterações cerebrais, porém são importantes no início da doença devido à produção de citocinas. Já os linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> parecem desempenhar um papel crucial na fisiopatologia da doença, visto que animais C57BL/6 depletados dessas células não desenvolvem a forma cerebral e morrem em torno da terceira semana de infecção com hiperparasitemia e

anemia (Chen e cols, 2000 b; Belnoue e cols, 2002; Hansen e cols, 2007; Villegas-Mendez e cols, 2012).

Apesar de não termos visto um acúmulo importante de eritrócitos nos vasos dos camundongos C57BL/6, provavelmente sua presença, mesmo que em pequena quantidade pode ter estimulado a ativação dos leucócitos, que ao contrário se encontram aderidos em maior quantidade na microvasculatura desses animais. De fato, estudos mostram que a aderência dos eritrócitos nos cérebros dos camundongos C57BL/6 é um importante fator para o desenvolvimento da malária cerebral (Benoue e cols, 2008; Baptista e cols, 2010; McQuillan e cols, 2011; Claser e cols, 2011).

Diferentemente do observado nos camundongos C57BL/6, nos camundongos CBA, a aderência de eritrócitos ocorreu em maior quantidade e a de leucócitos em menor quantidade, apresentando maior semelhança com as alterações histopatológicas observadas no cérebro de indivíduos que morreram de malária cerebral. Além disso, a presença de eritrócito ou leucócito aderido ao endotélio vascular foi muito menos frequente nos camundongos BALB/c. Nossos dados foram semelhantes aos de Ampawong e cols (2011), que mostraram que o camundongo CBA apresenta maior quantidade de leucócitos e eritrócitos aderidos na microvasculatura cerebral do que os camundongos BALB/c, resistentes à forma cerebral, e sugeriram que esse acúmulo contribuiu para a presença mais frequente de edema perivascular nos animais CBA. Estudos com tomografia computadorizada de indivíduos com malária cerebral mostraram que o edema é um achado frequente em adultos (Looareesuwan e cols, 1995; Patankar e cols, 2002) e em crianças (Potchen e cols, 2010), e que provavelmente seja um reflexo do acúmulo de eritrócitos parasitados no cérebro.

O aumento da permeabilidade vascular tem sido sugerido como a causa do edema cerebral na malária. Nossos dados mostraram que somente nos animais suscetíveis à malária cerebral houve aumento da permeabilidade vascular. Nos camundongos C57BL/6, que morreram mais precocemente do que os animais CBA, a quantidade de azul de Evans extravasado para o tecido cerebral e cerebelar foi maior do que nos camundongos CBA, sugerindo que a maior permeabilidade vascular possa estar relacionada com a gravidade da doença. Alguns estudos em murinos (Cabral e cols, 2011) e humanos (Dondorp e cols, 2004) sugeriram que o aumento da permeabilidade dos vasos cerebrais tenha sido reflexo de hipertensão intracraniana, decorrente da congestão e bloqueio mecânico. Porém, esse dado não



explica totalmente o dano tecidual, visto que em alguns casos de malária, as alterações cerebrais não se associaram à oclusão ou congestão vascular (Patankar e cols, 2002).

Tem sido considerado que as alterações da permeabilidade vascular na malária estão relacionadas com alterações da barreira hemato-encefálica promovida pelo processo inflamatório gerado localmente no tecido cerebral. Os mecanismos de resposta inflamatória responsáveis pela perda de integridade vascular são complexos, sendo orquestrados não somente por leucócitos em resposta à presença de eritrócitos parasitados na microvasculatura cerebral, mas também, pela ativação de plaquetas, astrócitos e neurônios (Combes e cols, 2010; Rénia e cols, 2012). O processo inflamatório contribui para a disfunção da barreira hemato-encefálica por estimular o aumento na expressão de moléculas de aderência (Wassmer e cols, 2011; von Zur Muhlen e cols, 2008), por diminuir a conexão entre as células endoteliais e a adesividade de astrócitos ao vaso e por estimular a apoptose celular em torno do vaso em decorrência do estresse oxidativo (Medana e cols, 1996; Suidan e cols, 2008; Jambou e cols, 2010). Nos animais estudados, a presença de processo inflamatório foi pequena. Entretanto, observamos diferenças na produção de radicais livres. De fato, nos animais C57BL/6, que mostraram maior permeabilidade vascular e forma clínica mais grave, embora a produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos dos animais não infectados tenha sido menor, o aumento relativo após a infecção, foi muito maior nos animais C57BL/6 que apresentaram maior permeabilidade cerebral do que nos animais CBA e BALB/c. Entretanto, o oposto foi verificado em relação ao óxido nítrico.

Em síntese, nossos dados mostraram que as três linhagens com bases genéticas diferentes que foram estudadas apresentaram diferentes mecanismos de respostas na malária. Nos três modelos, a produção de citocinas, de espécies reativas e de enzimas formadoras de eicosanóides foi diferente. Nos camundongos C57BL/6, provavelmente a precocidade da morte e os fenômenos histopatológicos observados na intimidade do tecido cerebral tenham sido reflexo dos mecanismos inflamatórios acionados principalmente pela atividade da FNT- $\alpha$ , a COX-2 e a 5-LOX no cérebro. Já a parasitemia mais alta no modelo C57BL6 sugere que os mecanismos microbicidas também estão alterados, o que pode ter sido determinado pela diminuição da produção do NO. Possivelmente, a ação inibitória da IL-10 sobre a produção de IL-12 tenha contribuído para a diminuição do NO.

Os camundongos CBA apresentam um retardo do início da morte quando comparados com os camundongos C57BL/6 e com uma parasitemia um pouco mais baixa. Além disso, as alterações histopatológicas foram mais discretas do que aquelas observadas nos camundongos C57BL/6. Além disso, a presença de eritrócitos aderidos nos vasos cerebrais no camundongo CBA e de leucócitos nos vasos dos camundongos C57BL/6 chama atenção para uma possível expressão diferente de moléculas de aderência, possivelmente engendradas pela expressão diferente de citocinas nos dois modelos. Nos camundongos CBA, diferente dos camundongos C57BL/6, houve diminuição da produção de FNT- $\alpha$  e IL-10 e não houve alteração na produção de espécies reativas, mas estes animais mostraram uma produção mais elevada de IL-17 e IL-4 e uma predominância de COX-2 no cérebro.

O BALB/c, por sua vez, apesar de apresentar algumas alterações no tecido cerebral morreu mais tardiamente sem desenvolver sinais neurológicos. É provável que isto tenha ocorrido pelo fato desses animais conseguirem uma melhor regulação da produção de todas estas citocinas logo no início da doença. De fato, houve translocação para o núcleo em maior quantidade do PPAR- $\gamma$ , que é um regulador da expressão das moléculas da via do NF $\kappa$ B, nesses animais. É provável que esses padrões diferentes de resposta observada entre os três modelos foram reflexo da ativação diferente das vias de sinalização do NF $\kappa$ B e da regulação exercida pelo PPAR- $\gamma$  na transcrição gênica e ativação dos componentes dos corpúsculos lipídicos. Contudo, é importante ainda esclarecer como o p50 e o cRel se comportam nesses animais.

As diferenças nos padrões de respostas entre os camundongos suscetíveis à malária cerebral sugerem que os mecanismos responsáveis pelo desencadeamento da forma cerebral também devem ser diferentes entre essas duas linhagens de camundongos e sugere que isso possa ser extensivo para o humano, que mostra expressões clínicas diferenciadas e também com gravidades diferentes. Contudo, um achado comum entre os animais que evoluíram para a malária cerebral foi a presença tanto de citocinas anti-inflamatórias quanto pró-inflamatórias, sugerindo que ambas respostas devem contribuir para o desenvolvimento da síndrome neurológica.

Em conclusão, nossos dados mostraram que vários parâmetros observados nos camundongos suscetíveis à malária cerebral são compartilhados ou não com os seres humanos e que a escolha do modelo experimental para pesquisas

em malária deve levar em consideração a linhagem do camundongo e suas capacidades individuais de resposta. Além disso, nossos dados contribuíram para aumentar a compreensão de como as vias intracelulares que são preferencialmente estimuladas podem contribuir para determinar expressões clínicas tão diferentes, como a morte precoce pela malária cerebral (C57BL/6 e CBA) ou a morte tardia pela anemia (BALB/c), que são determinadas por cada interação parasito-hospedeiro e que são dependentes das características de cada hospedeiro.

**CONCLUSÕES**

1. Os camundongos C57BL/6 infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA morreram precocemente a partir do sexto dia de infecção com a mais alta parasitemia e uma resposta imune preponderantemente inflamatória (Figura 38). No sexto dia de infecção as seguintes alterações foram observadas: a) Houve aumento da produção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e diminuição do NO; b) A determinação das citocinas no homogenato do tecido cerebral mostrou que as citocinas IL-10 e FNT- $\alpha$  estavam mais elevadas nos animais infectados do que nos não infectados e que não houve modificação da concentração das citocinas IL-4, IL-12 e IL-17 nos animais infectados em relação aos não infectados; c) Embora tenha aumentado a expressão do inflamassoma NALPR1, houve diminuição da produção da IL-1 $\beta$ ; d) A presença de corpúsculos lipídicos nos macrófagos peritoneais foi paralela ao aumento discreto de PPAR- $\gamma$  no núcleo; e) A expressão de 5-LOX foi maior do que a de COX-2. A 5-LOX foi observada nas células cerebrais, nos vasos congestionados do cérebro e no endotélio vascular do cerebelo, enquanto, a COX-2 foi expressa nas células cerebrais e nos vasos com células aderidas. Não houve alteração da quantidade de 5-LOX e de COX-2 na micróglia; f) Apenas a via de sinalização canônica do NF $\kappa$ B foi ativada. É possível que esses resultados tenham sido responsáveis pelas seguintes alterações histopatológicas observadas no modelo C57BL/6 infectado: a) permeabilidade vascular muito aumentada; b) grande congestão vascular; c) obstrução vascular por leucócitos; d) aderência principalmente de leucócitos; e) raros focos de micro-hemorragia; e f) raros focos com infiltrado leucocitário.
2. Os camundongos CBA infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA morreram a partir do oitavo dia de infecção e parasitemia menor do que a dos camundongos C57BL/6 (Figura 39). Dois dias antes do início da morte nesse grupo, a resposta imune apresentou uma tendência a um padrão inflamatório mais equilibrado. No sexto dia de infecção as seguintes alterações foram observadas: a) Não houve alteração na produção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de NO; b) No homogenato do tecido cerebral houve diminuição das citocinas IL-10 e FNT- $\alpha$  e nenhuma alteração da IL-12 em relação aos animais não infectados, enquanto que as citocinas IL-4 e IL-17, que estavam elevadas em relação aos outros modelos, se encontravam em níveis mais baixos em relação aos animais não infectados; c) Embora tenha havido ativação do inflamassoma NALPR1, não houve alteração da IL-1 $\beta$ ; d) O aumento dos corpúsculos lipídicos nos macrófagos peritoneais após a infecção foi paralela

a uma diminuição da quantidade total e citoplasmática de PPAR- $\gamma$ ; e) A expressão de COX-2 predominou sobre a de 5-LOX nos animais infectados. A COX-2 foi observada nas células cerebrais e nos vasos congestionados do cérebro, enquanto, a 5-LOX foi expressa somente nas células cerebrais. Nem na micróglia e nem nos macrófagos houve aumento da expressão de 5-LOX e COX-2; f) A duas vias de sinalização, canônica e não-canônica, foram ativadas, mas houve predomínio da atividade não-canônica no núcleo, pela infecção. É possível que esses resultados tenham sido responsáveis pelas seguintes alterações histopatológicas observadas no modelo CBA infectado: a) permeabilidade vascular aumentada; b) congestão vascular; c) raros vasos obstruídos com leucócitos; d) aderência de leucócitos e, em maior quantidade, de eritrócitos e; e) raros focos de micro-hemorragia

3. Os camundongos BALB/c infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA começaram a morrer a partir do oitavo dia de infecção, porém, 50% dos animais só morreram em torno da terceira semana após a infecção (Figura 40). No oitavo dia da infecção, a parasitemia ainda estava baixa. No sexto dia de infecção, os camundongos BALB/c não apresentaram padrão de resposta anti- ou pró-inflamatória, fato evidenciado pelos seguintes resultados: a) Não houve alteração na produção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e do NO pela infecção; b) No homogenato do tecido cerebral houve diminuição das citocinas IL-10 e FNT- $\alpha$  e nenhuma alteração das IL-12, IL-4 e IL-17 após a infecção, que se mantiveram em níveis baixos; c) Embora tenha havido ativação do inflamassoma NALPR1, não houve alteração da produção de IL-1 $\beta$ ; d) A presença de corpúsculos lipídicos nos macrófagos peritoneais foi paralela à diminuição da quantidade total e citoplasmática de PPAR- $\gamma$  que foi devida a uma maior translocação do PPAR- $\gamma$ , para o núcleo após a infecção; e) Não houve aumento da expressão de COX-2 e 5-LOX em células ou vasos cerebrais e cerebelares; f) A duas vias de sinalização do NF $\kappa$ B, canônica e não-canônica, foram ativadas, mas houve predomínio da atividade canônica no núcleo após a infecção. Os camundongos BALB/c não apresentaram sinais clínicos de malária cerebral, como também não apresentaram aumento da permeabilidade vascular. Mas, algumas regiões focais de micro-hemorragia e infiltrado inflamatório foram observadas nos animais infectados. Esses animais apresentaram ainda raros vasos obstruídos por leucócitos, pouca congestão vascular e aderência de eritrócitos e leucócitos.

4. Nossos resultados mostraram que a via canônica do NF $\kappa$ B parece estar relacionada com o processo inflamatório que leva ao desenvolvimento da forma cerebral, uma vez que os camundongos C57BL/6 que apresentaram o desenlace mais rápido pela infecção só ativaram essa via. Por outro lado, a ativação da via não canônica parece interferir no desenvolvimento da forma grave, melhorando os mecanismos inflamatórios gerados pela via canônica ou por alterar a formação dos dímeros do RelA no citoplasma, como visto nos camundongos BALB/c, ou por inibir sua translocação para o núcleo. A via não canônica deve, inclusive, atenuar o espectro de ativação celular pela síntese de proteínas envolvidas nos mecanismos regulatórios e proliferativos assim como deve refletir na produção de proteínas de adesão e de citocinas diferentes daquelas estimuladas pela via não canônica, uma vez que os camundongos CBA, que também desenvolvem a malária cerebral, morrem um pouco depois dos camundongos C57BL/c com diferente padrão de sequestro vascular e produção de citocinas. A via não canônica na malária humana não foi ainda estudada, mas nossos achados sugerem, pela primeira vez, que a ativação dessa via pode explicar os diferentes espectros de produção de citocinas e de alterações neurológicas e sistêmicas da malária. Contudo, mais estudos precisam ser realizados para melhor avaliar a via de transdução do NF $\kappa$ B que é induzida pela infecção, uma vez que essas informações podem possibilitar o conhecimento de moléculas chaves que podem ser alvo de novos tratamentos.
  
5. Nossos resultados também estabelecem um papel importante para o PPAR- $\gamma$  na resistência à forma cerebral, uma vez que essa proteína se encontra aumentada e intensamente translocada para os núcleos dos macrófagos nos camundongos BALB/c, que são resistentes à malária cerebral, o mesmo não ocorrendo nos camundongos suscetíveis. Além disso, a presença do PPAR- $\gamma$  deve ter regulado as ações da via do NF $\kappa$ B, já que na linhagem resistente BALB/c não houve alteração, ou houve diminuição dos mediadores inflamatórios como IL-1 $\beta$ , IL-12, FNT- $\alpha$ , COX-2, 5-LOX, NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que foram estudados no presente trabalho e que são regulados por esta via. Portanto, esses dados sugerem que o PPAR- $\gamma$  desempenha um papel protetor na malária, e que os mecanismos reguladores da via do NF $\kappa$ B poderiam ser alvos importantes para a prevenção da forma cerebral da doença.

6. Um achado comum entre os animais que evoluíram para a malária cerebral foi a presença tanto de citocinas anti-inflamatórias (CBA: IL-4 e C57BL/6: IL-10) quanto pró-inflamatórias (CBA: IL-17 e C57BL/6: FNT- $\alpha$ ), sugerindo que ambas as respostas contribuem para o desenvolvimento da síndrome neurológica e também que diferentes citocinas podem desempenhar um papel importante na doença. Além disso, o padrão de produção de FNT- $\alpha$  e IL-10 antes da infecção pode ter influenciado nas respostas imunitárias iniciais dos camundongos BALB/c e CBA contra o *Plasmodium* e contribuído para as alterações cerebrais tardiamente nos camundongos C57BL/6, sugerindo que o momento em que as citocinas são secretadas pode determinar a resolução ou a persistência e gravidade da infecção malárica. Isso demonstra que o uso de terapias anticitocinas em humanos como forma coadjuvante de tratamento pode ter um papel limitado na prevenção dos danos neurológicos e deve sempre considerar a unidade de tempo, uma vez que, ao bloquear a ação da citocina, isso pode desequilibrar a dinâmica entre os mecanismos anti-plasmodiais iniciais e os mecanismos imunopatológicos tardios.
  
7. Em conjunto, nossos dados sugerem que as três linhagens de camundongos apresentaram mecanismos imunofisiopatogênicos diferentes para as alterações determinadas pelo *Plasmodium berghei* ANKA e que a hiperativação do sistema imunitário que ocorre na malária provavelmente está relacionada com as características genéticas individuais que determinarão o tipo de evolução da doença. As diferenças dos padrões de respostas observadas entre os dois modelos de camundongos suscetíveis à malária cerebral (C57BL/6 e CBA) sugerem que existem diferentes mecanismos determinando as alterações cerebrais nos camundongos e possivelmente isto também deve ocorrer no ser humano. Por isso, é improvável que apenas um único modelo consiga reproduzir a complexidade e o espectro de respostas observadas na malária humana. Por isso, a utilização de vários modelos experimentais deve ser mais adequada para compreensão da doença e para a busca de mecanismos em comuns que possam ser alvos para o estudo de novas terapêuticas, contudo, em situações de restrições do uso de animais para experimentação, a escolha do modelo experimental para estudos em malária deve sempre levar em consideração o mecanismo a ser estudado.



Em conclusão, apesar dos modelos murinos não reproduzirem fielmente a alterações imunopatológicas da malária humana, os estudos nestes animais tem contribuído muito para explicar os detalhes das interações moleculares e os mecanismos desencadeados no interior da célula que refletem várias alterações que são observadas em seres humanos. A utilização dos modelos experimentais possui vantagens sobre os estudos em humanos, primeiro porque a isogenia facilita a reprodutibilidade dos mecanismos nos estudos com novas drogas e com vacinas, e segundo, porque apesar de genes poderem ser bloqueados ou nocauteados em células humanas, a visualização dos seus efeitos sobre a evolução da doença só é possível em animais nocauteados. Assim, nosso contribui para esclarecer a interação e a importância de vários mecanismos inflamatórios que ainda não são totalmente conhecidos na malária e que podem ser alvos de futuras intervenções terapêuticas. O entendimento desses mecanismos, contudo, produzirá sua maior contribuição quando ele for capaz de junto, com outros, diminuir a inaceitável alta morbidade e mortalidade pela doença.

PARASITEMIA: mais alta

SOBREVIDA: 12 dias

MORTALIDADE: 6º dia

NÃO ALTEROU: IL-4, IL-12 e IL-17

DIMINUIU: IL-1 $\beta$ , NO e 5-LOX nos M $\phi$

AUMENTOU: FNT- $\alpha$ , IL-10, PPAR- $\gamma$  discretamente no núcleo, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ASC, CASPASE 1, NALPR1, 5-LOX nos vasos p3 e células e COX-2 nas células

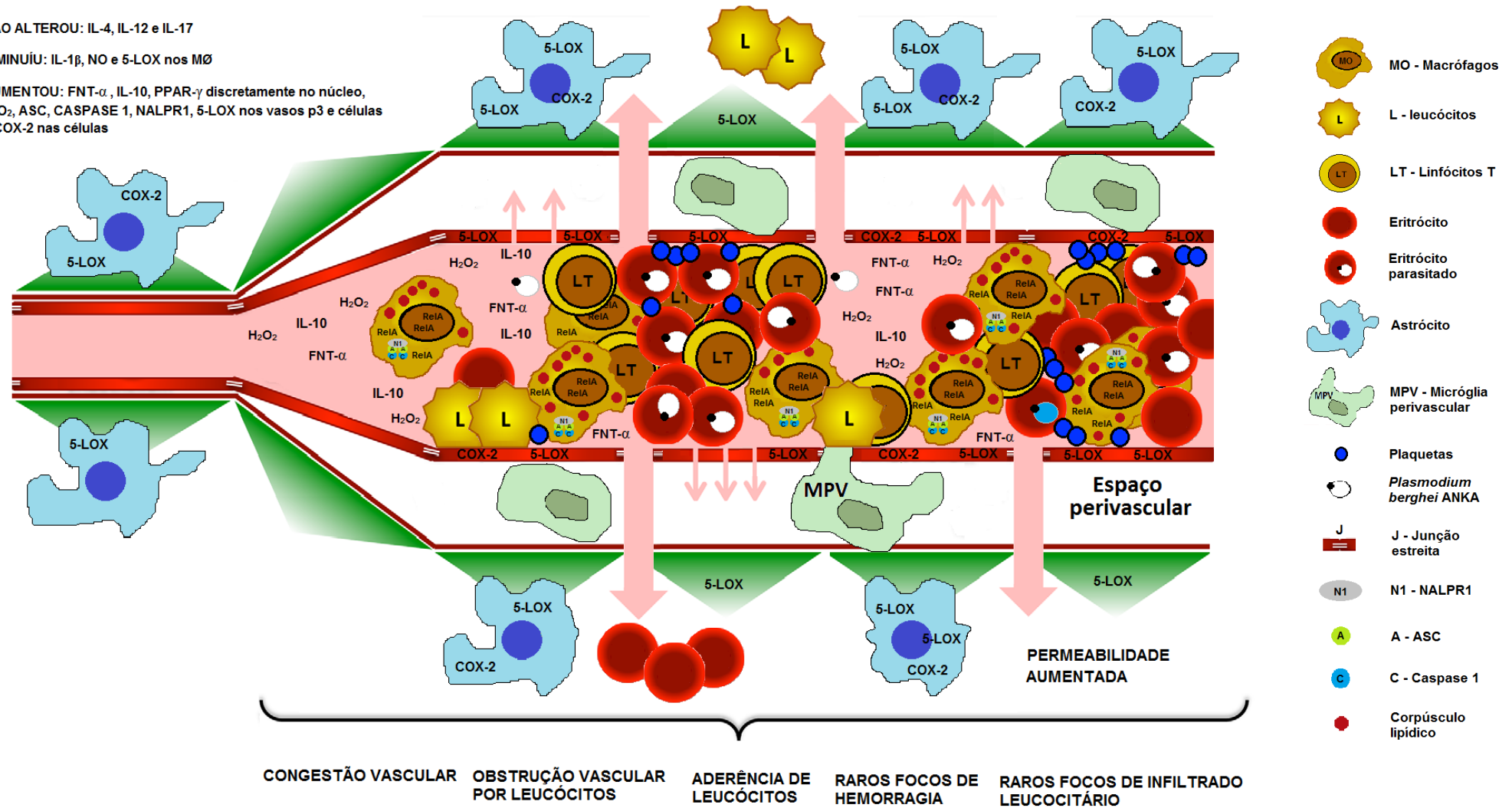


Figura 38. Alterações e mecanismos inflamatórios apresentados pelo modelo susceptível à malária cerebral C57BL/6.





## **REFERÊNCIAS**

Adibhatla RM, Hatcher JF. Altered Lipid Metabolism in Brain Injury and Disorders. *Subcell Biochem.* 2008; 49: 241-268.

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.

Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhães BL, Mourão MP, Lacerda MV, Alecrim Md. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16: 1611-1614.

Aleshin S, Reiser G. Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR)- $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  and  $\gamma$  triad in regulation of reactive oxygen species signaling in brain. *Biol Chem.* 2013. [in press].

Alves MFC, Santos-Neto LL, Muniz-Junqueira MI, Tosta CE. Cytokines and dysregulation of the immune response in human malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992; 87: 331–336.

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.

Amani V, Vigarito AM, Belnoue E, Marussig M, Fonseca L, Mazier D, Renia L. Involvement of IFN-gamma receptor-mediated signaling in pathology and anti-malarial immunity induced by *Plasmodium berghei* infection. *Eur J Immunol.* 2000; 30: 1646–1655.

Ampawong S, Combes V, Hunt NH, Radford J, Chan-Ling T, Pongponrat E, Grau GRE. Quantitation of brain edema and localisation of aquaporin 4 expression in relation to susceptibility to experimental cerebral malaria. *Int J Clin Exp Pathol.* 2011; 4: 566–574.

Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarêncio J, Camargo LM, Barral A, Barral-Netto M. Severe *Plasmodium vivax* malária exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J.* 2010; 9: 13.

Angulo I, Fresno M. Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; 9: 1145-1152.

Anrather J, Racchumi G, Iadecola C. NF-kappaB regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox. *J Biol Chem.* 2006; 281: 5657-5667.

Anstey MN, Granger DL, Hassanali MY, Mwaikambo ED, Duffy PE, Weinberg JB. Nitric oxide, malaria and anemia: inverse relationship between nitric oxide and hemoglobin concentration in asymptomatic children exposed to malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 61: 249-252.

Antinori S, Galimberti L, Milazzo L, Corbellino M. Biology of Human Malaria Plasmodia Including *Plasmodium knowlesi*. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2012; 4: e2012013.

Armah H, Doodoo AK, Wiredu EK, Stiles JK, Adjei AA, Gyasi RK, Tettey Y. High-level cerebellar expression of cytokines and adhesion molecules in fatal, paediatric, cerebral malaria. *Ann Trop Med Parasitol*. 2005; 99: 629-647.

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

Awasthi A, Kumar A, Upadhyay SN, Yamada T, Matsunaga Y. Nitric oxide protects against chloroquine resistant *Plasmodium yoelii* nigeriensis parasites *in vitro*. *Exp Parasitol*. 2003; 105: 184-191.

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

Bagot S, Idrissa Boubou M, Campino S, Behrschmidt C, Gorgette O, Guénet JL, Penha-Gonçalves C, Mazier D, Pied S, Cazenave PA. Susceptibility to experimental cerebral malaria induced by *Plasmodium berghei* ANKA in inbred mouse strains recently derived from wild stock. *Infect Immun*. 2002; 70: 2049-2056.

Balachandar S, Katyal A. Peroxisome proliferator activating receptor (PPAR) in cerebral malaria (CM): a novel target for an additional therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011; 30: 483-498.

Ball HJ, MacDougall HG, McGregor IS, Hunt NH. Cyclooxygenase-2 in the pathogenesis of murine cerebral malaria. *J Infect Dis*. 2004; 189: 751-758.

Baptista FG, Pamplona A, Pena AC, Mota MM, Pied S, Vigario AM. Accumulation of *Plasmodium*-infected red blood cells in the brain is crucial for the development of cerebral malaria in mice. *Infect Immun*. 2010; 78: 4033-4039.

Basak S, Hoffmann A. Crosstalk via the NF- $\kappa$ B signaling system. *Cytokine Growth* 2008; 19: 187-197.

Basak S, Shih VF, Hoffmann A. Generation and activation of multiple dimeric transcription factors within the NF-kappaB signaling system. *Mol Cell Biol*. 2008; 28: 3139-3150.

Bate CA, Taverne J, Playfair JHL. Malarial parasites induce tumour necrosis factor production by macrophages. *Immunology*. 1988; 64: 227-231.

Belnoue E, Kayibanda M, Vigario AM, Deschemin JC, van Rooijen N, Viguier M, Snounou G, Rénia L. On the pathogenic role of brain-sequestered alphabeta CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. *J Immunol*. 2002; 169: 6369-6475.

Belnoue E, Potter SM, Rosa DS, Mauduit M, Gruner AC, Kayibanda M, Mitchell AJ, Hunt NH, Rénia L. Control of pathogenic CD8+ T cell migration to the brain by IFN-gamma during experimental cerebral malaria. *Parasite Immunol.* 2008; 30(10): 544-553.

Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC, Staels B, Glineur C. Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003; 85: 267-273.

Blanquicett C, Kang BY, Ritzenthaler JD, Jones DP, Hart CM. Oxidative stress modulates PPAR gamma in vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2010; 48: 1618-1625.

Braga MD, Alcântara GC, da Silva CN, Nascimento CG. Cerebral Malaria in Ceará: a case report. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2004; 37: 53-55.

Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico. Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2000 a 2011. 2013; 1: 3-16.

Boeuf PS, Loizon S, Awandare GA, Tetteh JK, Addae MM, Adjei GO, Goka B, Kurtzhals JA, Puijalon O, Hviid L, Akanmori BD, Behr C. Insights into deregulated TNF and IL-10 production in malaria: implications for understanding severe malarial anaemia. *Malar J.* 2012; 11: 253.

Bogdan C. Nitric oxide and immune response. *Nat Immunol.* 2001; 2: 907-916.

Boggild AK, Krudsood S, Patel SN, Serghides L, Tangpukdee N, Katz K, Wilairatana P, Liles WC, Loareesuwan S, Kain KC. Use of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists as adjunctive treatment for *Plasmodium falciparum* malaria: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Infect Dis.* 2009; 49: 841-849.

Bopp SE, Ramachandran V, Henson K, Luzader A, Lindstrom M, Spooner M, Steffy BM, Suzuki O, Janse C, Waters AP, Zhou Y, Wiltshire T, Winzeler EA. Genome wide analysis of inbred mouse lines identifies a locus containing PPAR-gamma as contributing to enhanced malaria survival. *PLoS One.* 2010; 5: e10903.

Borges TKS. Influência da Pentoxifilina na infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA em camundongos susceptíveis e resistentes à malária cerebral [Dissertação de Mestrado]. Brasília: Universidade de Brasília. Pós-graduação em Patologia Molecular. Faculdade de Medicina, 2006.

Bozza PT, Bandeira-Melo C. Mechanisms of leukocyte lipid body formation and function in inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005; 100: 113-120.

Bozza PT, Magalhães KG, Weller PF. Leukocyte lipid bodies - biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 2009, 1791: 540-551.



Bradley JR, Pober JS. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene*. 2001; 20: 6482-6491.

Brinkmann V, Kaufmann SH, Simon MM, Fischer H. Role of macrophages in malaria: O<sub>2</sub> metabolic production and phagocytosis by splenic macrophages during lethal *Plasmodium berghei* and self-limiting *Plasmodium yoelli* infection 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. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1999(b); 25: 331-340.

Brown H, Turner G, Rogerson S, Tembo M, Mwenechanya J, Molyneux M, Taylor T. Cytokine expression in the brain in human cerebral malaria. *J Infect Dis*. 1999(a); 180: 1742-1746.

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

Bueno LL, Morais CG, Lacerda MV, Fujiwara RT, Braga EM. Interleukin-17 producing T helper cells are increased during natural *Plasmodium vivax* infection. *Acta Trop*. 2012; 123: 53-57.

Buffet PA, Safeukui I, Deplaine G, Brousse V, Prendki V, Thellier M, Turner GD, Mercereau-Puijalon O. The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. *Blood*. 2011; 117: 381-392.

Burns KA, Heuvel VJP. Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1771: 952-960.

Buzzo CL, Campopiano JC, Massis LM, Lage SL, Cassado AA, Leme-Souza R, Cunha LD, Russo M, Zamboni DS, Amarante-Mendes GP, Bortoluci KR. A novel pathway for inducible nitric-oxide synthase activation through inflammasomes. *J Biol Chem*. 2010; 285: 32087-32095.

Cabantous S, Poudiougou B, Oumar AA, Traore A, Barry A, Vitte J, Bongrand P, Marquet S, Doumbo O, Dessein AJ. Genetic evidence for the aggravation of *Plasmodium falciparum* malaria by interleukin 4. *J Infect Dis*. 2009; 200: 1530-1539.

Cabantous S, Poudiougou B, Traore A, Keita M, Cisse MB, Doumbo O, Dessein AJ, Marquet S. Evidence that interferon-gamma plays a protective role during cerebral malaria. *J Infect Dis*. 2005; 192: 854-860.

Cabrales P, Carvalho LJM. Intravital Microscopy of the Mouse Brain Microcirculation using a Closed Cranial Window. *JoVE*. 2010; 45.

Cabrales P, Zanini GM, Meays D, Frangos JA, Carvalho LJM. Nitric oxide protection against murine cerebral malaria is associated with improved cerebral

microcirculatory physiology. *J Infect Dis.* 2011; 203: 1454–1463.

Cai H. NAD(P)H oxidase-dependent self-propagation of hydrogen peroxide and vascular disease. *Circ Res.* 2005; 96: 818-822.

Campanella GS, Tager AM, El Khoury JK, Thomas SY, Abrazinski TA, Manice LA, Colvin RA, Luster AD. Chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9 and CXCL10 are required for the development of murine cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105: 4814-4819.

Carroll RW, Wainwright MS, Kim KY, Kidambi T, Gómez ND, Taylor T, Haldar K.A rapid murine coma and behavior scale for quantitative assessment of murine cerebral malaria. *PLoS One.* 2010; 5: e13124.

Carvalho LJ, 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 Parasitol.* 2000; 95: 1-7.

CEUA/IB - Drogas de preferência e regimes para anestesia e analgesia de animais. Disponível em: [<http://e-groups.unb.br/ib/ceua.htm>]. Acesso em 2010.

CFMVet - Conselho Federal de Medicina Veterinária. Procedimentos e métodos de eutanásia em animais. Res. No 714 (20 de junho de 2002).

Chandra D, Naik S. *Leishmania donovani* infection down-regulates TLR2-stimulated IL-12p40 and activates IL-10 in cells of macrophage/monocytic lineage by modulating MAPK pathways through a contact-dependent mechanism. *Clin Exp Immunol.* 2008; 154: 224-234.

Charron AJ, Sibley LD. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci.* 2002; 115: 3049-3059.

Chartrain NA, Geller DA, Koty PP, Sitrin NF, Nussler AK, Hoffman EP, Billiar TR, Hutchinson NI, Mudgett JS. Molecular cloning, structure and chromosomal localization of human inducible nitric oxide gene. *J Biol Chem.* 1994; 269: 6765-6772.

Chen L, Zhang Z, Sendo F. Neutrophils play a critical role in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Clin Exp Immunol.* 2000(b); 120: 125-133.

Chen Q, Schlichtherle M, Wahlgren M. Molecular aspects of severe malaria. *Clin Microbiol Ver.* 2000(a); 13: 439-450.

Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Pineda Torra I, Teissier E, Minnich A, Jaye M, Duverger N, Brewer BH, Fruchart JC, Clavey V, Staels B. PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med.* 2001; 7: 53-58.

Chinetti G, Lestavel S, Fruchart JC, Clavey V, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha reduces cholesterol esterification in macrophages. *Circ Res*. 2003; 92: 212-217.

Chung JY, Park YC, Ye H, Wu H. All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J Cell Sci*. 2002; 115: 679-688.

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

Clark IA, Alleva LM, Budd AC, Cowden WB. Understanding the role of inflammatory cytokines in malaria and related diseases. *Travel Med Infect Dis*. 2008; 6: 67-81.

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

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

Claser C, Malleret B, Gun SY, Wong AY, Chang ZW, Teo P, See PC, Howland SW, Ginhoux F, Rénia L. CD8 T cells and IFN-gamma mediate the time-dependent accumulation of infected red blood cells in deep organs during experimental cerebral malaria. *PLoS ONE*. 2011; 6: e18720.

Coban C, Ishii KJ, Kawai T, Hemmi H, Sato S, Uematsu S, Yamamoto M, Takeuchi O, Itagaki S, Kumar N, Horii T, Akira S. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med*. 2005; 201: 19-25.

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

Combes V, El-Assaad F, Faille D, Jambou R, Hunt NH, Grau GE. Microvesiculation and cell interactions at the brain-endothelial interface in cerebral malaria pathogenesis. *Prog Neurobiol*. 2010; 91: 140-151.

Cooke BM, Wahlgren M, Cooppel RL. *Falciparum* malaria: sticking up, standing out and out-standing. *Parasitol Today*. 2000; 16: 416-420.

Cryan JF, Holmes A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov*. 2005; 4: 775-790.

Curfs JH, van der Meer JW, Sauerwein RW, Eling WM. Low dosages of interleukin 1 protect mice against lethal cerebral malaria. *J Exp Med*. 1990; 172: 1287-1291.

Dai M, Reznik SE, Spray DC, Weiss LM, Tanowitz HB, Gulinello M, Desruisseaux MS. Persistent cognitive and motor deficits after successful antimalarial treatment in

murine cerebral malaria. *Microbes and Infection*. 2010; 12: 1198-1207.

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

da Silva IBA, Araújo JR, Silva CA, Carneiro M, Souza JM. Casos atípicos de malária *vivax*; atypical cases of malaria *vivax*. *Rev Bras Ciên Saúde*. 2007. 11: 277-286.

da Silva IBA, Ventura AMRS, Pinto AYN, Muniz-Junqueira MI, Diniz MIA, Fuchshuber-Moraes M, Santos SEB, Souza JM. Fator de necrose tumoral alfa e gravidade clínica em primo-infectados pelo *Plasmodium vivax*. Tumor necrosis factor alpha and clinical severity in non-immune *Plasmodium vivax*. *Rev Bras Ciên Saúde*. 2008. 12: 113-126.

D'Avila H, Freire-de-Lima CG, Roque NR, Teixeira L, Barja-Fidalgo C, Silva AR, Melo RC, Dosreis GA, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E<sub>2</sub> generation and increased parasite growth. *J Infect Dis*. 2011; 204: 951-961.

de Assis EF, Silva AR, Caiado LF, Marathe GK, Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM, Bozza PT, de Castro-Faria-Neto HC. Synergism between platelet-activating factor-like phospholipids and peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists generated during low density lipoprotein oxidation that induces lipid body formation in leukocytes. *J Immunol* 2003; 171: 2090-2098.

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

de Kossodo S, Monso C, Juillard P, Velu T, Goldman M, Grau GE. Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria. *Immunology*. 1997; 91: 536-540.

de Souza JB, Hafalla JC, Riley EM, Couper KN. Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. *Parasitology* 2009; 137: 755-772.

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

Deininger MH, Kremsner PG, Meyermann R, Schluesener HJ. Focal accumulation of cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-2 expressing cells in cerebral malaria. *J Neuroimmunol*. 2000; 106: 198-205.

Derudder E, Dejardin E, Pritchard LL, Green DR, Korner M, Baud V. RelB/p50 dimers are differentially regulated by tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin-beta receptor activation: critical roles for p100. *J Biol Chem*. 2003; 278: 23278-23284.

Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Ver.* 1999; 20: 649-688.

Dey S, Bindu S, Goyal M, Pal C, Alam A, Iqbal MS, Kumar R, Sarkar S, Bandyopadhyay U. Impact of intravascular hemolysis in malaria on liver dysfunction: involvement of hepatic free heme overload, NF- $\kappa$ B activation, and neutrophil infiltration. *J Biol Chem.* 2012; 287: 26630-26646.

di Battista JA, Zhang M, Martel-Pelletier J, Fernandes J, Alaaeddine N, Pelletier JP. Enhancement of phosphorylation and transcriptional activity of the glucocorticoid receptor in human synovial fibroblasts by nimesulide, a preferential cyclooxygenase 2 inhibitor. *Arthritis Rheum.* 1999; 42: 157-166.

di Battista JA, Martel-Pelletier J, Pelletier J. Suppression of tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) gene expression by prostaglandin E(2). Role Of early growth response protein-1 (Egr-1). *Osteoarthritis Cartilage.* 1999; 7: 395-398.

Dockrell HM, Playfair JH. Killing of blood-stage murine malaria parasites by hydrogen peroxide. *Infect Immun.* 1983; 39: 456-459.

Dondorp AM, Pongponratn E, White NJ. Reduced microcirculatory flow in severe falciparum malaria: pathophysiology and electron-microscopic pathology. *Acta Trop.* 2004; 89: 309-317.

Doolan DL, Hoffman SL. IL-12 and NK cells are required for antigen-specific adaptive immunity against malaria initiated by CD8+ T cells in the *Plasmodium yoelii* model. *J Immunol.* 1999; 163: 884-892.

Doolan DL. *Plasmodium* immunomics. *Int J Parasitol.* 2011; 41: 3-20.

Dorovini-Zis K, Schmidt K, Huynh H, Fu W, Whitten RO, Milner D, Kamiza S, Molyneux M, Taylor TE. The neuropathology of fatal cerebral malaria in Malawian children. *Am J Pathol.* 2011; 178: 2146-2158.

Dostert C, Guarda G, Romero JF, Menu P, Gross O, Tardivel A, Suva ML, Stehle JC, Kopf M, Stamenkovic I, Corradin G, Tschopp J. Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. *PLoS One.* 2009; 4: e6510.

Eisenhut. The role of interleukin-4 in the immune response. *Parasite Immunol.* 2010; 32: 470-471.

Ejigiri I, Sinnis P. *Plasmodium* sporozoite-host interactions from the dermis to the hepatocyte. *Curr Opin Microbiol.* 2009; 12: 401-407.

Ekvall H. Malaria and anemia. *Cur Opin Hemotol.* 2003; 10: 108-114.

Falvo VS, Tsytsykova AV, Goldfeld AE, Kollias G, Sfikakis PP. TNF

pathophysiology. *Molecular and Cellular Mechanisms. Curr Dir Autoimmun Basel, Karger.* 2010; 11: 27-60.

Fauconnier M, Palomo J, Bourigault ML, Meme S, Szeremeta F, Beloeil JC, Danneels A, Charron S, Rihet P, Ryffel B, Quesniaux VF. IL-12R $\beta$ 2 is essential for the development of experimental cerebral malaria. *J Immunol.* 2012;188: 1905-1914.

Faustin B, Lartigue L, Bruet JM, Luciano F, Sergienko E, Bailly-Maitre B, Volkmann N, Hanein D, Rouiller I, Reed JC. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol Cell.* 2007; 25: 713-724.

Feng D, Zhang Y, Chen G. Cortical expression of peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  after human brain contusion. *J Int Med Res.* 2008; 36: 783-791.

Ferreira AL, Matsubara LS. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress. *Rev Assoc Med Bras.* 1997; 43: 61-68.

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

Franke-Fayard B, Fonager J, Braks A, Khan SM, Janse CJ. Sequestration and tissue accumulation of human malaria parasites: can we learn anything from rodent models of malaria? *PLoS Pathog.* 2010; 6: e1001032.

Franklin KBJ; Paxinos G. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact. Terceira edição. Londres. Editora Elsevier.* 2008.

Freitas do Rosario AP, Langhorne J. T cell-derived IL-10 and its impact on the regulation of host responses during malaria. *J Parasitol.* 2012; 42: 549-555.

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.

Gardner OS, Shiao CW, Chen CS, Graves LM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent activation of p38 MAPK by thiazolidinediones involves calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase R: correlation with endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem.* 2005; 280: 10109-10118.

Garg AK, Aggarwal BB. Reactive oxygen intermediates in TNF signaling. *Mol Immunol.* 2002; 39: 509-517.

Gasparini C, Foxwell BM, Feldmann M. RelB/p50 regulates TNF production in LPS stimulated dendritic cells and macrophages. *Cytokine.* 2013; 61: 736-740.

Gaur D, Mayer DCG, Miller LH. Parasite ligand–host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. *Int J Parasitol.* 2004; 34: 1413-1442

Gerritsen ME. Physiological and pathophysiological roles of eicosanoids in microcirculation. *Cardiovasc Res.* 1996; 32: 720-732.

Ghosh S, Sengupta A, Sharma S, Sonawat HM. Metabolic fingerprints of serum, brain, and liver are distinct for mice with cerebral and non-cerebral malaria: A <sup>1</sup>H NMR spectroscopy-based metabonomic study. *J Proteome Res.* 2012; 11: 4992-5004.

Gimenez F, Barraud de Lagerie S, Fernandez C, Pino P, Mazier D. Tumor necrosis factor alpha 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.

Good MF, Doolan DL. Immune effector mechanisms in malaria. *Curr Opin Immunol.* 1999; 11: 412-419.

Gowda DC. TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs. *Trends Parasitol.* 2007; 23: 596-560.

Gramaglia I, Sobolewski P, Meays D, Contreras R, Nolan JP, Frangos JA, Intaglietta M, van der Heyde HC. Low nitric oxide bioavailability contributes to the genesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med* 2006; 12: 1417-1422.

Grau GE, Craig AG. Cerebral malaria pathogenesis: revisiting parasite and host contributions. *Future Microbiol.* 2012; 7: 291-302.

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, Mackenzie CD, Carr RA, Redard M, Pizzolato G, Allasia C, Cataldo C, Taylor TE, Molyneux ME. Platelet accumulation in brain microvessels in fatal pediatric cerebral malaria. *J Infect Dis.* 2003; 187: 461-466.

Grau GE, Piguet PF, Engers HD, Louis JA, Vassalli P, Lambert PH. L3T4+ T lymphocytes play a major role in the pathogenesis of murine cerebral malaria. *J Immunol* 1986; 137: 2348-2354.

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.

Greene JA, Sam-Agudu N, John CC, Opoka RO, Zimmerman PA, Kazura JW. Toll-like receptor polymorphisms and cerebral malaria: TLR2  $\Delta$ 22 polymorphism is associated with protection from cerebral malaria in a case control study. *Malar J.* 2012; 11: 47.

Griffith JW, O'Connor C, Bernard K, Town T, Goldstein DR, Bucala R. Toll-Like Receptor Modulation of Murine Cerebral Malaria Is Dependent on the Genetic Background of the Host. *J Infect Dis.* 2007; 196: 1553-1564.

Griffith JW, Sun T, McIntosh MT, Bucala R. Pure hemozoin is inflammatory *in vivo* and activates the NALP3 inflammasome via release of uric acid. *J Immunol.* 2009; 183: 5208-5220.

Han S, Inoue H, Flowers LC, Sidell N. Control of COX-2 gene expression through peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human cervical cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 4627-4635.

Hanscheid T, Egan TJ, Grobusch MP. Haemozoin: from melatonin pigment to drug target, diagnostic tool, and immune modulator. *Lancet Infect Dis.* 2007; 7: 675-685.

Hansen DS, Bernard NJ, Nie CQ, Schofield L. NK cells stimulate recruitment of CXCR3+ T cells to the brain during *Plasmodium berghei*-mediated cerebral malaria. *J Immunol.* 2007; 178: 5779-5788.

Harada K, Honmou O, Liu H, Houkin K, Kocsis JD, Bando M, Magnetic resonance lactate and lipid signals in rat brain after middle cerebral artery occlusion model. *Brain Res.* 2007; 1134: 206-213.

Helegbe GK, Huy NT, Yanagi T, Shuaibu MN, Yamazaki A, Kikuchi M, Yasunami M, Hirayama K. Rate of red blood cell destruction varies in different strains of mice infected with *Plasmodium berghei*-ANKA after chronic exposure. *Malar J.* 2009; 8: 91.

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.

Hoffmann A, Leung TH, Baltimore D. Genetic analysis of NF-kappaB/Rel transcription factors defines functional specificities. *EMBO J.* 2003; 22: 5530-5539.

Hong C, Tontonoz P. Coordination of inflammation and metabolism by PPAR and LXR nuclear receptors. *Curr Opin Genet Dev.* 2008; 18: 461-467.

Hopkins SJ, Rothwell NJ. Cytokines and the nervous system I: expression and recognition. *Trends Neurosci.* 1995; 18: 83-88.

Hsiao HY, Mak OT, Yang CS, Liu YP, Fang KM, Tzeng SF. TNF-alpha/IFN-gamma-induced iNOS expression increased by prostaglandin E2 in rat primary astrocytes via EP2-evoked cAMP/PKA and intracellular calcium signaling. *Glia.* 2007; 55: 214-223.

Hugosson E, Montgomery SM, Premji Z, Troye-Blomberg M, Björkman A. Higher IL-



10 levels are associated with less effective clearance of *Plasmodium falciparum* parasites. Parasite Immunol. 2004; 26: 111-117.

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

Idro R, Marsh K, John CC, Newton CRJ: Cerebral Malaria; Mechanisms of brain injury and strategies for improved neuro-cognitive outcome. Pediatr Res. 2010; 68: 267-274.

Idro R, Ndiritu M, Ogutu B, Mithwani S, Maitland K, Berkley J, Crawley J, Fegan G, Bauni E, Peshu N, Marsh K, Neville B, Newton C. Burden, features, and outcome of neurological involvement in acute *falciparum* malaria in Kenyan children. JAMA. 2007; 297: 2232-2240.

Ishida H, Matsuzaki-Moriya C, Imai T, Yanagisawa K, Nojima Y, Suzue K, Hirai M, Iwakura Y, Yoshimura A, Hamano S, Shimokawa C, Hisaeda H. Development of experimental cerebral malaria is independent of IL-23 and IL-17. Biochem Biophys Res Commun. 2010; 402: 790-795.

Jackson KE, Klonis N, Ferguson DJP, Adisa A, Tilley CDL. Food vacuole-associated lipid bodies and heterogeneous lipid environments in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. Mol Microbiol. 2004; 54: 109-122.

Jambou R, Combes V, Jambou MJ, Weksler BB, Couraud PO, Grau GE. *Plasmodium falciparum* adhesion on human brain microvascular endothelial cells involves transmigration-like cup formation and induces opening of intercellular junctions. PLoS Pathog. 2010; 6: e1001021.

Jaramillo M, Gowda DC, Radzioch D, Olivier M. Hemozoin increases IFN-gamma-inducible macrophage nitric oxide generation through extracellular signal-regulated kinase- and NF-kappa B-dependent pathways. J Immunol. 2003; 171: 4243-4253.

Jaramillo M, Godbout M, Olivier M. Hemozoin induces macrophage chemokine expression through oxidative stress-dependent and independent mechanisms. J Immunol. 2005; 174: 475-484.

Karin M, Cao Y, Greten FR, Li Z-W. NF-kB in cancer: from innocent bystander to major culprit. Nature Rev Cancer. 2002; 2: 301-310.

Kaul DK, Fabry ME, Costantini F, Rubin EM, Nagel RL. *In vivo* demonstration of red cell-endothelial interactions, sickling and altered microvascular response to oxygen in the sickle transgenic mouse. J Clin Invest. 1995; 96: 2845-2853.

Kaul DK, Liu XD, Nagel RL, Shear HL. Microvascular hemodynamics and *in vivo* evidence for the role of intercellular adhesion molecule-1 in the sequestration of infected red blood cells in a mouse model of lethal malaria. Am J Trop Med Hyg. 1998; 58: 240-247.

Keller CC, Hittner JB, Nti BK, Weinberg JB, Kremsner PG, Perkins DJ. Reduced peripheral PGE<sub>2</sub> biosynthesis in *Plasmodium falciparum* malaria occurs through hemozoin-induced suppression of blood mononuclear cell cyclooxygenase-2 gene expression via interleukin-10 independent mechanism. *Mol Med*. 2004; 10: 45-54.

Khare S, Luc N, Dorfleutner A, Stehlik C. Inflammasomes and Their Activation. *Crit Rev Immunol*. 2010; 30: 463-487.

Knopfová L, Smarda J. The use of Cox-2 and PPAR $\gamma$  signaling in anti-cancer therapies. *Exp Ther Med*. 2010; 1: 257-264.

Kojima S, Nagamine Y, Hayano M, Looareesuwan S, Nakanishi K. A potential role of interleukin 18 in severe *falciparum* malaria. *Acta Trop*. 2004; 89: 279-284.

Kondadasula SV, Roda JM, Parihar R, Yu J, Lehman A, Caligiuri MA, Tridandapani S, Burry RW, Carson WE. Colocalization of the IL-12 receptor and Fc $\gamma$ RIIIa to natural killer cell lipid rafts leads to activation of ERK and enhanced production of interferon-gamma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 402: 790-795.

Kordes M, Matuschewski K, Hafalla JC. Caspase-1 activation of IL-1  $\beta$  and IL18 is dispensable for the induction of experimental cerebral malaria. *Infect Immun*. 2011; 79: 3633-3641.

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, Nüssler A, Neifer S, Chaves MF, 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. *Immunology*. 1993; 78: 286–290.

Krönke M, Adam-Klages S. Role of caspases in TNF-mediated regulation of cPLA<sub>2</sub>. *FEBS Letters*. 2002; 531: 18-22.

Kumaratilake LM, Ferrante A. IL-4 inhibits macrophage mediated killing of *Plasmodium falciparum in vitro*: a possible parasite-immune evasion mechanism. *J Immunol* 1992; 149: 194-199.

Kumar KA, Rajgopal Y, Pillai U, Babu PP. Activation of nuclear transcription factor-kappa B is associated with the induction of inhibitory kappa B kinase-beta and involves differential activation of protein kinase C and protein tyrosine kinases during fatal murine cerebral malaria. *Neurosci Lett*. 2003; 340:139-142.

Kunisch E, Jansen A, Kojima F, Löffler I, Kapoor M, Kawai S, Rubio I, Crofford LJ, Kinne RW. Prostaglandin E<sub>2</sub> differentially modulates proinflammatory/prodestructive

effects of TNF-alpha on synovial fibroblasts via specific E prostanoid receptors/cAMP. *J Immunol.* 2009; 183: 1328-1336.

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

Labbe K, Miu J, Yeretssian G, Serghides L, Tam M, Finney CA, Erdman LK, Goulet ML, Kain KC, Stevenson MM, Sale M. Caspase-12 dampens the immune response to malaria independently of the inflammasome by targeting NF-kappaB signaling. *J Immunol.* 2010; 185: 5495-5502.

Lacerda-Queiroz. Avaliação da resposta inflamatória cerebral em camundongos BALB/c e C57Bl/6 infectados por *Plasmodium berghei* cepa NK65. [Dissertação de Mestrado]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. Pós-graduação em Parasitologia. Instituto de Ciências Biológicas, 2007.

Lacerda-Queiroz N, Lima OC, Carneiro CM, Vilela MC, Teixeira AL, Teixeira-Carvalho A, Araújo MS, Martins-Filho OA, Braga EM, Carvalho-Tavares J. *Plasmodium berghei* NK65 induces cerebral leukocyte recruitment *in vivo*: an intravital microscopic study. *Acta Trop.* 2011; 120:31-39.

Lacerda-Queiroz N, Rodrigues DH, Vilela MC, Miranda AS, Amaral DC, Camargos ER, Carvalho LJ, Howe CL, Teixeira MM, Teixeira AL. Inflammatory changes in the central nervous system are associated with behavioral impairment in *Plasmodium berghei* (strain ANKA)-infected mice. *Exp Parasitol.* 2010; 125: 271-278.

Lacerda MV, Mourão MP, Alexandre MA, Siqueira AM, Magalhães BM, Martinez-Espinosa FE, Filho FS, Brasil P, Ventura AM, Tada MS, Couto VS, Silva AR, Silva RS, Alecrim MG. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malar J.* 2012; 11:12.

Lackner P, Beer R, Helbok R, Broessner G, Engelhardt K, Brenneis C, Schmutzhard E, Pfaller K: Scanning electron microscopy of the neuropathology of murine cerebral malaria. *Malar J.* 2006; 5: 116.

Laroux FS, Lefer DJ, Kawachi S, Scalia R, Cockrell AS, Gray L, Van der Heyde H, Hoffman JM, Grisham MB. Role of nitric oxide in the regulation of acute and chronic inflammation. *Antioxid Redox Signal.* 2000; 2: 391-396.

Le WD, Xie WJ, Appel SH. Protective role of heme oxygenase-1 in oxidative stress-induced neuronal injury. *J Neurosci Res* 1999; 56: 652-658.

Li M, Pascual G, Glass CK. Peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ -dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Molecular and Cellular Biology.* 2000; 20: 4699-4707.

Looareesuwan S, Wilairatana P, Krishna S, Kendall B, Vannaphan S, Viravan C, White NJ. Magnetic resonance imaging of the brain in patients with cerebral

malaria. Clin Infect Dis. 1995; 21: 300-309.

Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. Circ Res. 2001; 88: 756-762.

Lou J, Lucas R, Grau GE: Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. Clin Microbiol Ver. 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.

Luty AJ, Perkins DJ, Lell B, Schmidt-Ott R, Lehman LG, Luckner D, Greve B, Matousek P, Herbich K, Schmid D, Weinberg JB, Kremsner PG. Low interleukin-12 activity in severe *Plasmodium falciparum* malaria. Infect Immun. 2000; 68: 3909-3915.

Mabb AM, Miyamoto S. SUMO and NF-kappaB ties. Cell Mol Life Sci. 2007; 64: 1979-1996.

Macmicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol. 1997; 15: 323-350.

Magalhães K, Almeida PE, Atella G, Maya-Monteiro CM, Castro-Faria-Neto H, Pelajo-Machado M, Lenzi HL, Bozza MT, Bozza PT. Schistosomal-derived lysophosphatidyl cholines are involved in eosinophil activation and recruitment through Toll-like recepto-2-dependent mechanisms. J Infect Dis. 2010; 202: 1369-1379.

Malaguarnera L, Pignatelli S, Musumeci M, Simporè J, Musumeci S. Plasma levels of interleukin-18 and interleukin-12 in *Plasmodium falciparum* malaria. Parasite Immunol. 2002; 24: 489-492.

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

Marsh K. Malaria - a neglected disease? Parasitology. 1992; 104: S53-69.

Martiney JA, Sherry B, Metz CN, Espinoza M, Ferrer AS, Calandra T, Broxmeyer HE, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor release by macrophages after ingestion of *Plasmodium chabaudi* infected erythrocytes: Possible role in the pathogenesis of malarial anemia. Infect Immun. 2000; 68: 2259-2267.

Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. Cell Death Differ. 2007; 14: 10-22.

May J, Lell B, Luty AJ, Meyer CG, Kremsner PG. Plasma interleukin-10: Tumor

necrosis factor (TNF)-alpha ratio is associated with TNF promoter variants and predicts malarial complications. *J Infect Dis.* 2000; 182: 1570-1573.

Maya-Monteiro CM, Almeida PE, D'Avila H, Martins AS, Rezende AP, Castro-Faria-Neto H, Bozza PT. Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2008; 283: 2203-2210.

McQuillan JA, Mitchell AJ, Ho YF, Combes V, Ball HJ, Golenser J, Grau GE, Hunt NH. Coincident parasite and CD8<sup>+</sup> T cell sequestration is required for development of experimental cerebral malaria. *Int J Parasitol.* 2011; 41: 155-163.

Medana I, Chan-Ling T, Hunt N. Redistribution and degeneration of retinal astrocytes in experimental murine cerebral malaria: relationship to disruption of the blood-retinal barrier. *Glia.* 1996; 16: 51-64.

Medana IM, Hunt NH, Chaudhri G. Tumor necrosis factor alpha expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and astrocytes. *Am J Pathol.* 1997; 150: 1473-1486.

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.

Melo CRN, D'Avila H, Fabrino DL, Almeida PE, Bozza PT. Macrophage lipid body induction by Chagas disease *in vivo*: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue Cell.* 2003; 35: 59-67.

Melo RC, Dvorak AM. Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: host defense or pathogen survival strategy? *PLoS Pathog.* 2012; 8: e1002729.

Mendes M, La Pointe MC. PPAR $\gamma$  inhibition of cyclooxygenase-2, PGE<sub>2</sub> synthase, and inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *Hypertension.* 2003; 42: 844-850.

Mendis KN, Carter R. Clinical disease and pathogenesis in malaria. *Parasitol Today.* 1995; 11: PTI 2-16.

Menezes RG, Pant S, Kharoshah MA, Senthilkumaran S, Arun M, Nagesh KR, Bhat NB, Mahadeshwara Prasad DR, Karki RK, Subba SH, Fazil A. Autopsy discoveries of death from malaria. *Leg Med (Tokyo).* 2012; 14: 111-115.

Metenou S, Dembele B, Konate S, Dolo H, Coulibaly YI, Diallo AA, Soumaoro L, Coulibaly ME, Coulibaly SY, Sanogo D, Doumbia SS, Traore SF, Mahanty S, Klion A, Nutman TB. Filariasis Infection Suppresses Malaria-Specific Multifunctional Th1 and Th17 Responses in Malaria and Filariasis Coinfections. *J Immunol.* 2011; 186: 4725-4733.

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

Milner Jr DA. Rethinking cerebral malaria pathology. *Curr Opin Infect Dis*. 2010; 23: 456-463.

Mimche PN, Taramelli D, Vivas L. The plant-based immunomodulator curcumin as a potential candidate for the development of an adjunctive therapy for cerebral malaria. *Malar J*. 2011; 10: S10.

Mishra SK, Das BS. Malaria and Acute Kidney Injury. *Semin Nephrol*. 2008; 28: 395-408.

Mishra SK, Mohanty S, Satpathy SK, Mohapatra DN. Cerebral malaria in adults a description of 526 cases admitted to Ispat General Hospital in Rourkela, India. *Ann Trop Med Parasitol*. 2007; 101: 187-193.

Mishra SK, Newton CRJC. Diagnosis and management of the neurological complications of falciparum malaria. *Nat Rev Neurol*. 2009; 5: 189-198.

Mitchell AJ, Hansen AM, Hee L, Ball HJ, Potter SM, Walker JC, Hunt NH. Early cytokine production is associated with protection from murine cerebral malaria. *Infect Immun*. 2005; 73: 5645-5653.

Miu J, Mitchell AJ, Muller M, Carter SL, Manders PM, McQuillan JA, Saunders BM, Ball HJ, Lu B, Campbell IL, Hunt NH. Chemokine gene expression during fatal murine cerebral malaria and protection due to CXCR3 deficiency. *J Immunol* 2008; 180(2): 1217–1230.

Mohan A, Sharmab SK, Bollinenic S. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in malaria. *J Vector Borne Dis*. 2008; 45: 179-193.

Mohan K, Stevenson MM. Dyserythropoiesis and severe anaemia associated with malaria correlate with deficient interleukin-12 production. *Br J Haematol*. 1999; 103: 942-949.

Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Res*. 2011; 21: 103-115.

Mouse Genome Informatics. Disponível em [<http://www.informatics.jax.org/external/festing/mouse/STRAINS.shtml>]. Acessado em 15 de agosto de 2013.

Moussaud S, Draheim HJ. A new method to isolate microglia from adult mice and culture them for an extended period of time. *J Neurosci Methods*. 2010; 187: 243-253.

Muniz-Junqueira MI, dos Santos-Neto LL, Tosta CE. Influence of tumor necrosis

factor-alpha on the ability of monocytes and lymphocytes to destroy intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* *in vitro*. Cell Immunol. 2001; 208: 73-79.

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

Muniz-Junqueira MI, Tosta CE. Stepwise observations of *in vitro* phagocytosis of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes by human monocytes. Rev Soc Brasil Med Trop. 2009; 42: 1-4.

Muniz-Junqueira MI, Tosta CE. The pathological bases of immunomodulatory therapy in malaria. Antibiotiques. 2007; 9: 164-172.

Muniz-Junqueira MI. Immunomodulatory therapy associated to anti-parasite drugs as a way to prevent severe forms of malaria. Cur Clin Pharmacol. 2007; 2: 59-73.

Muniz-Junqueira MI. Imunomodulação como terapêutica complementar na malária grave. Rev Soc Bras Med Trop. 2002; 35: 14-15.

Nacer A, Movila A, Baer K, Mikolajczak SA, Kappe SH, Frevet U. Neuroimmunological blood brain barrier opening in experimental cerebral malaria. PLoS Pathog. 2012; 8: e1002982.

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

Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J. 1992; 6: 3051-3064.

Nawabi P, Lykidis A, Ji D, Haldar K. Neutral lipid analysis reveals elevation of acylglycerols and lack of cholesterol esters in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. Eukaryot Cell. 2003; 2: 1128-1131.

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

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

Neurogenetics at UT Health Science Center. Disponível em [<http://www.nervenet.org/papers/cerebellum2000.html>] Acessado em 23 de maio de 2012.

Netea MG, Simon A, van de Veerdonk F, Kullberg BJ, Van der Meer JW, Joosten LA. IL-1beta processing in host defense: beyond the inflammasomes. PLoS Pathog. 2010; 26; 6: e1000661.

Noone C, Parkinson M, Dowling DJ, Aldridge A, Kirwan P, Molloy SF, Asaolu SO, Holland C, O'Neill SM. Plasma cytokines, chemokines and cellular immune responses in pre-school Nigerian children infected with *Plasmodium falciparum*. Malar J. 2013; 7: 12-15.

Oakley MS, Anantharaman V, Venancio TM, Zheng H, Mahajan B, Majam V, McCutchan TF, Myers TG, Aravind L, Kumar S. Molecular correlates of experimental cerebral malaria detectable in whole blood. Infect Immun 2011; 79(11): 1244-1253.

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

O'Dea E, Hoffmann A. The regulatory logic of the NF-kappaB signaling system. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010; 2: a000216.

Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF-κB signaling pathways. Nat Immunol. 2011; 12: 695-708.

Oh SJ, Chung DH. Invariant NKT cells producing IL-4 or IL-10, but not IFN-gamma, inhibit the Th1 response in experimental autoimmune encephalomyelitis, whereas none of these cells inhibits the Th17 response. J Immunol. 2011; 186: 6815-6821.

Okamoto K, Iwai Y, Oh-Hora M, Yamamoto M, Morio T, Aoki K, Ohya K, Jetten Akira S, Muta T, Takayanagi H AM, . IkappaBzeta regulates T(H)17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. Nature. 2010; 464: 1381-1385.

OMS – Organização Mundial da Saúde. World Health Organization Division of Control of Tropical Disease. Severe *P. falciparum* malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000; 94: 1-90.

OMS - Organização Mundial da Saúde. World Malaria Report. 2012.

Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. Immunity. 2008; 28: 454-467.

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

Palacpac NM, Hiramane Y, Mi-ichi F, Torii M, Kita K, Hiramatsu R, Horii T, Mitamura T. Developmental-stage-specific triacylglycerol biosynthesis, degradation and trafficking as lipid bodies in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. J Cell Sci. 2004; 117:1469-1480.

Pamplona A, Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Epiphany S, Chora A, Rodrigues CD, Gregoire IP, Cunha-Rodrigues M, Portugal S, Soares MP, Mota MM. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. Nat Med. 2007; 13: 703-710.



Park SY, Bae JU, Hong KW, Kim CD: HO-1 Induced by Cilostazol Protects Against TNF- $\alpha$ -associated Cytotoxicity via a PPAR- $\gamma$ -dependent Pathway in Human Endothelial Cells. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2013; 15: 83-88.

Patankar TF, Karnad DR, Shetty PG, Desai AP, Prasad SR. Adult cerebral malaria: prognostic importance of imaging findings and correlation with postmortem findings. *Radiology.* 2002; 224: 811-816.

Patnaik JK, Das BS, Mishra SK, Mohanty S, Satpathy SK, Mohanty D. Vascular clogging, mononuclear cell margination, and enhanced vascular permeability in the pathogenesis of human cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; 51: 642-647.

Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF- $\kappa$ B and IKK function. *Mol Cell Bio.* 2007; 8: 49-62.

Pick E, Keisari Y: A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Meth.* 1980; 38: 161-170.

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 Parasitol.* 2003, 104: 81-85.

Pineda JA, Aono M, Sheng H, Lynch J, Wellons JC, Laskowitz DT, Pearlstein RD, Bowler R, Crapo J, Warner DS. Extracellular superoxide dismutase overexpression improves behavioral outcome from closed head injury in the mouse. *J Neurotrauma.* 2001; 18: 625-634.

Pinheiro RO, Nunes MP, Pinheiro CS, D'Avila H, Bozza PT, Takiya CM, Côrte-Real S, Freire-de-Lima CG, DosReis GA. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. *Microbes Infect.* 2009; 11: 181-190.

Pongponratn E, Turner GD, Day NP, Phu NH, Simpson JA, Stepniewska K, Mai NT, Viriyavejakul P, Looareesuwan S, Hien TT, Ferguson DJ, White NJ. An ultrastructural study of the brain in fatal *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 69: 345-359.

Ponsford MJ, Medana IM, Prapansilp P, Hien TT, Lee SJ, Dondorp AM, Esiri ME, Day NPJ, White NJ, Turner GDH: Sequestration and microvascular congestion are associated with coma in human cerebral Malaria. *J Infect Dis.* 2012; 205: 663-671.

Potchen MJ, Birbeck GL, Demarco JK, Kampondeni SD, Beare N, Molyneux ME, Taylor TE. Neuroimaging findings in children with retinopathy-confirmed cerebral malaria. *Eur J Radiol.* 2010; 74: 262-268.

Potter S, Chan-Ling T, Ball HJ, Mansour H, Mitchell A, Maluish L, Hunt NH. Perforin mediated apoptosis of cerebral microvascular endothelial cells during experimental cerebral malaria. *Int J Parasitol.* 2006; 36: 485-496.

Pulido-Méndez M, Finol HJ, Girón ME, Aguilar I. Ultrastructural pathological changes in mice kidney caused by *Plasmodium berghei* infection. J Submicrosc Cytol Pathol. 2006; 38: 143-148.

Punsawad C, Maneerat Y, Chaisri U, Nantavisai K, Viriyavejakul P. Nuclear factor kappa B modulates apoptosis in the brain endothelial cells and intravascular leukocytes of fatal cerebral malaria. Malar J. 2013; 12: 260.

Ramasamy R. Molecular basis for evasion of host immunity and pathogenesis in malaria. Biochim Biophys Acta. 1998; 1406: 10-27.

Randall LM, Amante FH, McSweeney KA, Zhou Y, Stanley AC, Haque A, Jones MK, Hill GR, Boyle GM, Engwerda CR. Common strategies and modulate experimental cerebral malaria in mouse strains with different susceptibilities. Infect. Immun. 2008; 76: 3312-3320.

Randall LM, Engwerda CR. TNF Family Members and Malaria: Old Observations, New Insights and Future Directions. Exp Parasitol. 2010; 126: 326-331.

Ranjan R, Chugh M, Kumar S, Singh S, Kanodia S, Hossain MJ, Korde R, Grover A, Dhawan S, Chauhan VS, Reddy VS, Mohammed A, Malhotra P. Proteome analysis reveals a large merozoite surface protein-1 associated complex on the *Plasmodium falciparum* merozoite surface. J Proteome Res. 2011; 10: 680-691.

Rasti N, Wahlgren M, Chen Q. Molecular aspects of malaria pathogenesis. FEMS Immunol Med Microbiol. 2004; 41: 9-26.

Reimer T, Shaw MH, Franchi L, Coban C, Ishii KJ, Akira S, Horii T, Rodriguez A, Núñez G. Experimental cerebral malaria progresses independently of the Nlrp3 inflammasome. Eur J Immunol. 2010; 40: 764-769.

Reis PA, Comim CM, Hermani F, Silva B, Barichello T, Portella AC, Gomes FC, Sab IM, Frutuoso VS, Oliveira MF, Bozza PT, Bozza FA, Dal-Pizzol F, Zimmerman GA, Quevedo J, Castro-Faria-Neto HC. Cognitive dysfunction is sustained after rescue therapy in experimental cerebral malaria, and is reduced by additive antioxidant therapy. PLoS Pathog. 2010; 6: e1000963.

Rénia L, Wu Howland S, Claser C, Charlotte Gruner A, Suwanarusk R, Hui Teo T, Russell B, Ng LF. Cerebral malaria: mysteries at the blood-brain barrier. Virulence. 2012; 3: 193-201.

Ringwald P, Peyron F, Vuillez JP, Touze JE, Le Bras J, Deloron P. Levels of cytokines in plasma during *Plasmodium falciparum* malaria attacks. J Clin Microbiol. 1991; 29: 2076-2078.

Rockett KA, Targett GA, Playfair JH. Killing of blood-stage *Plasmodium falciparum* by lipid peroxides from tumor necrosis serum. Infect Immun. 1988; 56: 3180-3183.

Rockett KA, Awburn MM, Rockett EJ, Clark IA. Tumor necrosis factor and interleukin-1 synergy in the context of malaria pathology. *Am J Trop Med Hyg*. 1994; 50: 735-742.

Rodríguez-Acosta A, Finol HJ, Pulido-Méndez M, Márquez A, Andrade G, González N, Aguilar I, Girón ME, Pinto A. Liver ultrastructural pathology in mice infected with *Plasmodium berghei*. *J Submicroscop Cytol Pathol*. 1998; 30: 299-307.

Romero JF, Ibrahim GH, Renggli J, Himmelrich H, Graber P, Corradin G. IL-12p40-independent induction of protective immunity upon multiple *Plasmodium berghei* irradiated sporozoite immunizations. *Parasite Immunol*. 2007; 29: 541-548.

Rudin W, Favre N, Bordmann G, Ryffel B. Interferon- $\gamma$  is essential for the development of cerebral malaria. *Eur J Immunol*. 1997; 24: 810-815.

Saefel M, Krueger A, Arriens S, Heussler V, Racz P, Fleischer B, Brombacher F, Hoerauf A. Mice deficient in interleukin-4 (IL-4) or IL-4 receptor alpha have higher resistance to sporozoite infection with *Plasmodium berghei* (ANKA) than do naive wild-type mice. *Infect Immun*. 2004; 72: 322-331.

Sanni LA, Fu S, Dean RT, Bloomfield G, Stocker R, Chaudhri G, Dinauer MC, Hunt NH. Are reactive oxygen species involved in the pathogenesis of murine cerebral malaria? *J Infect. Dis*. 1999; 179: 217-222.

Santos-Ciminera PD, Roberts DR, Alecrim Md, Costa MR, Quinnan GV Jr. Malaria diagnosis and hospitalization trends, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2007; 13: 1597-1600.

Sarfo BY, Wilson NO, Bond VC, Stiles JK. *Plasmodium berghei* ANKA infection increases Foxp3, IL-10 and IL-2 in CXCL-10 deficient C57BL/6 mice. *Malar J*. 2011; 10: 69.

Sarkar PK, Ahluwalia G, Vijayan VK, Talwar A. Critical care aspects of malaria. *J Intensive Care Med* 2010; 25: 93-103.

Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5: 722-735.

Schmutzhard J, Kositz CH, Lackner P, Dietmann A, Fischer M, Glueckert R, Reindl M, Stephan K, Riechelmann H, Schrott-Fischer A, Schmutzhard E. Murine malaria is associated with significant hearing impairment. *Malar J*. 2010; 11; 9:159.

Schumacher RF, Spinelli E. Malaria in children. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2012; 4: e2012073.

Segovia J, Sabbah A, Mgbemena V, Tsai SY, Chang TH, Berton MT, Morris IR, Allen IC, Ting JP, Bose S. TLR2/MyD88/NF- $\kappa$ B pathway, reactive oxygen species, potassium efflux activates NLRP3/ASC inflammasome during respiratory syncytial virus infection. *PLoS One*. 2012; 7: e29695.

Seixas E, Gozzelino R, Chora A, Ferreira A, Silva G, Larsen R, Rebelo S, Penido C, Smith NR, Coutinho A, Soares M: Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009, 106: 15837-15842.

Serghides L, Patel SN, Ayi K, Lu Z, Gowda DC, Liles WC, Kain KC. Rosiglitazone modulates the innate immune response to *Plasmodium falciparum* infection and improves outcome in experimental cerebral malaria. *J Infect Dis*. 2009; 199: 1536-1545.

Serghides L. The Case for the Use of PPAR $\gamma$  Agonists as an Adjunctive Therapy for Cerebral Malaria. *PPAR Res*. 2012; 2012: 513865.

Shehata MF. Rel/Nuclear factor-kappa B apoptosis pathways in human cervical cancer cells. *Cancer Cell Internat*. 2005; 5: 1-13.

Shih VF, Tsui R, Caldwell A, Hoffmann A. A single NF $\kappa$ B system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Res*. 2011; 21: 86-102.

Shio MT, Eisenbarth SC, Savaria M, Vinet AF, Bellemare MJ, Harder KW, Sutterwala FS, Bohle DS, Descoteaux A, Flavell RA, Olivier M. Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases. *PLoS Pathog*. 2009; 5: e1000559.

Siggers T, Chang AB, Teixeira A, Wong D, Williams KJ, Ahmed B, Ragoussis J, Udalova IA, Smale ST, Bulyk ML. Principles of dimer-specific gene regulation revealed by a comprehensive characterization of NF- $\kappa$ B family DNA binding. *Nat Immunol*. 2011; 13: 95-102.

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, F.O. Efeito do tratamento de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA com talidomida sobre a função fagocitária de macrófagos peritoneais, *in vitro* [Dissertação de Mestrado]. Brasília: Universidade de Brasília. Pós-Graduação em Patologia Molecular. Faculdade de Medicina, 2002.

Silvie O, Rubinstein E, Franetich JF, Prenant M, Belhoue 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: 93-96.

Skeldon A, Saleh M. The inflammasomes: molecular effectors of host resistance against bacterial, viral, parasitic, and fungal infections. *Frontiers in Microbiology*. 2011; 2: 1-15.

SIM/SVS/MS. Disponível em: [<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sih/cnv/niuf.def>]. Acessado em 01 de outubro de 2013.

Smith T, Schellenberg JA, Hayes R. Attributable fraction estimates and case definitions for malaria in endemic areas. *Stat Med.* 1994; 13: 2345-2358.

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

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

Soni S, Dhawan S, Rosen KM, Chafel M, CHishti AH, Hanspal M. Characterization of events preceding the release of parasite from the host red blood cells. *Blood Cells Mol Dis.* 2005; 35: 201-211.

Stevenson MM, Huang DY, Podoba JE, Nowotarski ME. Macrophage Activation during *Plasmodium chabaudi* AS Infection in Resistant C57BL/6 susceptible A/J mice. *Infec Immun.* 1992; 60: 1193-1201.

Stevenson MM, Su Z, Sam H, Mohan K. Modulation of host responses to blood-stage malaria by interleukin-12: from therapy to adjuvant activity. *Microbes Infect.* 2001; 3: 49-59.

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

Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta Bioenergetics.* 1999; 1411: 217-230.

Suidan GL, Mcdole JR, Chen Y, Pirko I, Johnson AJ. Induction of blood brain barrier tight junction protein alterations by CD8 T cells. *PLoS One.* 2008; 3: e3037.

Szanto A, Nagy L. The many faces of PPAR gamma: anti-inflammatory by any means? *Immunobiology.* 2008; 213: 789-780.

Tachado SD, Gerold P, McConville MJ, Baldwin T, Quilici D, Schwarz RT, Shofield L. Glicosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein kinase C-dependent signaling pathway. *J Immunol.* 1996; 156: 1897-1907.

Tan RS, Kara AU, Feng C, Asano Y, Sinniah R. Differential interleukin-10 expression in interferon regulatory factor-1 deficient mice during *Plasmodium berghei* blood-stage infection. *Parasite Immunol.* 2000; 22: 425-435.

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.

Togbe D, de Sousa PL, Fauconnier M, Boissay V, Fick L, Scheu S, Pfeffer K, Menard R, Grau GE, Doan BT, Beloeil JC, Renia L, Hansen AM, Ball HJ, Hunt NH, Ryffel B, Quesniaux VF. Both functional LTbeta receptor and TNF receptor 2 are required for the development of experimental cerebral malaria. *PLoS One*. 2008; 3: e2608.

Tosta CE, Muniz-Junqueira MI, Sala-Neto F. Imunologia das relações do plasmódio com o hospedeiro humano. José Rodrigues Coura (editor). *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Primeira edição. Rio de Janeiro. Editora Guanabara-Koogan, 2005, volume 1, p. 865-874.

Totzke G, Essmann F, Pohlmann S, Lindenblatt C, Jänicke RU, Schulze-Osthoff K. novel member of the I $\kappa$ B family, human I $\kappa$ B-zeta, inhibits transactivation of p65 and its DNA binding *J Biol Chem*. 2006; 281: 12645-12654.

Trampuz A, Jereb M, Muzlovic I, Prabhu RM. Clinical review: Severe malaria. *Critical Care*. 2003; 7: 315-323.

Tripathi AK, Sha W, Shulaev V, Stins MF, Sullivan Jr DJ. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes induce NF- $\kappa$ B regulated inflammatory pathways in human cerebral endothelium. *Blood*. 2009; 114: 4243-4252.

Tripathi AK, Sullivan DJ, Stins MF. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes increase intercellular adhesion molecule 1 expression on brain endothelium through NF- $\kappa$ B. *Infect Immun*. 2006; 74: 3262-3270.

Tripathi AK, Sullivan DJ, Stins MF. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes decrease the integrity of human blood-brain barrier endothelial cell monolayers. *J Infect Dis*. 2007; 195: 942-950.

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.

UNESCO. Declaração Universal dos Direitos dos Animais. Proclamada em sessão realizada em Bruxelas em 27 de maio de 1978. Disponível em [<http://www.propq.ufscar.br/comissoes-de-etica/comissao-de-etica-na-animal/direitos>].

van de Veerdonk FL, Netea MG, Dinarello CA, Joosten AB. Inflammasome activation and IL-1 $\beta$  and IL-18 processing during infection. *Trends in Immunology*. 2011; 32: 110-116.

van den Steen PE, Deroost K, Van Aelst I, Geurts N, Martens E, Struyf S, Nie CQ, Hansen DS, Matthys P, Van Damme J, Opdenakker G. CXCR3 determines strain susceptibility to murine cerebral malaria by mediating T lymphocyte migration toward IFN-gamma-induced chemokines. *Eur J Immunol.* 2008; 38: 1082-1095.

van der Heyde HC, Bauer P, Sun G, Chang WL, Yin L, Fuseler J, Granger DN. Assessing vascular permeability during experimental cerebral malaria by a radiolabeled monoclonal antibody technique. *Infect Immun.* 2001; 69: 3460-3465.

van der Veen RC. Nitric oxide and T helper cell immunity. *Int Immunopharmacol.* 2001; 1: 1491-1500.

van Meir EG. Cytokines and tumors of the central nervous system. *Glia.* 1995; 15: 264-288.

Varfolomeev E, Vucic D. (Un)expected roles of c-IAPs in apoptotic and NFkB signaling pathways. *Cell Cycle.* 2008; 7: 1511-1521.

Vasconcelos HAR. Influência da talidomida sobre a produção de Óxido nítrico e peróxido de hidrogênio nos modelos CBA e C57BL/6 susceptíveis e o modelo BALB/c não susceptível à malária cerebral experimental murina [Dissertação de mestrado]. Brasília: Universidade de Brasília. Pós-graduação em Medicina Tropical. Faculdade de Medicina, 2010.

Vial HJ, Ancelin ML. Malarial lipids. An overview. *Subcell Biochem.* 1992; 18: 259-306.

Vial HJ, Eldi, P, Tielens AG, van Hellemond JJ. Phospholipids in parasitic protozoa. *Mol Biochem Parasitol.* 2003; 126: 143-154.

Villegas-Mendez A, Greig R, Shaw TN, de Souza JB, Gwyer Findlay E, Stumhofer JS, Hafalla JC, Blount DG, Hunter CA, Riley EM, Couper KN. IFN- $\gamma$ -producing CD4+ T cells promote experimental cerebral malaria by modulating CD8+ T cell accumulation within the brain. *J Immunol.* 2012; 189: 968-979.

von der Weid T, Kopf M, Köhler G, Langhorne J. The immune response to *Plasmodium chabaudi* malaria in interleukin-4-deficient mice. *Eur J Immunol.* 1994; 24: 2285-2293.

von Zur Muhlen C, Sibson NR, Peter K, Campbell SJ, Wilainam P, Grau GE, Bode C, Choudhury RP, Anthony DC. A contrast agent recognizing activated platelets reveals murine cerebral malaria pathology undetectable by conventional MRI. *J Clin Invest.* 2008; 118: 1198-1207.

Wajant H, Scheurich P. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. *Internat J Biochem Cell Biol.* 2001; 33: 19-32.

Waki S, Uehara S, Kanbe K, Ono K, Suzuki M, Nariuchi H. The role of T cells in pathogenesis and protective immunity to murine malaria. *Immunology*. 1992; 75: 646-651.

Walle LV, Lamkanfi M. Inflammasomes: caspase-1-activating platforms with critical roles in host defense. *Frontiers in Microbiology*. 2011; 2: 1-6.

Wan HC, Melo RCN, Jin Z, Dvorak AM, Weller PF. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *FASEB J*. 2007; 21: 167-178.

Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem*. 1995; 270: 9558-9563.

Wang YX. PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases. *Cell Res*. 2010; 20: 124-137.

Wasay M, Taqi A, Aziz H, Azam I, Beg MA. Neurological involvement in patients with *falciparum* malaria; frequency and prognostic value. *Clin Neurol Neurosurg*. 2011; 113: 104-106.

Wassmer SC, Moxon CA, Taylor T, Grau GE, Molyneux ME, Craig AG. Vascular endothelial cells cultured from patients with cerebral or uncomplicated malaria exhibit differential reactivity to TNF. *Cell Microbiol*. 2011; 13: 198-209.

Weatherall DJ, Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK, Casals-Pascual C, Roberts DJ. Malaria and the red cell. *Hematology*. 2002; 1: 35-57.

Weaver CT, Murphy KM. The central role of the Th17 lineage in regulating the inflammatory/autoimmune axis. *Semin Immunol*. 2007; 19: 351-352.

Welch JS, Ricote M, Akiyama TE, Gonzalez FJ, Glass CK. PPAR{gamma} and PPAR{delta} negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFN- $\gamma$  target genes in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 6712-6717.

White NJ, Turner GD, Medana IM, Dondorp AM, Day NP. The murine cerebral malaria phenomenon. *Trends Parasitol*. 2010; 26: 11-15.

Wickramasinghe SN, Abdalla SH. Blood and bone marrow changes in malaria. *Baillieres Best Prat Res Clin Haematol*. 2000; 13: 277-299.

Wirth CC, Pradel G. Molecular mechanisms of host cell egress by malaria parasites. *Int J Med Microbiol*. 2012; 302: 172-178.

Xiao L, Patterson PS, Yang C, Lal AA. Role of eicosanoids in the pathogenesis of



murine cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 60: 668-673.

Xu X, Sumita K, Feng C, Xiong X, Shen H, Maruyama S, Kanoh M, Asano Y. Down-regulation of IL-12 p40 gene in *Plasmodium berghei*-infected mice. *J Immunol.* 2001; 167: 235-241.

Ye J. Regulation of PPAR gamma function by TNF-alpha. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 374: 405-408.

Zanini GM, Cabrales P, Barkho W, Frangos JA, Carvalho LJ. Exogenous nitric oxide decreases brain vascular inflammation, leakage and venular resistance during *Plasmodium berghei* ANKA infection in mice. *J Neuroinflammation.* 2011; 8: 66.

Zhang G, Manaca MN, McNamara-Smith M, Mayor A, Nhabomba A, Berthoud TK, Khoo SK, Wiertsema S, Aguilar R, Barbosa A, Quintó L, Candelaria P, Schultz EN, Hayden CM, Goldblatt J, Guinovart C, Alonso PL, Lesouëf PN, Dobaño C. Interleukin-10 (IL-10) polymorphisms are associated with IL-10 production and clinical malaria in young children. *Infect Immun.* 2012; 80: 2316-2322.

Zhu J, Krishnegowd G, Gowda C. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: the requirement of extracellular signal-regulated kinase, p38, c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB pathways for the expression of proinflammatory cytokines and nitric oxide. *J Biol Chem.* 2005; 280: 8617-8627.

Zhu J, Yamane H, Cote-Sierra J, Guo L & Paul WE. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res.* 2006; 16: 3-10.

Zhu J, Krishnegowda G, Li G, Gowda DC. Proinflammatory responses by glycosylphosphatidylinositols (GPIs) of *Plasmodium falciparum* are mainly mediated through the recognition of TLR2/TLR1. *Exp Parasitol.* 2011; 128: 205-211.

## **APÊNDICE DE TABELAS**

**Tabela A-01**

Parasitemia (%) de camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados com 10<sup>6</sup> eritrócitos parasitados com *P. berghei* ANKA no terceiro, quinto e oitavo dia após infecção.

GRUPOS	Parasitemia (%)					
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP	
BALB/c	21	3º dia	0,1	0,0 – 0,4	0,0 – 0,8	0,2 ± 0,1
		5º dia	2,4	0,4 – 8,2	0,0 – 10,6	4,2 ± 4,1
		8º dia	15,7	8,6 – 22,7	6,4 – 32,3	16,4 ± 8,2
CBA	24	3º dia	1,0	0,0 – 1,6	0,0 – 3,0	1,1 ± 0,9
		5º dia	5,0	2,0 – 6,1	0,8 – 8,0	4,3 ± 2,3
		8º dia	12,0	9,5 – 15,7	5,0 – 23,7	12,4 ± 4,5
C57BL/6	13	3º dia	2,6	1,0 – 3,0	0,8 – 4,4	2,3 ± 1,3
		5º dia	16,6	13,5 – 18,0	10,0 – 20,4	15,8 ± 3,2
		8º dia	26,5	16,5 – 31,5	8,8 – 35,8	24,9 ± 8,8

Análise em lâmina por microscopia óptica. 3º dia: p=0,005 (Kruskal-Wallis, segundo método de Dunn: iBAL<iCBA e iBAL<iC57). 5º e 8º dia: p<0,0001 (ANOVA, segundo o método comparativo de Student-Newman-Keuls: iC57>iBAL~iCBA).

**Tabela A-02**

Influência da infecção malárica sobre a produção basal de óxido nítrico, *in vitro*, no sexto dia de infecção, pelos macrófagos peritoneais de camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	Óxido Nítrico (NO <sub>2</sub> µM) – Basal				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	8	6,0	5,1 – 9,8	3,2 – 10,2	6,8 ± 0,9
iBAL	10	8,0	6,0 – 11,5	4,4 – 12,1	8,3 ± 0,9
CBA	9	5,8	5,4 – 9,9	4,9 – 12,5	7,4 ± 0,9
iCBA	8	6,3	5,1 – 7,1	4,9 – 9,1	6,4 ± 0,5
C57	7	10,1	5,7 – 20,3	4,9 – 22,0	12,6 ± 2,7
iC57	9	4,9	4,3 – 6,1	4,4 – 6,5	5,2 ± 0,3

Método de Griess. Infectados: p=0,008 (ANOVA). Segundo o método comparativo de Student-Newman-Keuls: iBAL>iC57. iBAL>iC57: p=0,008 e C57>iC57: p=0,033 (Teste *t* com correção pelo método de Welch).

**Tabela A-03**

Influência da infecção malárica sobre a produção basal de peróxido de hidrogênio, *in vitro*, no sexto dia de infecção, pelos macrófagos peritoneais de camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	Peróxido de hidrogênio ( $\mu\text{M}/1,5 \times 10^5 \text{ MØ/h}$ ) - Basal				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média $\pm$ DP
BAL	7	5,8	5,3 – 13,0	0,4 – 18,9	8,1 $\pm$ 2,3
iBAL	9	11,3	4,9 – 20,3	2,3 – 26,2	12,2 $\pm$ 2,8
CBA	8	8,4	7,1 – 18,7	6,8 – 20,5	11,9 $\pm$ 2,1
iCBA	8	12,3	9,4 – 14,5	7,4 – 19,9	12,6 $\pm$ 1,4
C57	9	5,4	3,3 – 6,3	0,6 – 7,6	4,7 $\pm$ 0,71
iC57	10	7,6	6,7 – 8,6	4,3 – 11,1	7,6 $\pm$ 0,6

Microtécnica de Pick e Keisari. Não infectados:  $p=0,008$  (Kruskal-Wallis), Segundo o teste comparativo de Dunn: CBA>C57. iCBA>iC57:  $p=0,008$  (Teste *t* com correção de Welch). CBA>C57:  $p=0,004$  e C57<iC57:  $p=0,004$  (Teste *t*).

**Tabela A-04**

Índice corpuscular do sexto dia de infecção dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	Índice Corpuscular				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média $\pm$ DP
BAL	9	10,1	2,0 – 16,9	1,0 – 18,6	9,3 $\pm$ 2,4
iBAL	9	102,4	25,4 – 252,3	11,6 – 345,8	131,0 $\pm$ 42,0
CBA	9	5,0	2,7 – 19,7	1,0 – 25,1	10,5 $\pm$ 3,5
iCBA	9	90,8	37,4 – 269,1	8,0 – 323,3	143,8 $\pm$ 40,3
C57	9	5,4	1,3 – 9,5	0,5 – 11,8	5,3 $\pm$ 1,4
iC57	9	163,8	83,8 – 226,1	14,4 – 275,5	149,0 $\pm$ 28,8

Técnica de coloração com Oil Red. BAL<iBAL:  $p=0,02$ , CBA<iCBA:  $p=0,011$ , C57<iC57:  $p=0,001$  (Teste *t* com correção de Welch).

**Tabela A-05**

Quantidade média de corpúsculos lipídicos presentes no citoplasma dos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA no sexto dia de infecção malárica.

GRUPOS	Média de Corpúsculos Lipídicos				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	9	1,5	0,8 – 1,9	0,3 – 2,4	1,4 ± 0,2
iBAL	9	2,7	1,8 – 4,5	1,3 – 7,7	3,4 ± 0,7
CBA	9	1,3	0,4 – 2,0	0,0 – 3,1	1,4 ± 0,3
iCBA	9	3,7	2,6 – 4,7	2,1 – 5,2	3,7 ± 0,2
C57	9	1,5	0,8 – 1,7	0,7 – 2,4	1,3 ± 0,2
iC57	9	4,5	2,9 – 7,8	1,8 – 10,7	5,3 ± 1,0

Técnica de coloração com Oil Red. BAL<iBAL: p=0,017 e C57<iC57: p=0,005 (Teste *t* com correção de Welch). CBA<iCBA: p=0,0002 (Teste *t*).

**Tabela A-06**

Quantidade de macrófagos com corpúsculos lipídicos no citoplasma dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA no sexto dia de infecção malárica.

GRUPOS	Macrófagos (%)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	9	4,3	1,6 – 9,0	0,8 – 11,0	5,4 ± 1,3
iBAL	9	33,3	10,6 – 46,1	7,3 – 67,0	31,8 ± 6,7
CBA	9	4,5	0,2 – 6,6	0,0 – 13,5	4,3 ± 1,4
iCBA	9	34,0	9,5 – 59,8	3,8 – 63,0	33,9 ± 8,4
C57	9	2,5	1,0 – 5,5	0,7 – 8,0	3,3 ± 0,9
iC57	9	36,7	17,2 – 40,5	6,5 – 52,5	30,7 ± 5,1

Técnica de coloração com Oil Red. BAL<iBAL: p=0,005, CBA<iCBA: p=0,008 e C57<iC57: p=0,0007 (Teste *t* com correção de Welch).

**Tabela A-07**

Intensidade de Fluorescência Média Total da proteína RelA (p65) nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA no sexto dia de infecção malárica.

GRUPOS	RelA (p65) Total (IFM)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	0,34	0,25 – 0,89	0,23 – 1,15	0,53 ± 0,17
iBAL	5	2,02	1,90 – 2,19	1,80 – 2,19	2,04 ± 0,07
CBA	5	0,00	0,00 – 0,24	0,00 – 0,49	0,10 ± 0,09
iCBA	5	1,16	1,06 – 1,62	1,05 – 1,74	1,31 ± 0,14
C57	5	0,00	0,00 – 0,11	0,00 – 0,11	0,04 ± 0,03
iC57	5	1,17	0,97 – 2,06	0,95 – 2,26	1,44 ± 0,26

Captura da imagem em confocal e análise pelo ImageJ. Não infectados: p=0,020 (Kruskal-Wallis). Segundo o teste comparativo de Dunn: BAL>C57. BAL>C57: p=0,008, BAL<iBAL: p=0,008, CBA<iCBA: p=0,011, C57<iC57: p=0,011 e iBAL>iCBA: p=0,008 (Mann-Whitney).

**Tabela A-08**

Intensidade de Fluorescência Média Nuclear da proteína RelA (p65) nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA no sexto dia de infecção malárica.

GRUPOS	RelA (p65) Nuclear (IFM)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	0,06	0,02 – 0,16	0,00 – 0,24	0,08 ± 0,04
iBAL	5	0,57	0,38 – 0,75	0,34 – 0,77	0,56 ± 0,08
CBA	5	0,00	0,00 – 0,07	0,00 – 0,14	0,03 ± 0,02
iCBA	5	0,26	0,12 – 0,28	0,07 – 0,28	0,21 ± 0,04
C57	5	0,00	0,00 – 0,09	0,00 – 0,09	0,03 ± 0,02
iC57	5	0,49	0,19 – 0,50	0,11 – 0,50	0,37 ± 0,08

Captura da imagem em confocal e análise pelo ImageJ. Infectados: p=0,022 (Kruskal-Wallis). Segundo o teste comparativo de Dunn: iBAL>iCBA (0,008). iBAL>iCBA: p=0,008, BAL<iBAL: p=0,008, CBA<iCBA: p=0,018 e C57<iC57: p=0,011 (Mann-Whitney).

**Tabela A-09**

Intensidade de Fluorescência Média Citoplasmática da proteína RelA (p65) nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA no sexto dia de infecção malárica.

GRUPOS	RelA (p65) Citoplasmático (IFM)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	0,32	0,24 – 0,73	0,17 – 0,91	0,45 ± 0,13
iBAL	5	1,46	1,35 – 1,60	1,31 – 1,63	1,48 ± 0,06
CBA	5	0,00	0,00 - 0,17	0,00 – 0,34	0,07 ± 0,06
iCBA	5	1,00	0,89 – 1,35	0,80 – 1,46	1,10 ± 0,11
C57	5	0,00	0,00 – 0,02	0,00 – 0,02	0,01 ± 0,00
iC57	5	0,89	0,68 – 1,56	0,51 – 1,77	1,07 ± 0,22

Captura da imagem em confocal e análise pelo ImageJ. Não infectados: p=0,02 (Kruskal-Wallis). Segundo o teste comparativo de Dunn: BAL>C57. BAL>C57: p=0,008, BAL<iBAL: p=0,008, CBA<iCBA: p=0,012, C57<iC57: p=0,011 e iBAL>iCBA, p=0,046 (Mann-Whitney).

**Tabela A-10**

Razão da Intensidade de Fluorescência Média Nuclear:Citoplasmática da proteína RelA (p65) nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA no sexto dia de infecção malárica.

GRUPOS	RelA (p65) Razão Nuclear:Citoplasmática (IFM)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	0,143	0,057 – 0,322	0,000 – 0,374	0,180 ± 0,065
iBAL	5	0,348	0,248 – 0,550	0,235 – 0,552	0,389 ± 0,068
CBA	5	0,000	0,000 – 0,021	0,000 – 0,422	0,084 ± 0,084
iCBA	5	0,192	0,119 – 0,278	0,075 -0,346	0,197 ± 0,044
C57	5	0,057	0,000 – 4,526	0,000 – 5,729	1,822 ± 0,409
iC57	5	0,313	0,119 – 0,278	0,075 – 0,346	1,168 ± 0,140

Captura da imagem em confocal e análise pelo ImageJ.

**Tabela A-11**

Intensidade de Fluorescência Média Total da proteína RelB (p68) nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA no sexto dia de infecção malárica.

GRUPOS	RelB (p68) Total (IFM)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	2,74	2,19 – 3,75	1,76 – 4,08	2,93 ± 0,39
iBAL	5	8,34	6,18 – 15,40	5,47 – 17,74	9,98 ± 2,68
CBA	5	2,72	2,23 – 6,55	2,08 – 8,20	4,06 ± 1,15
iCBA	5	5,14	4,68 – 7,53	4,46 – 7,95	5,91 ± 0,68
C57	5	0,64	0,00 – 2,39	0,00 – 3,53	1,08 ± 0,65
iC57	5	1,93	0,00 – 2,21	0,00 – 2,46	1,27 ± 0,53

Captura da imagem em confocal e análise pelo ImageJ . Infectados: p=0,005 (Kruskal-Wallis). Segundo método de Dunn: iBAL>iC57 e iCBA>iC57. iBAL>iC57:p=0,016, iCBA>iC57: p=0,008 e BAL<iBAL: p=0,016 (Mann-Whitney).

**Tabela A-12**

Intensidade de Fluorescência Média Nuclear da proteína RelB (p68) nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA no sexto dia de infecção malárica.

GRUPOS	RelB (p68) Nuclear (IFM)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	0,34	0,23 – 0,56	0,13 – 0,58	0,38 ± 0,08
iBAL	5	0,28	0,18 – 3,15	0,16 – 4,10	1,20 ± 0,97
CBA	5	0,25	0,16 – 0,48	0,14 – 0,55	0,31 ± 0,08
iCBA	5	1,02	0,69 – 2,05	0,50 – 2,22	1,30 ± 0,32
C57	5	0,00	0,00 – 0,32	0,00 – 0,64	0,13 ± 0,13
iC57	5	0,29	0,00 – 0,64	0,00 – 0,72	0,31 ± 0,14

Captura da imagem em confocal e análise pelo ImageJ . CBA<iCBA: p=0,016 e iC57<iCBA: p=0,016 (Mann-Whitney).



**Tabela A-13**

Intensidade de Fluorescência Média Citoplasmática da proteína RelB (p68) nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA no sexto dia de infecção malárica.

GRUPOS	RelB (p68) Citoplasmático (IFM)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	2,42	1,96 – 3,19	1,62 – 3,55	2,54 ± 0,32
iBAL	5	8,07	5,99 – 12,25	5,31 – 13,64	8,77 ± 1,75
CBA	5	2,47	2,07 – 6,06	1,90 – 7,66	3,75 ± 1,08
iCBA	5	4,40	3,85 – 5,49	3,44 – 5,73	4,62 ± 0,40
C57	5	0,64	0,00 – 2,39	0,00 – 3,53	1,08 ± 0,65
iC57	5	1,40	0,00 – 1,69	0,00 – 1,75	0,96 ± 0,39

Captura da imagem em confocal e análise pelo ImageJ. Infectados: p=0,004 (Kruskal-Wallis). Segundo o teste comparativo de Dunn: iBAL>iCBA>iC57. BAL<iBAL: p=0,016, iBAL>iCBA, p=0,032, iBAL>iC57: p=0,016 e iCBA>iC57: p=0,008 (Mann-Whitney).

**Tabela A-14**

Razão da Intensidade de Fluorescência Média Nuclear:Citoplasmática da proteína RelB (p68) nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA no sexto dia de infecção malárica.

GRUPOS	RelB (p68) Razão Nuclear:Citoplasmática (IFM)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	0,148	0,107 – 0,178	0,081 – 0,205	0,143 ± 0,020
iBAL	5	0,035	0,030 – 0,235	0,030 – 0,300	0,100 ± 0,067
CBA	5	0,094	0,066 – 0,099	0,060 – 0,102	0,084 ± 0,008
iCBA	5	0,295	0,160 – 0,372	0,114 – 0,388	0,272 ± 0,050
C57	5	0,000	0,000 – 0,320	0,000 – 0,640	0,128 ± 0,128
iC57	5	0,180	0,000 – 0,405	0,000 – 0,409	0,198 ± 0,091

Captura da imagem em confocal e análise pelo ImageJ. CBA>iCBA: p=0,008 (Mann-Whitney).

**Tabela A-15**

Intensidade de Fluorescência Média Total da proteína p52 (NF $\kappa$ B2) nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA no sexto dia de infecção malárica.

GRUPOS	p52 Total (IFM)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média $\pm$ DP
BAL	5	6,08	4,80 – 9,64	4,35 – 11,89	6,99 $\pm$ 1,32
iBAL	5	22,58	21,69 – 29,11	20,99 – 30,37	24,86 $\pm$ 1,80
CBA	5	12,75	6,69 – 24,32	5,89 – 32,32	14,96 $\pm$ 4,72
iCBA	5	10,84	10,18 – 20,61	9,63 – 30,25	14,48 $\pm$ 3,94
C57	5	6,08	3,24 – 19,32	1,80 – 20,23	10,24 $\pm$ 3,78
iC57	5	12,45	10,81 – 17,04	10,51 – 17,38	13,63 $\pm$ 1,43

Captura da imagem em confocal e análise pelo ImageJ. Infectados: p=0,034 (Kruskal-Wallis). Segundo o teste comparativo de Dunn: iBAL>iCBA. BAL<iBAL: p=0,008 (Mann-Whitney).

**Tabela A-16**

Intensidade de Fluorescência Média Nuclear da proteína p52 (NF $\kappa$ B2) nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA no sexto dia de infecção malárica.

GRUPOS	p52 Nuclear (IFM)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média $\pm$ DP
BAL	5	0,47	0,18 – 0,56	0,15 – 0,57	0,39 $\pm$ 0,09
iBAL	5	2,18	1,70 – 2,63	1,62 – 2,98	2,17 $\pm$ 0,24
CBA	5	1,12	0,37 – 1,33	0,14 – 1,39	0,90 $\pm$ 0,23
iCBA	5	1,69	1,16 – 2,33	0,86 – 2,37	1,72 $\pm$ 0,28
C57	5	0,32	0,09 – 2,67	0,00 – 4,15	1,17 $\pm$ 0,77
iC57	5	2,04	1,85 – 2,44	1,70 – 2,75	2,12 $\pm$ 0,17

Captura da imagem em confocal e análise pelo ImageJ. BAL<iBAL: p=0,008 (Mann-Whitney).

**Tabela A-17**

Intensidade de Fluorescência Média Citoplasmática da proteína p52 (NFκB2) nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA no sexto dia de infecção malárica.

GRUPOS	p52 Citoplasmático (IFM)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	5,46	4,01 – 8,52	3,53 – 10,73	6,1 ± 1,25
iBAL	5	20,17	19,61 – 27,19	19,44 – 28,65	22,75 ± 1,87
CBA	5	11,36	6,33 – 23,13	5,75 – 31,20	14,05 ± 4,59
iCBA	5	9,27	8,31 – 18,93	8,18 – 27,89	12,75 ± 3,80
C57	5	5,91	3,08 – 16,65	1,80 – 17,21	9,07 ± 3,17
iC57	5	10,44	8,41 – 15,13	8,36 – 15,68	11,51 ± 1,53

Captura da imagem em confocal e análise pelo ImageJ . Infectados: p=0,036 (Kruskal-Wallis). Segundo o teste comparativo de Dunn: iBAL>iC57. iBAL>iC57: p=0,008 e BAL<iBAL: p=0,008 (Mann-Whitney).

**Tabela A-18**

Razão da Intensidade de Fluorescência Média Nuclear:Citoplasmática da proteína p52 (NFκB2) nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA no sexto dia de infecção malárica.

GRUPOS	p52 Razão Nuclear:Citoplasmática (IFM)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	0,060	0,042 – 0,089	0,033 – 0,104	0,064 ± 0,012
iBAL	5	0,085	0,073 – 0,132	0,063 – 0,150	0,099 ± 0,015
CBA	5	0,084	0,030 – 0,104	0,024 – 0,122	0,070 ± 0,018
iCBA	5	0,178	0,086 – 0,226	0,085 – 0,270	0,161 ± 0,035
C57	5	0,060	0,042 – 0,089	0,033 – 0,104	0,064 ± 0,012
iC57	5	0,085	0,073 – 0,132	0,063 – 0,150	0,099 ± 0,015

Captura da imagem em confocal e análise pelo ImageJ.

**Tabela A-19**

Intensidade de Fluorescência Média Total da proteína PPAR- $\gamma$  nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA no sexto dia de infecção malárica.

GRUPOS	PPAR- $\gamma$ Total (IFM)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média $\pm$ DP
BAL	5	4,10	2,67 – 5,86	2,56 – 6,34	4,23 $\pm$ 0,73
iBAL	5	2,34	1,66 – 2,50	1,24 – 2,60	2,13 $\pm$ 0,24
CBA	5	5,03	3,24 – 6,44	2,13 – 7,29	4,88 $\pm$ 0,84
iCBA	5	1,27	0,69 – 2,26	0,66 – 2,89	1,43 $\pm$ 0,41
C57	5	3,92	2,65 – 5,15	2,27 – 6,03	3,90 $\pm$ 0,63
iC57	5	2,87	2,14 – 3,81	2,03 – 3,95	2,95 $\pm$ 0,38

Captura da imagem em confocal e análise pelo ImageJ. BAL>iBAL:  $p=0,016$  e CBA>iCBA:  $p=0,016$  (Mann-Whitney).

**Tabela A-20**

Intensidade de Fluorescência Média Nuclear da proteína PPAR- $\gamma$  nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA no sexto dia de infecção malárica.

GRUPOS	PPAR- $\gamma$ Nuclear (IFM)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média $\pm$ DP
BAL	5	0,04	0,03 – 0,11	0,02 – 0,17	0,06 $\pm$ 0,03
iBAL	5	0,34	0,19 – 0,48	0,12 – 0,54	0,34 $\pm$ 0,07
CBA	5	0,15	0,10 – 0,21	0,05 – 0,24	0,15 $\pm$ 0,03
iCBA	5	0,04	0,00 – 0,25	0,00 – 0,32	0,12 $\pm$ 0,06
C57	5	0,47	0,37 – 0,61	0,35 – 0,64	0,49 $\pm$ 0,05
iC57	5	0,32	0,15 – 0,47	0,00 – 0,58	0,31 $\pm$ 0,09

Captura da imagem em confocal e análise pelo ImageJ. Não infectados:  $p=0,004$  (Kruskal-Wallis). Segundo o teste comparativo de Dunn: BAL<C57 e C57>CBA (0,008). BAL<C57:  $p=0,008$ , C57>CBA:  $p=0,008$  e BAL<iBAL:  $p=0,016$  (Mann-Whitney).

**Tabela A-21**

Intensidade de Fluorescência Média Citoplasmática da proteína PPAR- $\gamma$  nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA no sexto dia de infecção malárica.

GRUPOS	PPAR- $\gamma$ Citoplasmático (IFM)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média $\pm$ DP
BAL	5	4,15	2,69 – 5,83	2,59 – 6,24	4,24 $\pm$ 0,71
iBAL	5	1,88	1,52 – 2,17	1,18 – 2,33	1,86 $\pm$ 0,19
CBA	5	4,89	3,14 – 6,23	2,07 – 7,05	4,72 $\pm$ 0,81
iCBA	5	1,08	0,72 – 2,08	0,70 – 2,57	1,34 $\pm$ 0,35
C57	5	3,34	2,16 – 4,71	1,92 – 5,63	3,42 $\pm$ 0,64
iC57	5	2,51	1,70 – 3,67	1,45 – 4,00	2,65 $\pm$ 0,46

Captura da imagem em confocal e análise pelo ImageJ. BAL>iBAL:  $p=0,008$  e CBA>iCBA:  $p=0,016$ ; (Mann-Whitney).

**Tabela A-22**

Razão da Intensidade de Fluorescência Média Nuclear:Citoplasmática da proteína PPAR- $\gamma$  nos macrófagos dos camundongos não suscetíveis (BALB/c) e dos suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA no sexto dia de infecção malárica.

GRUPOS	PPAR- $\gamma$ Razão Nuclear:Citoplasmática (IFM)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média $\pm$ DP
BAL	5	0,014	0,006 – 0,022	0,006 – 0,027	0,014 $\pm$ 0,004
iBAL	5	0,147	0,121 – 0,249	0,102 – 0,291	0,177 $\pm$ 0,033
CBA	5	0,174	0,097 – 0,224	0,071 – 0,226	0,163 $\pm$ 0,032
iCBA	5	0,143	0,048 – 0,276	0,000 – 0,403	0,159 $\pm$ 0,067
C57	5	0,034	0,028 – 0,034	0,026 – 0,035	0,032 $\pm$ 0,002
iC57	5	0,028	0,000 – 0,149	0,000 – 0,173	0,065 $\pm$ 0,035

Captura da imagem em confocal e análise pelo ImageJ. Não infectados:  $p=0,002$  (Kruskal-Wallis). Segundo o teste comparativo de Dunn: BAL<C57<CBA. BAL<C57:  $p=0,012$ , BAL<CBA:  $p=0,021$ , C57<CBA:  $p=0,012$  e BAL<iBAL:  $p=0,012$  (Mann-Whitney).

**Tabela A-23**

Influência da infecção malárica sobre a expressão da proteína do complexo inflamassômico NALPR1 nos macrófagos peritoneais no sexto dia de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	NALPR1 (IFM)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	2,157	1,261 – 2,827	0,484 – 2,924	2,066 ± 0,429
iBAL	5	0,989	0,641 – 1,188	0,371 – 1,189	0,929 ± 0,150
CBA	5	0,230	0,126 – 0,349	0,095 – 0,430	0,236 ± 0,057
iCBA	5	0,668	0,372 – 0,919	0,292 – 0,988	0,650 ± 0,127
C57	5	0,000	0,000	0,000	0,000 ± 0,000
iC57	5	0,953	0,770 – 1,205	0,668 – 1,437	0,980 ± 0,126

Captura da imagem em confocal e análise pelo ImageJ. Não infectados: p=0,002 (Kruskal-Wallis). Segundo o teste comparativo de Dunn: BAL>CBA>C57. BAL>C57: p=0,008, BAL>CBA: p=0,008, CBA>C57: p=0,008, CBA<iCBA: p=0,016 e, C57<iC57: p=0,011 (Mann-Whitney).

**Tabela A-24**

Influência da infecção malárica sobre a expressão da proteína do complexo inflamassômico ASC nos macrófagos peritoneais no sexto dia de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	ASC (IFM)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	0,574	0,234 – 1,471	0,166 – 1,506	0,796 ± 0,283
iBAL	5	5,505	4,287 – 8,006	4,218 – 8,297	6,019 ± 0,847
CBA	5	0,242	0,103 – 0,980	0,000 – 1,715	0,481 ± 0,312
iCBA	5	7,628	6,071 – 9,055	5,100 – 9,344	7,576 ± 0,740
C57	5	0,301	0,242 – 1,538	0,224 – 1,643	0,772 ± 0,315
iC57	5	4,085	2,697 – 6,596	2,459 – 8,909	4,534 ± 1,146

Captura da imagem em confocal e análise pelo ImageJ. BAL<iBAL: p=0,008 e CBA<iCBA: p=0,008 (Mann-Whitney).

**Tabela A-25**

Influência da infecção malárica sobre a expressão da proteína do complexo inflamassômico Caspase-1 nos macrófagos peritoneais no sexto dia de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	Caspase-1 (IFM)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	0,477	0,118 – 0,525	0,047 – 0,541	0,352 ± 0,099
iBAL	5	1,085	0,529 – 1,225	0,325 – 1,250	0,918 ± 0,174
CBA	5	0,000	0,000	0,000	0,000
iCBA	5	0,294	0,230 – 0,350	0,212 – 0,373	0,290 ± 0,028
C57	4	0,000	0,000	0,000	0,000
iC57	5	0,181	0,120 – 0,261	0,106 – 0,304	0,188 ± 0,035

Captura da imagem em confocal e análise pelo ImageJ. Não infectados: p=0,008 e Infectados: p=0,008 (Kruskal-Wallis). Segundo o teste comparativo de Dunn: BAL>CBA, BAL>C57, iBAL>iCBA e iBAL>iC57. BAL>CBA: p=0,008, BAL>C57: p=0,016, iBAL>iCBA: p=0,032, iBAL>iC57: p=0,008, CBA<iCBA: p=0,011 e C57<iC57: p=0,019 (Mann-Whitney).

**Tabela A-26**

Influência da infecção malárica sobre a produção de Interleucina 1 $\beta$  no homogenato cerebral após 6 dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	IL 1 $\beta$ (pg/mL) - Homogenato				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	223	88 – 401	85 – 448	240 ± 72
iBAL	5	124	105 – 137	99 – 141	121 ± 7
CBA	5	164	121 – 352	106 – 498	222 ± 71
iCBA	5	307	115 – 824	100 – 1110	437 ± 186
C57	5	339	289 – 383	281 – 389	337 ± 21
iC57	5	89	81 – 112	77 – 117	95 ± 7

Quantificação por ELISA. Infectados: p=0,030 (Kruskal-Wallis). Segundo o teste comparativo de Dunn: iC57<iCBA. iC57<iCBA: p=0,032 e C57>iC57 (Mann-Whitney).

**Tabela A-27**

Influência da infecção malárica sobre a produção de Interleucina 4 no homogenato cerebral após 6 dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	IL 4 (pg/mL) - Homogenato				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	25	14 – 73	6 – 75	40 ± 14
iBAL	5	34	21 – 70	20 – 90	43 ± 13
CBA	5	142	107 – 176	101 – 203	142 ± 18
iCBA	5	110	73 – 170	45 – 206	119 ± 26
C57	5	98	82 – 106	68 – 111	95 ± 7
iC57	5	85	52 – 97	34 – 103	76 ± 12

Quantificação por ELISA. Não infectados: p=0,005 e Infectados: p=0,032 (Kruskal-Wallis). Segundo o teste comparativo de Dunn: BAL<C57<CBA e iBAL<iCBA. BAL<C57: p=0,032, BAL<CBA: p=0,008, C57<CBA: p=0,032 e iBAL<iCBA: p=0,032 (Mann-Whitney).

**Tabela A-28**

Influência da infecção malárica sobre a produção de Interleucina 10 no homogenato cerebral após 6 dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	IL 10 (pg/mL) - Homogenato				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	16443	16148 – 16892	15945 – 17323	16505 ± 225
iBAL	5	818	376 – 1357	367 – 1374	857 ± 220
CBA	5	7901	7239 – 12860	6851 – 15682	9620 ± 1605
iCBA	4	623	562 – 1339	561 – 1558	841 ± 241
C57	5	314	199 – 1137	189 – 1531	597 ± 254
iC57	5	13562	8457 – 14692	4905 – 14956	11972 ± 1836

Quantificação por ELISA. Não infectados: p=0,002 e Infectados: p=0,011 (Kruskal-Wallis). Segundo o teste comparativo de Dunn: BAL>CBA>C57, iBAL<iC57 e iC57>iCBA. BAL>CBA: p=0,008, BAL>C57: p=0,008, CBA>C57: p=0,008, iBAL<iC57:p=0,008, iC57>iCBA: p=0,016, BAL>iBAL: 0,008, CBA>iCBA: p=0,016 e C57<iC57: p=0,008 (Mann-Whitney).



**Tabela A-29**

Influência da infecção malárica sobre a produção de Interleucina 12 no homogenato cerebral após 6 dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	IL 12 (pg/mL) - Homogenato				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	174	142 – 208	139 – 227	175 ± 16
iBAL	5	155	137 – 168	122 – 180	153 ± 9
CBA	5	257	214 – 272	187 – 281	246 ± 16
iCBA	5	202	168 – 231	162 – 248	200 ± 15
C57	5	778	147 – 1721	126 – 2435	903 ± 419
iC57	5	152	137 – 726	136 – 1035	376 ± 173

Quantificação por ELISA.

**Tabela A-30**

Influência da infecção malárica sobre a produção de Interleucina 17 no homogenato cerebral após 6 dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	IL 17 (pg/mL) - Homogenato				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	203	136 – 240	133 – 269	191 ± 25
iBAL	5	187	151 – 225	123 – 261	188 ± 22
CBA	5	334	288 – 362	271 – 385	327 ± 19
iCBA	5	239	189 – 313	179 – 367	248 ± 33
C57	5	213	172 – 264	168 – 268	217 ± 21
iC57	5	205	199 – 257	195 – 266	224 ± 14

Quantificação por ELISA. Não infectados:  $p=0,008$  (Kruskal-Wallis). Segundo o teste comparativo de Dunn: BAL<CBA e C57<CBA. BAL<CBA:  $p=0,008$  e C57<CBA:  $p=0,008$  (Mann-Whitney).

**Tabela A-31**

Influência da infecção malárica sobre a produção de Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  no homogenato cerebral após 6 dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	TNF $\alpha$ (pg/mL) - Homogenato				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média $\pm$ DP
BAL	5	4111	4037 – 4223	3986 – 4331	4126 $\pm$ 56
iBAL	5	204	94 – 339	92 – 343	214 $\pm$ 55
CBA	5	1975	1810 – 3215	1713 – 3920	2405 $\pm$ 401
iCBA	5	141	70 – 280	0 – 389	168 $\pm$ 63
C57	5	79	50 – 285	47 – 383	149 $\pm$ 64
iC57	5	3390	2114 – 3673	1226 – 3739	2993 $\pm$ 459

Quantificação por ELISA. Não infectados:  $p=0,002$  e Infectados:  $p=0,009$  (Kruskal-Wallis). Segundo o teste comparativo de Dunn: BAL>CBA>C57, iBAL<iC57 e iC57>iCBA. BAL>CBA:  $p=0,008$ , BAL>C57:  $p=0,008$ , C57<CBA:  $p=0,008$ , iBAL<iC57 e iC57>iCBA (Mann-Whitney).

**Tabela A-32**

Influência da infecção malárica sobre a produção de Ciclooxigenase 2 nas células cerebrais no sexto dia de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	COX-2 – Células Cerebrais Positivas (%)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média $\pm$ DP
BAL	5	1,40	0,70 – 4,46	0,60 – 6,45	2,35 $\pm$ 1,08
iBAL	4	3,50	2,00 – 10,71	1,80 – 12,81	5,40 $\pm$ 2,53
CBA	4	3,77	1,69 – 6,20	1,40 – 6,60	3,89 $\pm$ 1,17
iCBA	4	14,76	9,11 – 18,21	7,24 – 19,35	14,03 $\pm$ 2,51
C57	5	3,20	1,70 – 4,42	0,60 – 4,73	3,09 $\pm$ 0,71
iC57	7	14,34	4,47 – 33,73	3,90 – 39,54	18,49 $\pm$ 5,43

Avaliação por imunohistoquímica. CBA<iCBA:  $p=0,029$  e C57<iC57:  $p=0,018$  (Mann-Whitney).

**Tabela A-33**

Influência da infecção malárica sobre a produção de Ciclooxygenase 2 nas células cerebelares no sexto dia de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	COX-2 – Células Cerebelares Positivas (%)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	3,20	0,85 – 6,55	0,40 – 7,60	3,60 ± 1,33
iBAL	5	4,00	2,09 – 6,20	1,20 – 7,20	4,11 ± 1,01
CBA	3	2,80	2,80 – 7,62	2,80 – 7,62	4,41 ± 1,61
iCBA	3	7,20	6,53 – 15,18	6,53 – 15,18	9,64 ± 2,78
C57	6	6,80	3,30 – 7,80	0,00 – 9,60	5,80 ± 1,35
iC57	4	7,83	1,92 – 9,50	0,00 – 10,00	6,42 ± 2,20

Avaliação por imunohistoquímica.

**Tabela A-34**

Porcentagem de vasos cerebrais com padrão 0 para Ciclooxygenase 2 após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	COX-2 – Vasos Cerebrais – Padrão 0 (%)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	70,00	68,34 – 81,67	66,67 – 86,67	74,00 ± 3,56
iBAL	4	60,00	42,29 – 68,33	37,50 – 70,00	56,88 ± 7,01
CBA	4	63,34	42,50 – 81,67	36,67 – 86,67	62,50 ± 10,31
iCBA	4	30,00	17,50 – 32,50	13,33 – 33,33	26,67 ± 4,51
C57	5	60,00	31,67 – 85,00	20,00 – 86,67	58,67 ± 12,50
iC57	8	19,11	4,58 – 55,00	3,33 – 83,33	29,57 ± 10,34

Avaliação por imunohistoquímica. CBA>iCBA: p=0,029 (Mann-Whitney).

**Tabela A-35**

Porcentagem de vasos cerebrais com padrão 1 para Ciclooxigenase 2 após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	COX-2 – Vasos Cerebrais – Padrão 1 (%)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	13,33	10,00 – 21,67	6,67 – 23,33	15,33 ± 2,91
iBAL	4	23,34	15,00 – 31,67	13,33 – 33,33	23,33 ± 4,30
CBA	4	28,34	12,50 – 41,67	10,00 – 43,33	27,50 ± 7,62
iCBA	4	40,00	24,17 – 48,33	20,00 – 50,00	37,50 ± 6,44
C57	5	13,33	13,33 – 40,00	13,33 – 46,67	24,00 ± 6,87
iC57	8	40,84	27,50 – 53,61	16,67 – 56,67	39,93 ± 5,00

Avaliação por imunohistoquímica.

**Tabela A-36**

Porcentagem de vasos cerebrais com padrão 2 para Ciclooxigenase 2 após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	COX-2 – Vasos Cerebrais – Padrão 2 (%)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	0,00	0,00 – 11,67	0,00 – 13,33	4,67 ± 2,91
iBAL	4	11,25	5,00 – 15,63	3,33 – 16,67	10,63 ± 2,79
CBA	4	6,67	3,33 – 15,00	3,33 – 16,67	8,33 ± 3,19
iCBA	4	15,00	10,83 – 21,67	10,00 – 23,33	15,83 ± 2,85
C57	5	6,67	1,67 – 11,67	0,00 – 13,33	6,67 ± 2,36
iC57	8	18,34	11,67 – 26,67	0,00 – 44,00	19,81 ± 4,63

Avaliação por imunohistoquímica. C57<iC57: p=0,047 (Mann-Whitney).

**Tabela A-37**

Porcentagem de vasos cerebrais com padrão 3 para Ciclooxygenase 2 após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	COX-2 – Vasos Cerebrais – Padrão 3 (%)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	0,00	0,00 – 5,00	0,00 – 6,67	2,00 ± 1,33
iBAL	4	3,34	0,00 – 14,17	0,00 – 16,67	5,84 ± 3,94
CBA	4	1,67	0,00 – 3,33	0,00 – 3,33	1,67 ± 0,96
iCBA	4	21,67	9,17 – 29,17	6,67 – 30,00	20,00 ± 5,27
C57	5	0,00	0,00	0,00	0,00
iC57	8	8,33	0,00 – 15,84	0,00 – 33,33	10,00 ± 4,13

Avaliação por imunohistoquímica. CBA<iCBA: p=0,028 (Mann-Whitney).

**Tabela A-38**

Porcentagem de vasos cerebelares com padrão 0 para Ciclooxygenase 2 após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	COX-2 – Vasos Cerebelares – Padrão 0 (%)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	80,00	66,67 – 96,67	53,33 – 100,00	81,33 ± 8,00
iBAL	5	47,06	46,41 – 86,67	46,15 – 100,00	62,64 ± 10,68
CBA	3	40,00	26,67 – 53,33	26,67 – 53,33	40,00 ± 7,70
iCBA	3	26,67	6,67 – 33,33	6,67 – 33,33	22,22 ± 8,01
C57	5	70,00	28,34 – 76,67	0,00 – 80,00	56,00 ± 14,51
iC57	5	40,00	16,67 – 55,00	0,00 – 60,00	36,67 ± 10,22

Avaliação por imunohistoquímica.

]

**Tabela A-39**

Porcentagem de vasos cerebelares com padrão 1 para Ciclooxigenase 2 após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	COX-2 – Vasos Cerebelares – Padrão 1 (%)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	5	13,33	3,34 – 23,34	0,00 – 26,67
iBAL	5	5	20,00	8,83 – 28,72	0,00 – 30,77
CBA	5	3	40,00	40,00	40,00
iCBA	5	3	33,33	33,33 – 46,67	33,33 – 46,67
C57	5	5	26,67	10,00 – 30,00	0,00 – 30,00
iC57	5	5	50,00	30,00 – 63,33	20,00 – 73,33

Avaliação por imunohistoquímica. Não infectados:  $p=0,023$  e Infectados:  $p=0,033$  (Kruskal-Wallis). Segundo o teste comparativo de Dunn: BAL<CBA e iBAL<iC57. BAL<CBA:  $p=0,036$  e iBAL<iC57:  $p=0,046$  (Mann-Whitney).

**Tabela A-40**

Porcentagem de vasos cerebelares com padrão 2 para Ciclooxigenase 2 após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	COX-2 – Vasos Cerebelares – Padrão 2 (%)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	0,00	0,00 – 13,34	0,00 – 20,00	5,33 ± 3,89
iBAL	5	15,38	3,34 – 22,16	0,00 – 26,67	13,27 ± 4,60
CBA	3	20,00	6,67 – 33,33	6,67 – 33,33	20,00 ± 7,70
iCBA	3	13,33	6,67 – 26,67	6,67 – 26,67	15,56 ± 5,88
C57	5	0,00	0,00 – 6,67	0,00 – 13,33	2,67 ± 2,67
iC57	5	20,00	6,67 – 20,00	0,00 – 20,00	14,67 ± 3,89

Avaliação por imunohistoquímica.

**Tabela A-41**

Porcentagem de vasos cerebelares com padrão 3 para Ciclooxygenase 2 após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	COX-2 – Vasos Cerebelares – Padrão 3 (%)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	0,00	0,00	0,00	0,00
iBAL	5	0,00	0,00 – 6,79	0,00 – 7,69	2,71 ± 1,69
CBA	3	0,00	0,00	0,00	0,00
iCBA	3	33,33	6,67 – 33,33	6,67 – 33,33	24,44 ± 8,89
C57	5	0,00	0,00	0,00	0,00
iC57	5	0,00	0,00 – 3,34	0,00 – 6,67	1,33 ± 1,33

Avaliação por imunohistoquímica. Infectados: p=0,040 (Kruskal-Wallis). Segundo o teste comparativo de Dunn: iCBA>iC57. iCBA>iC57: p=0,049 (Mann-Whitney).

**Tabela A-42**

Influência da infecção malárica sobre a produção de Ciclooxygenase 2 nos macrófagos peritoneais no sexto dia de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	COX-2 – Macrófagos Peritoneais – Intensidade de fluorescência				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	1461	881 – 2445	638 – 3328	1622 ± 456
iBAL	3	2308	978 – 2361	978 – 2361	1882 ± 452
CBA	5	767	652 – 1217	631 – 1420	901 ± 146
iCBA	4	621	449 – 1794	410 – 2167	955 ± 408
C57	5	1644	723 – 3994	39 – 6330	2215 ± 1071
iC57	5	1389	908 – 2406	741 – 3392	1603 ± 464

Avaliação por citometria de fluxo.

**Tabela A-43**

Influência da infecção malárica sobre a produção de Ciclooxigenase 2 na micróglia no sexto dia de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	COX-2 – Micróglia – Intensidade de fluorescência				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	23,10	15,75 – 36,45	8,94 – 44,00	25,50 ± 5,67
iBAL	4	23,45	9,59 – 28,33	6,32 – 28,60	20,46 ± 5,14
CBA	5	34,80	27,40 – 36,95	23,80 – 37,80	32,70 ± 2,49
iCBA	5	28,80	21,95 – 41,40	18,40 – 51,80	31,10 ± 5,60
C57	5	24,90	18,75 – 36,80	15,90 – 47,70	27,20 ± 5,41
iC57	5	24,60	17,60 – 29,40	12,90 – 30,40	23,72 ± 3,05

Avaliação por citometria de fluxo.

**Tabela A-44**

Influência da infecção malárica sobre a produção de 5-Lipoxigenase nas células cerebrais no sexto dia de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	5-LOX – Células Cerebrais Positivas (%)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	1,80	0,70 – 5,98	0,40 – 9,36	3,03 ± 1,62
iBAL	4	7,07	2,40 – 8,61	1,20 – 8,76	6,03 ± 1,71
CBA	4	2,30	1,30 – 4,05	1,00 – 4,60	2,55 ± 0,75
iCBA	4	7,38	5,86 – 16,33	5,54 – 19,12	9,85 ± 3,13
C57	6	2,50	1,48 – 8,80	0,60 – 10,80	4,38 ± 1,67
iC57	8	11,10	8,21 – 20,11	6,01 – 29,09	14,32 ± 2,81

Avaliação por imunohistoquímica. CBA<iCBA: p=0,029 e C57<iC57: p=0,020 (Mann-Whitney).



**Tabela A-45**

Influência da infecção malárica sobre a produção de 5-Lipoxigenase nas células cerebelares no sexto dia de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	5-LOX – Células Cerebelares Positivas (%)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	4	3,40	0,70 – 5,65	0,00 – 6,20	3,25 ± 1,29
iBAL	5	3,88	2,44 – 7,65	1,68 – 10,10	4,81 ± 1,44
CBA	3	4,23	2,00 – 11,03	2,00 – 11,03	5,75 ± 2,72
iCBA	3	12,70	5,60 – 18,80	5,60 – 18,80	12,37 ± 3,81
C57	6	3,74	2,40 – 9,38	1,20 – 10,24	5,14 ± 1,49
iC57	4	6,80	3,20 – 22,87	2,00 – 28,22	10,96 ± 5,87

Avaliação por imunohistoquímica.

**Tabela A-46**

Porcentagem de vasos cerebrais com padrão 0 para 5-Lipoxigenase após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	5-LOX – Vasos Cerebrais – Padrão 0 (%)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	4	69,10	48,93 – 90,63	46,70 – 93,30	69,55 ± 11,00
iBAL	4	43,34	31,67 – 70,00	30,00 – 76,67	48,34 ± 10,32
CBA	4	61,65	39,80 – 80,80	36,40 – 83,30	60,75 ± 10,70
iCBA	4	41,67	30,00 – 43,33	26,67 – 43,33	38,33 ± 3,97
C57	5	66,70	57,50 – 78,35	56,70 – 90,00	67,68 ± 5,95
iC57	7	43,33	27,27 – 63,33	6,67 – 86,67	45,85 ± 9,78

Avaliação por imunohistoquímica.

**Tabela A-47**

Porcentagem de vasos cerebrais com padrão 1 para 5-Lipoxigenase após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	5-LOX – Vasos Cerebrais – Padrão 1 (%)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	4	18,35	4,90 – 32,48	4,30 – 33,30	18,58 ± 7,60
iBAL	4	38,34	21,67 – 42,50	16,67 – 43,33	34,17 ± 5,99
CBA	4	22,00	14,15 – 29,33	13,30 – 30,00	21,83 ± 4,04
iCBA	4	36,67	23,33 – 40,00	20,00 – 40,00	33,33 ± 4,71
C57	5	33,30	15,00 – 39,20	6,70 – 41,70	28,34 ± 6,19
iC57	7	22,22	16,67 – 27,27	13,33 – 30,00	21,90 ± 2,20

Avaliação por imunohistoquímica.

**Tabela A-48**

Porcentagem de vasos cerebrais com padrão 2 para 5-Lipoxigenase após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	5-LOX – Vasos Cerebrais – Padrão 2 (%)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	4	9,90	2,18 – 15,30	0,00 – 16,70	9,13 ± 3,47
iBAL	4	15,00	8,34 – 26,67	6,67 – 30,00	16,67 ± 4,91
CBA	4	11,65	4,98 – 23,80	3,30 – 27,30	13,48 ± 5,06
iCBA	4	20,00	15,00 – 25,00	13,33 – 26,67	20,00 ± 2,72
C57	5	3,30	0,00 – 8,35	0,00 – 10,00	4,00 ± 1,95
iC57	7	11,11	6,67 – 19,05	0,01 – 43,33	15,13 ± 5,27

Avaliação por imunohistoquímica.

**Tabela A-49**

Porcentagem de vasos cerebrais com padrão 3 para 5-Lipoxigenase após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	5-LOX – Vasos Cerebrais – Padrão 3 (%)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	4	1,85	0,00 – 4,15	0,00 – 4,30	2,00 ± 1,16
iBAL	4	0,00	0,00 – 2,48	0,00 – 3,30	0,83 ± 0,83
CBA	4	3,35	0,00 – 8,50	0,00 – 9,10	3,95 ± 2,33
iCBA	4	6,67	0,83 – 17,50	0,00 – 20,00	8,33 ± 4,41
C57	5	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,00
iC57	7	19,05	0,01 – 30,00	0,01 – 36,36	15,54 ± 5,85

Avaliação por imunohistoquímica. C57<iC57: p=0,005 (Mann-Whitney).

**Tabela A-50**

Porcentagem de vasos cerebelares com padrão 0 para 5-Lipoxigenase após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	5-LOX – Vasos Cerebelares – Padrão 0 (%)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	4	64,45	13,89 – 88,33	0,00 – 93,33	55,56 ± 20,06
iBAL	5	46,67	33,33 – 83,34	33,33 – 100,00	56,00 ± 12,58
CBA	3	46,15	40,00 – 60,00	40,00 – 60,00	48,72 ± 5,91
iCBA	3	26,67	13,33 – 50,00	13,33 – 50,00	30,00 ± 10,72
C57	5	60,00	56,67 – 86,67	53,33 – 93,33	69,33 ± 7,48
iC57	4	34,77	26,67 – 48,22	26,67 – 50,00	36,55 ± 5,89

Avaliação por imunohistoquímica. C57>iC57: p=0,019 (Mann-Whitney).

**Tabela A-51**

Porcentagem de vasos cerebelares com padrão 1 para 5-Lipoxigenase após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	5-LOX – Vasos Cerebelares – Padrão 1 (%)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	4	14,45	1,67 – 25,56	0,00 – 26,67	13,89 ± 6,31
iBAL	5	26,67	6,67 – 33,33	0,00 – 33,33	21,33 ± 6,46
CBA	3	40,00	30,77 – 40,00	30,77 – 40,00	36,92 ± 3,08
iCBA	3	30,00	20,00 – 46,67	20,00 – 46,67	32,22 ± 7,78
C57	5	26,67	13,34 – 36,67	6,67 – 40,00	25,33 ± 5,73
iC57	4	48,10	35,71 – 58,33	33,33 – 60,00	47,38 ± 5,86

Avaliação por imunohistoquímica. C57<iC57: p=0,049 (Mann-Whitney).

**Tabela A-52**

Porcentagem de vasos cerebelares com padrão 2 para 5-Lipoxigenase após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	5-LOX – Vasos Cerebelares – Padrão 2 (%)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	4	0,00	0,00 – 16,67	0,00 – 22,22	5,56 ± 5,56
iBAL	5	20,00	3,34 – 26,67	0,00 – 33,33	16,00 ± 5,81
CBA	3	0,00	0,00 – 23,08	0,00 – 23,08	7,69 ± 7,69
iCBA	3	26,67	20,00 – 33,33	20,00 – 33,33	26,67 ± 3,85
C57	5	0,00	0,00 – 13,34	0,00 – 20,00	5,33 ± 3,89
iC57	4	15,48	13,57 – 19,17	13,33 – 20,00	16,07 ± 1,49

Avaliação por imunohistoquímica.

**Tabela A-53**

Porcentagem de vasos cerebelares com padrão 3 para 5-Lipoxigenase após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	5-LOX – Vasos Cerebelares – Padrão 3 (%)				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	4	0,00	0,00	0,00	0,00
iBAL	5	0,00	16,67	0,00 – 20,00	6,67 ± 4,22
CBA	3	0,00	20,00	0,00 – 20,00	6,67 ± 6,67
iCBA	3	6,67	26,67	0,00 – 26,67	11,11 ± 8,01
C57	5	0,00	0,00	0,00	0,00
iC57	4	0,00	0,00	0,00	0,00

Avaliação por imunohistoquímica.

**Tabela A-54**

Influência da infecção malárica sobre a produção de 5-Lipoxigenase nos macrófagos peritoneais no sexto dia de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	5-LOX – Macrófagos Peritoneais – Intensidade de fluorescência				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	505	327 – 2369	309 – 2510	1179 ± 489
iBAL	3	2371	1852 – 2642	1852 – 2642	2288 ± 232
CBA	5	1619	1162 – 1961	851 – 2207	1573 ± 219
iCBA	4	1773	1422 – 2004	1314 – 2072	1733 ± 157
C57	4	2542	2469 – 2836	2462 – 2916	2616 ± 104
iC57	4	1060	595 – 1589	455 – 1750	1081 ± 265

Avaliação por citometria de fluxo. Não infectados: p=0,038 e Infectados: p=0,031 (Kruskal-Wallis). Segundo o teste comparativo de Dunn: CBA<C57: p=0,016 e C57>iC57: p=0,029 (Mann-Whitney).

**Tabela A-55**

Influência da infecção malárica sobre a produção de 5-Lipoxigenase na micróglia no sexto dia de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	5-LOX – Micróglia – Intensidade de fluorescência				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	4	6,05	5,16 – 12,80	5,01 – 14,90	8,00 ± 2,32
iBAL	3	6,92	4,85 – 23,60	4,85 – 23,60	11,79 ± 5,93
CBA	5	9,87	7,45 – 11,75	7,14 – 12,00	9,66 ± 0,97
iCBA	4	9,60	7,07 – 10,93	6,59 – 11,00	9,20 ± 1,03
C57	4	12,20	7,13 – 13,78	5,84 – 13,90	11,04 ± 1,84
iC57	4	11,50	10,33 – 19,65	10,10 – 22,20	13,83 ± 2,82

Avaliação por citometria de fluxo.

**Tabela A-56**

Avaliação da permeabilidade vascular cerebral após seis dias de infecção em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

GRUPOS	Permeabilidade cerebral				
	n	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
BAL	5	22,30	17,35 – 27,20	16,10 – 30,00	22,28 ± 2,41
iBAL	9	15,70	9,00 – 24,85	6,10 – 34,40	16,76 ± 3,21
CBA	5	12,30	9,85 – 22,15	8,40 – 25,20	15,26 ± 3,04
iCBA	5	38,10	21,60 – 79,60	17,50 – 119,40	48,10 ± 18,29
C57	5	11,80	7,65 – 18,05	5,00 – 22,30	12,64 ± 2,82
iC57	8	45,95	24,98 – 134,90	22,70 – 246,00	78,31 ± 28,

Dosagem do Azul de Evans por espectrofotometria. Infectados: p=0,005 (Kruskal-Wallis). Segundo o teste comparativo de Dunn: iBAL<iC57=iCBA. iBAL<iCBA: p=0,0019, iBAL<iC57: p=0,004, CBA<iCBA e C57<iC57 (Mann-Whitney).

**Tabela A-57**

Quantidade de regiões cerebrais e cerebelares com micro-hemorragia na malária experimental. Após seis dias de infecção, a presença de micro-hemorragia foi avaliada em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

Grupo (n=5) Testes estatísticos	Micro-hemorragia (%)							
	Córtex		Tálamo		Hipocampo		Cerebelo	
	Med (quartis)	Média ± DP	Med (quartis)	Média ± DP	Med (quartis)	Média ± DP	Med (quartis)	Média ± DP
BAL	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0
iBAL	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	4,8 ± 4,8	0,0 (0,0 - 0,0)	3,6 ± 3,6
CBA	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0
iCBA	0,0 (0,0 – 0,0)	2,1 ± 2,1	0,0 (0,0 - 0,0)	3,1 ± 3,1	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	5,8 ± 5,8
C57	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0
iC57	0,0 (0,0 - 2,7)	0,9 ± 0,9	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 – 3,3)	1,1 ± 1,1

Estudo histopatológico por microscopia óptica em cortes corados com hematoxilina-eosina. NI: Não infectados. INF: Infectados. p>0,05 (Mann-Whitney e Kruskal-Wallis)

**Tabela A-58**

Quantidade de regiões cerebrais e cerebelares com infiltrado inflamatório na malária experimental. Após seis dias de infecção, a presença de infiltrado inflamatório foi avaliada em camundongos não suscetíveis (BALB/c) e suscetíveis (CBA e C57BL/6) à malária cerebral, infectados ou não com *P. berghei* ANKA.

Grupo (n=5) Testes estatísticos	Infiltrado Inflamatório (%)							
	Córtex		Tálamo		Hipocampo		Cerebelo	
	Med (quartis)	Média ± DP	Med (quartis)	Média ± DP	Med (quartis)	Média ± DP	Med (quartis)	Média ± DP
<b>BAL</b>	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0
<b>iBAL</b>	0,0 (0,0 - 3,2)	1,3 ± 0,8	0,0 (0,0 - 5,8)	2,3 ± 1,5	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 - 2,5)	1,0 ± 1,0
<b>CBA</b>	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0
<b>iCBA</b>	0,0 (0,0 - 5,8)	2,3 ± 1,8	0,0 (0,0 - 2,1)	0,84 ± 0,84	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0
<b>C57</b>	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0
<b>iC57</b>	0,0 (0,0 - 1,6)	0,7 ± 0,4	0,0 (0,0 - 5,0)	2,0 ± 2,0	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0

Estudo histopatológico por microscopia óptica em cortes corados com hematoxilina-eosina. NI: Não infectados. INF: Infectados.  $p > 0,05$  (Mann-Whitney e Kruskal-Wallis)



## **APÊNDICE DE REAGENTES**

## A) Reagentes Cultilab

\*Cultilab Materiais para cultura de células LTDA – Campinas – São Paulo - Brasil

- Soro fetal bovino inativado (SFB) – Licen n<sup>o</sup>: 6874/MA

## B) Reagentes Dako

\*Dako North America – Carpinteria – California – EUA

- **DAB buffer** – Cromógeno e substrato para HRP – cat n<sup>o</sup>: K3468811-2

## C) Reagentes eBioscience

\*eBioscience Inc – San Diego – California – EUA

- **Interleucina 10 (IL-10)** – Ready-SET-Go!<sup>®</sup> – cat n<sup>o</sup>: 88-7104
- **Interleucina 12 (IL-12)** – Ready-SET-Go!<sup>®</sup> – cat n<sup>o</sup>: 88-7121
- **Interleucina 17 (IL-17)** – Ready-SET-Go!<sup>®</sup> – cat n<sup>o</sup>: 88-7371
- **Interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )** – Ready-SET-Go!<sup>®</sup> – cat n<sup>o</sup>: 88-7013
- **Interleucina 4 (IL-4)** – Ready-SET-Go!<sup>®</sup> – cat n<sup>o</sup>: 88-7044
- **TNF alpha (TNF- $\alpha$ )** – Ready-SET-Go!<sup>®</sup> – cat n<sup>o</sup>: 88-7324

## D) Reagentes Eurofarma

\*Eurofarma Laboratórios LTDA – São Paulo – São Paulo – Brasil

- **Heparina sódica** – Heptar 5.000 UI/mL – registro n<sup>o</sup>: 1.0043.0124/MS – lote 218548A

## E) Reagentes Invitrogen Molecular Probes

\*Life Technologies Corporation – Carlsbad – California – EUA

- **Anticorpo anti-cabra biotilado** - cat n<sup>o</sup>: A10518
- **Anticorpo anti-IgG de coelho acoplado ao ALEXA 546** – cat n<sup>o</sup>: A11035
- **Pro-long<sup>®</sup> Gold Antifade reagent** – cat n<sup>o</sup>: P36934
- **DAPI** – 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride – cat n<sup>o</sup>: D1306

- **Bodipy** – Fluoróforo lipofílico 4,4-difluoro-3a-4a-diazo-s-indaceno – Bodipy Lipid Probes – cat n°: 493/503

## F) Reagentes Quimibrás

\*Quimibrás Indústrias químicas S/A – Rio de Janeiro – Rio de Janeiro – Brasil

- **Ácido fosfórico** –  $H_3PO_4$  – cat n°: 0016
- **Nitrito de sódio** –  $NaNO_2$  – cat n°: 10200

## G) Reagentes Merck

\*Merck KGaA - Norbert Moeren – Darmstadt – Alemanha

- **Enthelan** – cat n°: 1079600500
- **Peróxido de hidrogênio** –  $H_2O_2$  – cat n°: 1072101000
- **Hidróxido de sódio** –  $NaOH$  – cat n°: 6498
- **Óleo vermelho** – oil-red-O (C.I. 26125) – cat n°: 1052300025

## H) Reagentes Newprov

\*Newprov – Produtos para laboratório – São José dos Pinhais – Paraná – Brasil

- **Panótico** – Coloração hematológica Instant Prov – cat n°: 1319

## I) Reagentes Prothemo

\*Prothemo – São Paulo – São Paulo – Brasil

- **Albumina bovina 22%** – cat n°: 158

## J) Reagentes Roche

\* F. Hoffmann-La Roche Ltd – Basel – Suíça

- **Inibidor de protease** – Complete Mini – cat n°: 11 836 153 001

## K) Reagentes Santa Cruz Biothecnology

\*Santa Cruz Biotechnology Inc – Santa Cruz – California – EUA

- **Anti-5LOX** – Antic. polic. de cabra anti-5-LOX (N-19) – cat n°: SC-8885
- **Anti-COX2** – Antic. polic. de cabra anti-COX-2 (N-20) – cat n°: SC-1746
- **Anti-ASC** – Antic. polic. de coelho anti-ASC (N-15) – cat n°: SC-22514-R
- **Anti-CASP1** – Antic. polic. de coelho anti-caspase1 (A-19) – cat n°: SC-622
- **Anti-F4/80** – Antic. polic. de coelho anti-F4/80 (M-300) – cat n°: SC-25830
- **Anti-NALP1** – Antic. polic. de coelho anti-Nalp1 (M90) – cat n°: SC-66993
- **Anti-p65** – Antic. polic. de coelho anti-NFκB p65 (H-286) – cat n°: SC7151
- **Anti-p52** – Antic. polic. de coelho anti-NFκB p52 (K-27) – cat n°: SC298
- **Anti-RelB** – Antic. polic. de coelho anti-RelB (C-19) – cat n°: SC226

## L) Reagentes Schering-Plough

\* Schering-Plough Produtos Farmacêuticos Ltda – Rio de Janeiro – Rio de Janeiro – Brasil

- **Gentamicina** – Garamicina (sulfato de gentamicina) – registro n°: 1.0093.0046.005-0/MS – lote 003

## M) Reagentes Sigma

\*Sigma-Aldrich® INC – St. Louis – Missouri – EUA

- **Azul de evans** – cat n°: E-2129
- **Bicarbonato de sódio** – NaHCO<sub>3</sub> – cat n°: S-6014
- **Cacodilato de sódio** – dimetil-larsonato de sódio (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>AsO<sub>2</sub>Na • 3H<sub>2</sub>O) – cat n°: C0250
- **Dextrose** – D-(+)-glucose – cat n°: G-7021
- **EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético – cat n°: EDS
- **Formamida** – N,N-dimetilformamida – cat n°: D-8654
- **Gelatina** – cat n°: G-1890
- **Glicerol** – glicerina – cat n°: G6279
- **Glutaraldeído** – cat n°: G-6257 (sigma)
- **HBSS** – sal de Hank balanceado – cat n°: H6136
- **Hepes** – n-[2-hidroxi etil] piperazina-N'-[2-ácido etano sulfônico] – cat n°: H3375

- **Interferon- $\gamma$**  – citocina recombinante de camundongo expresso em *E. coli*. – cat n<sup>o</sup>: I4777
- **LPS** – Lipopolissacarídeo O55:B5 – cat n<sup>o</sup>: L2880
- **NEED** – 1-N naftiletileno diamina dihidroclorido – cat n<sup>o</sup>: N-9125
- **Nigrosina** – cat n<sup>o</sup>: N-4754
- **Percoll**<sup>®</sup> – meio de cultura – cat n<sup>o</sup>: P4937, lote
- **Peroxidase** – HRPO de *Amoracia rusticana* tipo II 2RZ com 224 unidade de Purpurogalina – cat n<sup>o</sup>: P8250
- **PMA** – 13-Acetato de forbol 12-miristato – cat n<sup>o</sup>: P8139
- **RPMI 1640** – meio para cultura de células com vermelho de fenol – cat n<sup>o</sup>: R4130
- **Silano** – 3-aminopropyltriethoxysilane – cat n<sup>o</sup>: A-3648
- **Sulfanilamida** – p-aminobenzenosulfonamida – cat n<sup>o</sup>: S-9251
- **Tetróxido de ósmio** – OsO<sub>4</sub> – cat n<sup>o</sup>: 419494
- **Triton X-100** – Óxido etileno octilfenol condensado – cat n<sup>o</sup>: T9284
- **Tween-20** – monolaurato de polioxietilenosorbitan – cat n<sup>o</sup>: P1379

## N) Reagentes Southern Biotech

\*SouthernBiotech – Birmingham – Alabama – EUA

- **Anti-cabra PE** – Anticorpo anti- IgG de cabra marcado com PE – cat n<sup>o</sup>: 6020-09
- **Anti-coelho FITC** – Anticorpo anti- IgG de coelho marcado com FITC – cat n<sup>o</sup>: 4050-02
- **Anti-coelho APC** – Anticorpo anti-IgG de coelho marcado com APC – cat n<sup>o</sup>: 4050-11

## O) Reagentes Spring Bioscience

\*Spring Bioscience – Pleasanton – California – EUA

- **Streptavidin-peroxidase** – cat n<sup>o</sup>: SB-031EU

## P) Reagentes Thermo scientific

\*Thermo Fisher Scientific Inc – Waltham – Massachusetts – EUA

- **Líquido para crio-congelamento** – Shandon cryomatrix – cat n°: 6769006

## Q) Reagentes União Química

\*União Química Farmacêutica Nacional S/A – Embu-Guaçu – São Paulo – Brasil

- **Ketamina** – cloridrato de cetamina 10% – Licen n°: 5605/MA – Part: 1004906
- **Xilazina** – Calmiun 2% – Licen n°: 7785/MA – Part: 1100723

## R) Reagentes Vetec

\*Vetec química fina Ltda – Duque de Caxias – Rio de Janeiro – Brasil

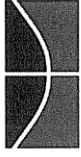
- **Acetona P.A.** –  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$  – cat n°: 187
- **Etanol** – Álcool etílico absoluto P.A.  $(\text{C}_2\text{H}_6\text{O})$  – cat n°: 107
- **Iso-propanol** – Álcool iso-propílico P.A.  $(\text{C}_3\text{H}_8\text{O})$  – cat n°: 139
- **Metanol** – Álcool metílico  $(\text{CH}_4\text{O})$  – cat n°: 102
- **Eosina amarela** – Cl 45380 – cat n°: 205
- **Hematoxilina** – Cl 75290 – cat n°: 630
- **Paraformaldeído** –  $(\text{CH}_2\text{O})_x$  – cat n°: 694
- **Parafina purificada** – cat n°: 1227
- **Xilol** – Xileno  $(\text{C}_8\text{H}_{10})$  – cat n°: 142
- **Vermelho de fenol P.A.** – sulfonaftaleina de fenol – cat n°: 210
- **Fenol P.A.** – Ácido fênico  $(\text{C}_6\text{H}_6\text{O})$  – cat n°: 387

## S) Reagentes White Martins

\* White Martins Gases Industriais S.A. – Rio de Janeiro – Rio de Janeiro – Brasil

- **Dióxido de carbono líquido** –  $\text{CO}_2$  – cat n°: P-4573-A

**ANEXO - COMITÊ**



**Universidade de Brasília**

Instituto de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 11 de fevereiro de 2011.



### DECLARAÇÃO



Declaramos que o projeto intitulado **“INFLUÊNCIA DA FILOSSEPTINA 1, DA PENTOXIFILINA, DA PRAVASTATINA, DA TALIDOMIDA E DA DERMOSSEPTINA 01 SOBRE AS VIAS DE ATIVAÇÃO CELULARES ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NA MALÁRIA EXPERIMENTAL MURINA.”**, UnBDOC nº 43050/2010, sob responsabilidade da Profa. Dra. Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Prof. Antonio Sebben  
Coordenador do CEUA



