

**Universidade de Brasília – UnB**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**DANILO CORAZZA**

**INFLUÊNCIA DA PENTOXIFILINA NA INFECÇÃO PELO**  
***Plasmodium berghei* ANKA EM CAMUNDONGOS**  
**SUSCEPTÍVEIS OU RESISTENTES ÀS FORMAS GRAVES DA**  
**MALÁRIA: ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS**

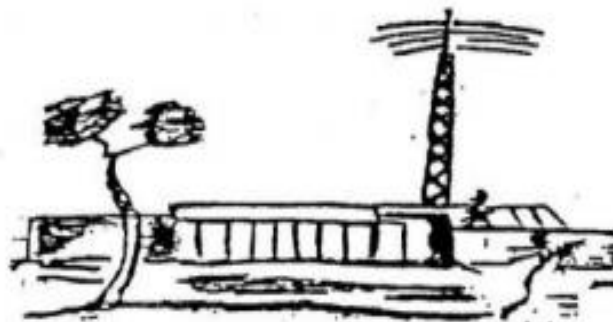
**BRASÍLIA, DF**  
**2015**

**INFLUÊNCIA DA PENTOXIFILINA NA INFECÇÃO PELO  
*Plasmodium berghei* ANKA EM CAMUNDONGOS  
SUSCEPTÍVEIS OU RESISTENTES ÀS FORMAS GRAVES DA  
MALÁRIA: ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS**

**DANILO CORAZZA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

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



Brasília, DF

2015

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de  
Brasília. Acervo 1020537.

Corazza, Danilo.  
C788i      Influência da pentoxifilina na infecção pelo *Plasmodium berghei ANKA* em camundongos susceptíveis ou resistentes às formas graves da malária : aspectos histopatológicos / Danilo Corazza. -- 2015.  
            xxviii, 168 f. : il. ; 30 cm.

            Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2015.  
            Orientação: Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira.  
            Inclui bibliografia.

            1. Malária. 2. Imunologia. 3. Histopatologia. I. Junqueira, Maria Imaculada Muniz Barboza. II. Título.

CDU 616.936

## **COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA**

Danilo Corazza

### **INFLUÊNCIA DA PENTOXIFILINA NA INFECÇÃO PELO *Plasmodium berghei* ANKA EM CAMUNDONGOS SUSCEPTÍVEIS OU RESISTENTES ÀS FORMAS GRAVES DA MALÁRIA: ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

Medicina Tropical: Biologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias

#### **DATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO**

12 de fevereiro de 2015

#### **BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira – Universidade de Brasília

(Presidente)

Prof. Dr. Albino Verçosa Magalhães – Universidade de Brasília

(Banca externa)

Prof. Dr. Joel Paulo Russomano Veiga – Universidade de Brasília

(Banca externa)

Prof. Dr. Cleudson Nery de Castro – Universidade de Brasília

(Suplente)

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Celular, área de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, Brasília-DF e foi realizado com recursos parcialmente providos da Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), processo número: 193.000.021/2012, e com o apoio de bolsa de estudos concedida pela Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES).

*Não importa o quão grande é a ideia, ou quão vasto é o projeto  
Tudo começa do mesmo jeito – com um pequeno momento.  
Shakira Mebarak*

## DEDICATÓRIA

*Aos meus queridos Pais, Heitor e Rubenita, obrigado por cada lição aprendida e por me darem o dom da vida, agradeço todos os dias por ter exemplos como vocês, de humildade e perseverança. Obrigado por permitirem que eu pudesse seguir este caminho de modo integral, e por terem me apoiado em qualquer decisão durante todos esses anos. Obrigado por entender os momentos de ausência para que este trabalho pudesse ser completado. Espero ao final desta vida, ter chegado ao menos em 1/3 do que vocês são, MUITO OBRIGADO!*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus irmãos, Murilo e Luiz Fernando, por me inspirarem todos os dias e me incentivarem em cada passo!

Às minhas cunhadas Ludimila Borba e Yesenia Lisbeth, e a minha sobrinha Anna Beatriz, pelos momentos de alegria e inspiração!

A minha querida mentora e amiga, Dra. Tatiana Karla dos Santos Borges, que me apresentou o vasto mundo da pesquisa e imunologia, e que sempre me ajudou com suas palavras, sendo um exemplo desafiador para ser seguido, me fazendo cada dia superar meus limites e sendo um ponto de referência para cada dúvida que surgiu nesta caminhada. Quero deixar aqui frisado a quão maravilhosa e dedicada você é! Sua inteligência e carisma foram essenciais no início e conclusão deste trabalho!

A querida orientadora Dra. Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira, que me fez trilhar caminhos cada vez mais vastos e ainda mais desafiadores. Você é um ponto de referência para mim, pois a cada dia eu me lembro de suas aulas, e quanta dedicação você colocava em cada momento. Espero um dia conseguir alcançar sua dedicação e responsabilidade, que foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Fabiana Pirani, pelo conhecimento e auxílio nas técnicas histológicas, muito obrigado!

A Prof<sup>a</sup> Dra. Selma Kuckelhaus, pelos momentos de alegria partilhados e auxílio nas técnicas, muito obrigado!

A minha amiga Thayssa Neiva Victor, que me inspira a cada dia ser uma pessoa melhor, obrigado por todos os momentos que passamos juntos, você sempre me incentivou a perseguir meus ideais e me tornar uma pessoa cada vez mais perseverante.



Ao meu querido amigo e ao meu afilhado, Felipe Victor e Noah Victor, por me incentivarem em momentos que eu nem acreditava que fosse capaz de prosseguir, obrigado pelos momentos juntos!

A minha companheira de mestrado e amiga, Mayara Gabriele, posso afirmar que passamos por diversos trabalhos juntos, e diversos momentos de alegria, e também momentos de “quase” desistência, esse mestrado foi uma experiência inesquecível, e afirmo, tenho certeza que enfrentaremos desafios cada vez maiores.

À companheira de caminhada e amiga, Luciana Leite, por me ensinar cada passo do laboratório e a ampliar meu senso de responsabilidade, e me ensinar como lidar com qualquer animal e que independente do que aconteça você deve sempre mostrar sua felicidade, e o quão importante ela é.

À companheira de caminhada e amiga, Daniela Aquino, que me auxiliou no laboratório, me ensinou diversas técnicas, muito obrigado!

Aos amigos, André Cunha e Marcelo Nóvoa, vocês são pessoas maravilhosas e mostraram que os ideais devem ser perseguidos, não importa o quão longe estão, ou o quanto tentaram lhe impedir de conseguir, obrigado pela inspiração.

Aos amigos que fiz durante esta caminhada, Alinne Rapelo, Andreia Cascaes, Carmen Lucia, Graciene Araújo, Helane Ribeiro, Luciana Miranda, Lúcia Martins, Ingrid Gracielle, Juliana Soares, Márcia Rocha, Mariana Atanasio, Mariana Vieira, Marthina Gomes, Rafaela Albuquerque, Roberto Dusi, Paulo Giovanni, Paulo Prado, Priscila Leite, Tércia Louza, Thais Minuzzi, Simone Schmill, obrigado por todos os momentos.

A querida amiga Maria da Glória “Glorinha”, muito obrigado por todos os momentos que passamos juntos, todas as técnicas aprendidas e pelo conhecimento partilhado. Você é um exemplo a ser seguido, tamanha a sua dedicação e responsabilidade.

Aos queridos amigos, Diego Rocha, Júnior Carvalho, Pedro Otávio, Roberta Rocha e Veronica Gandulfo, pelos momentos de alegria partilhados e inspiração durante esta caminhada, e que mesmo com minha ausência continuaram a partilhar do mesmo sentimento.

Às amigas Evelin Oliveira, Evelyn Pereira e Rebeca Pinho, partilhamos muito durante vários anos, e continuaremos assim, mesmo com a distância. Obrigado pelas palavras de apoio!

Aos amigos Felipe Ferreira e Claudia Serra e a pequenina Giovanna Rocha, pelas palavras de apoio e momentos de alegria.

Aos amigos de profissão, Camilla Teixeira, Deborah Lamar, Fernanda Santos, Giovani Briet, Letícia Botelho, Matheus Lenz, Ranna Saraiva, pelos momentos de alegria e trocas profissionais que foram tão importantes para esta conclusão, muito obrigado!

Aos amigos de laboratório, Débora Pereira, Elizabete Abrão, Mariangela Souza, Shirley Claudino, Talyta Grippe, por todas as experiências compartilhadas.

Ao apoio do laboratório de parasitologia e vetores da Universidade de Brasília, e ao professor Dr. Rodrigo Gurgel, muito obrigado pela ajuda!

Chcel by som poďakovať Dadke Radzovej za to, že vážila tak ďalekú cestu. prišla až zo Slovenska aby naučila seba ale aj iných nové veci a skúsenosti. Ďakujem za skvelé zážitky! Si úžasná osoba a raz budeš skvelou doktorkou!

*“Eu gostaria de agradecer a Dadka Radzová que veio de tão longe com o interesse de aprender coisas novas e trocar valiosas experiências. Obrigado por uma grande experiência! Você é uma pessoa incrível, e com certeza será uma grande médica!”*

Я хочу сказать спасибо Анне Гурина, за то, весь путь из России, с таким большим количеством жизни и желание учиться, а также научить, спасибо вам большое за весь опыт! Ты удивительный и счастливый человек, и будет Удивительно, врач, за это я точно!

*“Quero agradecer a Anna Gurina, por ser uma pessoa com tanta vida e com um enorme desejo de aprender e de ensinar, muito obrigado por toda a experiência! Você é incrível, feliz, e vai ser uma médica surpreendente, tenho certeza!”*

Quisiera agradecer a mi amigo Campos Ruiz quien fue responsable por muchos momentos gratos y felicidad en todos estos años, y me hizo ser una mejor persona, muchas gracias Hermano. Este triunfo es tuyo también.

E todos amigos, familiares e professores que contribuíram com este trabalho e com minha formação! Obrigado!

# SUMÁRIO

<b>Lista de abreviaturas</b>	XV
<b>Lista de figuras</b>	XVI
<b>Lista de tabelas</b>	XXIV
<b>Resumo</b>	XXV
<b>Abstract</b>	XXVIII
<b>1. Introdução</b>	1
1.1 Epidemiologia	2
1.2 Ciclo	2
1.3 Imunologia	3
1.4 Pentoxifilina como droga imunomoduladora	5
1.5 Fisiopatologia das alterações no fígado	6
1.6 Fisiopatologia das alterações no pulmão	7
1.7 Fisiopatologia das alterações no cérebro	8
1.8 Modelos experimentais	9
<b>2. Justificativa</b>	11
<b>3. Objetivo</b>	13
<b>4. Metodologia</b>	15
4.1 Inóculo	17
4.2 Tratamento	18
4.3 Coleta do tecido cerebral	18
4.4 Coleta dos órgãos	18
4.5 Processamento histológico	19
4.6 Avaliação histopatológica	19
4.7 Análise estatística	20
<b>5. Resultados</b>	21
<b>5.1 Córtex cerebral</b>	29
5.1.a Avaliação da influência da pentoxifilina sobre o número total de neurônios presentes em 10 campos.	29
5.1.b Avaliação da influência da pentoxifilina sobre a presença de necrose neuronal	33
5.1.c Influência da pentoxifilina sobre a congestão vascular	36
5.1.d Influência da pentoxifilina sobre a aderência de leucócitos	36
5.1.e Influência da pentoxifilina sobre a aderência de eritrócitos	39

<b>5.2 Hipocampo</b>	41
5.2.a Avaliação da influência da pentoxifilina sobre o número total de neurônios presentes em 10 campos.	42
5.2.b Avaliação da influência da pentoxifilina sobre a presença de necrose neuronal	45
5.2.c Influência da pentoxifilina sobre a congestão vascular	48
5.2.d Influência da pentoxifilina sobre a aderência de leucócitos	48
5.2.e Influência da pentoxifilina sobre a aderência de eritrócitos	52
<b>5.3 Núcleos da base</b>	54
5.3.a Avaliação da influência da pentoxifilina sobre o número total de neurônios presentes em 10 campos.	54
5.3.b Avaliação da influência da pentoxifilina sobre a presença de necrose neuronal	57
5.3.c Influência da pentoxifilina sobre a congestão vascular	59
5.3.d Influência da pentoxifilina sobre a aderência de leucócitos	61
5.3.e Influência da pentoxifilina sobre a aderência de eritrócitos	63
<b>5.4 Cerebelo</b>	65
5.4.a Avaliação da influência da pentoxifilina sobre o número total de neurônios presentes em 10 campos.	65
5.4.b Avaliação da influência da pentoxifilina sobre a presença de necrose neuronal	69
5.4.c Influência da pentoxifilina sobre a congestão vascular	71
5.4.d Influência da pentoxifilina sobre a aderência de leucócitos	73
5.4.e Influência da pentoxifilina sobre a aderência de eritrócitos	75
<b>5.5 Fígado</b>	77
<b>5.5.1. Sinusóides</b>	77
5.5.1.a Avaliação da influência da pentoxifilina sobre o número total de células de Kupffer	78
5.5.1.b Avaliação da influência da pentoxifilina no número total de células de Kupffer com pigmento malárico	80
5.5.1.c Avaliação da influência da pentoxifilina no número total de sinusóides hepáticos com pigmento malárico	82
<b>5.5.2. Espaço porta</b>	86
5.5.2.a Avaliação da influência da pentoxifilina na adesão de células mononucleares no endotélio dos vasos do espaço porta	86
5.5.2.b Avaliação da influência da pentoxifilina na adesão entre si de células mononucleares nos vasos do espaço porta	88
5.5.2.c Avaliação da influência da pentoxifilina na quantidade de células mononucleares com pigmento malárico nos vasos do espaço porta	91
<b>5.6 Pulmão</b>	96
5.6.a Avaliação da influência da pentoxifilina na integridade dos alvéolos	96
5.6.b Avaliação da influência da pentoxifilina na congestão vascular	98
5.6.c Avaliação da influência da pentoxifilina no edema intra-septal	100

<b>6. Discussão</b>	108
<b>7. Conclusão</b>	123
<b>8. Referências bibliográficas</b>	127
<b>Apêndice de reagentes</b>	137
<b>Parecer do comitê de ética</b>	139

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>cAMP</b>	– Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
<b>CSP</b>	– Proteína circunsporozoíta
<b>CD36</b>	– Receptor de limpeza ligante do lipídio de densidade baixa
<b>FNT-<math>\alpha</math></b>	– Fator de Necrose Tumoral alfa
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	– Peróxido de hidrogênio
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	– Inibidor dos fatores nucleares - $\kappa$ B
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	– Interferon gamma
<b>ICAM-1</b>	– CD 54 – molécula de adesão intercelular 1
<b>LT<math>\beta</math>R</b>	– Receptor de linfotoxina $\beta$
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	– Fator nuclear $\kappa$ B
<b>NO</b>	– Óxido nítrico
<b>PfEMP1</b>	– Proteína de citoaderência ligado ao gene assexual do <i>Plasmodium</i>
<b>PPAR-<math>\gamma</math></b>	– Receptor ativado de proliferação peroxissomal
<b>PTX</b>	– Pentoxifilina
<b>Ser32</b>	– Serotonina 32
<b>Ser36</b>	– Serotonina 36
<b>STF</b>	– Salina tamponada com fosfato
<b>TSP</b>	– Trombospondina
<b>TNFR</b>	– Receptor do fator de necrose tumoral

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	<b>17</b>
Delineamento experimental.	
<b>Figura 2</b>	<b>18</b>
Cérebro do camundongo, secções.	
<b>Figura 3</b>	<b>23</b>
Análise histopatológica dos cérebros. Neurônios normais e com necrose.	
<b>Figura 4</b>	<b>24</b>
Análise histopatológica dos cérebros. Congestão vascular e adesão de leucócitos e hemácias.	
<b>Figura 5</b>	<b>25</b>
Análise histopatológica do fígado. Vasos do espaço porta, normais e com adesão de células mononucleares.	
<b>Figura 6</b>	<b>26</b>
Análise histopatológica do fígado. Sinusóides hepáticos e células de Kupffer com pigmento malárico.	
<b>Figura 7</b>	<b>27</b>
Análise histopatológica do pulmão. Lesões pulmonares e melhora da lesão.	
<b>Figura 8</b>	<b>28</b>
Análise histopatológica do pulmão. Pulmões normais, com congestão e com edema intra-septal.	
<b>Figura 9</b>	<b>31</b>
Número total de neurônios quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c nos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX).	
<b>Figura 10</b>	<b>32</b>
Número total de neurônios quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c nos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX).	
<b>Figura 11</b>	<b>34</b>
Número total de neurônios com necrose quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c nos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX).	



<b>Figura 12</b>	<b>35</b>
Número total de necrose neuronal quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c nos grupos infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX).	
<b>Figura 13</b>	<b>36</b>
Número de vasos congestionados quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6 e CBA do grupo infectados tratados (Pb + PTX).	
<b>Figura 14</b>	<b>38</b>
Número total de leucócitos aderidos nos vasos do córtex cerebral quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX).	
<b>Figura 15</b>	<b>40</b>
Número total de eritrócitos aderidos nos vasos do córtex cerebral quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX).	
<b>Figura 16</b>	<b>41</b>
Número total de eritrócitos aderidos nos vasos do córtex cerebral quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX). Comparação entre grupos.	
<b>Figura 17</b>	<b>43</b>
Número total de neurônios quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX).	
<b>Figura 18</b>	<b>44</b>
Número total de neurônios quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX). Comparação entre grupos.	
<b>Figura 19</b>	<b>46</b>
Número de neurônios com necrose no hipocampo quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX).	
<b>Figura 20</b>	<b>47</b>

Número de neurônios com necrose quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX). Comparação entre grupos.

**Figura 21** **48**

Número de vasos congestionados quantificados em 10 campos em camundongos CBA controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX).

**Figura 22** **50**

Número de leucócitos aderidos nos vasos do hipocampo quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX).

**Figura 23** **51**

Número de leucócitos aderidos nos vasos do hipocampo quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX). Comparação entre grupos.

**Figura 24** **53**

Número de eritrócitos aderidos nos vasos do hipocampo quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX).

**Figura 25** **54**

Número de eritrócitos aderidos nos vasos do hipocampo quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos infectados (Pb). Comparação entre grupos.

**Figura 26** **56**

Número total de neurônios quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX).

**Figura 27** **57**

Número total de neurônios quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX). Comparação entre os grupos.

**Figura 28** **58**

Número total de neurônios com necrose quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX).

**Figura 29** **59**

Número total de neurônios com necrose contados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX). Comparação entre grupos.

**Figura 30** **60**

Número total de vasos congestionados quantificados em 10 campos em camundongos CBA e BALB/c controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX).

**Figura 31** **61**

Número total de vasos congestionados quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA infectados (Pb). Comparação entre grupos.

**Figura 32** **62**

Número total de leucócitos aderidos nos vasos dos núcleos da base quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX).

**Figura 33** **63**

Número total de leucócitos aderidos nos vasos dos núcleos da base quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA dos grupos infectados (Pb). Comparação entre grupos.

**Figura 34** **64**

Número total de eritrócitos aderidos aos vasos dos núcleos da base quantificados em 10 campos em camundongos CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX).

**Figura 35** **65**

Número total de eritrócitos aderidos aos vasos dos núcleos da base quantificados em 10 campos em camundongos CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX). Comparação entre os grupos.

**Figura 36** **67**

Número total de neurônios quantificados em 10 campos no cerebelo em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX)

**Figura 37** **68**

Número total de neurônios quantificados em 10 campos no cerebelo em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX). Comparação entre os grupos.

**Figura 38** **70**

Número total de neurônios apresentando necrose, quantificados em 10 campos no cerebelo em camundongos C57BL/6, CBA dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX).

**Figura 39** **71**

Número total de neurônios apresentando necrose quantificados em 10 campos no cerebelo em camundongos C57BL/6, CBA dos infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX) (n=5/grupo). Comparação entre grupos.

**Figura 40** **72**

Número total de vasos apresentando congestão vascular, quantificados em 10 campos no cerebelo em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX).

**Figura 41** **73**

Número total de vasos apresentando congestão vascular, quantificados em 10 campos no cerebelo em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX). Comparação entre os grupos.

**Figura 42** **74**

Número total de leucócitos aderidos ao endotélio dos vasos do cerebelo, quantificados em 10 campos no cerebelo, em camundongos C57BL/6, CBA e dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX).

**Figura 43** **75**

Número total de leucócitos aderidos ao endotélio dos vasos do cerebelo, quantificados em 10 campos no cerebelo em camundongos C57BL/6, CBA e dos grupos infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX). Comparação entre grupos.

**Figura 44** **76**

Número total de eritrócitos aderidos ao endotélio dos vasos do cerebelo, quantificados em 10 campos no cerebelo em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX).

**Figura 45** **77**

Número total de eritrócitos aderidos ao endotélio vascular, quantificados em 10 campos no cerebelo em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos infectados e tratados com PTX (Pb + PTX). Comparação entre grupos.

**Figura 46** **79**

Número total de células de Kupffer quantificados em 10 campos no fígado de camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX).

**Figura 47** **80**

Número total de células de Kupffer quantificados em 10 campos no fígado de camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX).

**Figura 48** **81**

Número total de células de Kupffer com pigmento malárico quantificados em 10 campos no fígado de camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX).

**Figura 49** **82**

Número total de células de Kupffer com pigmento malárico quantificados em 10 campos no fígado em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX). Comparação entre grupos.

**Figura 50** **83**

Número total de sinusóides hepáticos com pigmento malárico quantificados em 10 campos no fígado de camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX).

**Figura 51** **84**

Número total de sinusóides com pigmento malárico quantificados em 10 campos no fígado em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX). Comparação entre grupos.

**Figura 52** **87**

Número de células mononucleares aderidas ao endotélio dos vasos do espaço porta quantificados em 10 campos no fígado de camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c nos grupos Controle, tratados (PTX), infectados (Pb) e infectados e tratados (Pb + PTX).

**Figura 53** **88**

Número de células mononucleares aderidas ao endotélio dos vasos do espaço porta quantificados em 10 campos no fígado de camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c nos grupos infectados (Pb) e infectados e tratados (Pb + PTX). Comparação entre grupos.

**Figura 54** **90**

Células mononucleares aderidas entre si nos vasos do espaço porta quantificados em 10 campos no fígado de camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c nos grupos Controle, tratados (PTX), infectados (Pb) e infectados e tratados (Pb + PTX).

**Figura 55** **91**

Células mononucleares aderidas entre si nos vasos do espaço porta quantificados em 10 campos no fígado de camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c nos grupos infectados (Pb) e infectados e tratados (Pb + PTX). Comparação entre grupos.

**Figura 56** **92**

Número de células mononucleares com pigmento malárico nos vasos do espaço porta quantificados em 10 campos no fígado de camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c nos grupos infectados (Pb) e infectados e tratados (Pb + PTX).

**Figura 57** **93**

Número de células mononucleares com pigmento malárico nos vasos do espaço porta quantificados em 10 campos no fígado de camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c nos grupos infectados (Pb) e infectados e tratados (Pb + PTX). Comparação entre grupos.

**Figura 58** **97**

Lesão alveolar focal quantificadas em 10 campos nos pulmões de camundongos C57BL/6, CBA, BALB/c nos grupos Controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados pelo plasmódio (Pb), infectados e tratados (Pb + PTX).

**Figura 59** **98**

Lesão alveolar focal quantificadas em 10 campos nos pulmões de camundongos C57BL/6, CBA, BALB/c nos grupos infectados pelo plasmódio (Pb). Comparação entre grupos.

**Figura 60** **99**

Congestão vascular quantificadas em 10 campos nos pulmões de camundongos C57BL/6, CBA, BALB/c nos grupos Controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados pelo plasmódio (Pb), infectados e tratados (Pb + PTX).

**Figura 61** **100**

Congestão vascular quantificadas em 10 campos nos pulmões de camundongos C57BL/6, CBA, BALB/c nos grupos Controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados pelo plasmódio (Pb), infectados e tratados (Pb + PTX). Comparação entre grupos

**Figura 62**

**101**

Número de septos apresentando edema intra-septal, quantificadas em 10 campos, nos pulmões de camundongos C57BL/6, CBA, BALB/c nos grupos Controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados pelo plasmódio (Pb), infectados e tratados (Pb + PTX).

**Figura 63**

**102**

Número de septos apresentando edema intra-septal, quantificadas em 10 campos nos pulmões de camundongos C57BL/6, CBA, BALB/c nos grupos Controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados pelo plasmódio (Pb), infectados e tratados (Pb + PTX). Comparação entre grupos.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	<b>10</b>
Manifestações da malária grave segundo o modelo experimental.	
<b>Tabela 2</b>	<b>85</b>
Aspectos histopatológicos nos modelos e grupos nos sinusóides hepáticos.	
<b>Tabela 3</b>	<b>95</b>
Aspectos histopatológicos nos modelos e grupos nos vasos do espaço porta.	
<b>Tabela 4</b>	<b>103</b>
Ação da PTX nos aspectos histopatológicos do córtex cerebral nos animais infectados.	
<b>Tabela 5</b>	<b>103</b>
Ação da PTX nos aspectos histopatológicos do hipocampo nos animais infectados.	
<b>Tabela 6</b>	<b>104</b>
Ação da PTX nos aspectos histopatológicos dos núcleos da base nos animais infectados.	
<b>Tabela 7</b>	<b>104</b>
Ação da PTX nos aspectos histopatológicos do cerebelo nos animais infectados.	
<b>Tabela 8</b>	<b>105</b>
Ação da PTX nos aspectos histopatológicos dos sinusóides hepáticos nos animais infectados.	
<b>Tabela 9</b>	<b>106</b>
Ação da PTX nos aspectos histopatológicos dos vasos do espaço porta nos animais infectados.	
<b>Tabela 10</b>	<b>107</b>
Ação da PTX nos aspectos histopatológicos do pulmão nos animais infectados.	



## **RESUMO**

A malária ainda é um problema grave para a saúde pública mundial, com bilhões de pessoas vivendo em áreas de risco de infecção, e milhões de pessoas acometidos pela doença, levando a cerca de quase um milhão de mortes anualmente. É uma doença febril aguda e nas formas graves pode apresentar prostração, alteração do estado de consciência, convulsões e edema pulmonar. As manifestações patológicas como o paroxismo febril, malária cerebral e choque, são decorrentes da resposta inflamatória exacerbada, com consequente aumento da adesão de células e o sequestro de eritrócitos principalmente no endotélio das vênulas pós-capilar. A pentoxifilina (PTX) é uma droga com capacidade imunomoduladora, regulando a produção de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral (FNT) e com potencial uso para prevenir as formas graves da malária por diminuir a produção do FNT. Este trabalho avaliou a influência da PTX sobre as alterações histopatológicas do cérebro, fígado e pulmão em camundongos susceptíveis ou não as formas graves da malária. Foram estudados camundongos machos com 8 semanas de idade das linhagens C57BL/6, CBA e BALB/c compondo quatro grupos, sendo que dois grupos foram infectados com  $10^6$  eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA, tratados a partir do terceiro dia após a infecção, com 8mg/kg/dia de PTX e o outro grupo tratado com NaCl 0,9%. Outros dois grupos não foram infectados porém, seguiram o mesmo tratamento com PTX e NaCl 0,9%. No sexto dia da infecção os camundongos foram sacrificados e após perfusão cardíaca, foram retirados os órgãos (cérebro, fígado e pulmão), e procedido o processamento histológico. As lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) e avaliadas em microscopia óptica. Observamos que a PTX foi capaz de diminuir a necrose de neurônios nos modelos CBA e BALB/c, porém, o contrário foi observado no modelo C57BL/6, onde a droga aumentou a necrose de neurônios no cérebro. Observamos também que no córtex cerebral, a PTX aumentou a congestão vascular no modelo C57BL/6, mas diminuiu a congestão vascular nos camundongos CBA e BALB/c. No fígado dos camundongos C57BL/6 e BALB/c dos animais infectados e tratados com a PTX observamos menor número de células de Kupffer com pigmento malárico. No pulmão dos camundongos C57BL/6 observamos aumento da permeabilidade da membrana alvéolo-capilar, que também foi observada nos camundongos CBA e no BALB/c após infecção pelo plasmódio. Contudo, após a administração da PTX, houve redução na

congestão vascular. Nossos dados sugerem que as três linhagens de camundongos possuem mecanismos diferentes de resposta em cada órgão, evidenciando a heterogeneidade da influência da droga em camundongos com diferentes bases genéticas, e evidenciando a necessidade de melhor esclarecimento das vias pelas quais a droga age em cada órgão.

**ABSTRACT**

XXVIII

Malaria is still a major problem for global public health, with billions of people in contamination risk areas, and millions affected by the disease, leading to around nearly one million deaths annually. It is an acute febrile illness and in severe forms can present prostration, altered state of consciousness, seizures and pulmonary edema. Pathological manifestations, as febrile paroxysm, cerebral malaria and shock, are due to the increased inflammatory response, with consequent increase in cell adhesion and sequestration of erythrocytes mainly in the endothelium of post-capillary venules. Pentoxifylline (PTX) is a drug with immunomodulatory capacity, regulating the production of inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF), and with a potential use to prevent severe forms of malaria by reducing the production of TNF. This study evaluated the influence of PTX on the histopathological changes in the brain, liver and lung in mice susceptible or not to severe forms of malaria. C57BL/6, CBA and BALB/c male mice (8 weeks old) were studied. They comprised four groups, in which two were infected with  $10^6$  *Plasmodium berghei* ANKA parasitized erythrocytes and treated with PTX (8 mg/kg/day) or 0.9% NaCl from the third day after infection onward. The two other remaining groups were not infected, but followed the same treatment, with PTX or 0.9% NaCl. On the sixth day after infection, mice were sacrificed and underwent to a cardiac perfusion, the organs were removed (brain, liver and lung) and carried to a histological processing. The slides were stained with hematoxylin-eosin (HE) and evaluated by light microscopy. We observed that the PTX was able to decrease neuronal necrosis in CBA and BALB/c mice. However, the opposite was observed in C57BL/6 mice, in which PTX increased the neuronal necrosis in brain. We also observed that in the cerebral cortex, PTX increased vascular congestion in C57BL/6 model, but decreased vascular congestion in CBA and BALB/c mice. In the liver of the C57BL/6 and BALB/c mice of infected animals that were treated with PTX, it was observed fewer Kupffer cells showing malaria pigment. In lungs of C57BL/6 mice, there was an increase in the permeability of the alveolar-capillary membrane, which was also observed in CBA mice after *Plasmodium* infection. However, after treatment with PTX, there was a reduction in vascular congestion. Our data suggest that the three strains of mice have different mechanisms of response in each organ, showing the heterogeneity of drug influence, and highlighting the need to better

understanding of the ways by which the drug acts in each organ from each of these experimental malaria models.

## **INTRODUÇÃO**

## 1.1 Epidemiologia

Apesar da malária ser intensamente estudada, ainda cerca de 3,3 bilhões de pessoas correm o risco de contrair a doença, ela ocasiona aproximadamente 250 milhões de casos da doença e quase um milhão de mortes por ano (WHO 2011, WHO 2014). A malária é causada pelo protozoário *Plasmodium*, que é transmitido pela picada de mosquitos infectados do gênero *Anopheles*. Os agentes etiológicos que causam doença no ser humano são de cinco espécies de *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. Há um reconhecimento crescente no Sudeste da Ásia de transmissão zoonótica do *P. knowlesi* em áreas específicas. O *P. falciparum* causa o maior número de óbitos, enquanto *P. vivax* possui a maior distribuição geográfica (WHO 2000).

Segundo o relatório mundial de malária publicado pela OMS (WHO, 2013), no Brasil cerca de 4% da população está em alto risco de contrair malária, e aproximadamente 17% das infecções são pelo *P. falciparum*, que ocorrem principalmente na região Amazônica brasileira, onde condições climáticas e ambientais propiciam a proliferação do vetor (Tauil et al. 1985).

## 1.2 Ciclo

No corpo humano, após a picada do mosquito, os esporozoítos entram na circulação sanguínea, e em torno de 30 a 60 min alcançam o fígado. Ao chegar no órgão, as moléculas de adesão da proteína circunsporozoíta (CSP) e a trombospondina (TSP) irão mediar sua ligação em moléculas sulfatadas dos hepatócitos, e conseqüentemente se procederá a invasão da célula e início da esquizogonia hepática. Após a primeira esquizogonia, os merozoítos serão formados e entrarão na corrente sanguínea (Miller et al. 2002; WHO 2000). Entretanto, como o número de hepatócitos destruídos nesta fase é relativamente pequeno, nesta fase da esquizogonia hepática não há expressão clínico-patológica da doença.

No sangue, os merozoítos irão penetrar nos eritrócitos através da ligação em receptores. Os plasmódios *vivax* e *knowlesi* ligam-se ao antígeno Duffy, já o *P. falciparum* liga-se a receptores siálicos, como a glicoforina A. Porém o *P. falciparum* e *P. knowlesi* não utilizam exclusivamente os receptores citados acima. Diferentemente do *P. vivax* que utiliza exclusivamente os receptores Duffy, eles podem utilizar outros receptores para penetrar no eritrócito, como a



glicoforina B. Nos eritrócitos, eles iniciarão outro processo de esquizogonia, que ao seu término rompe o eritrócito liberando os merozoítos no sangue, que penetrarão em outros eritrócitos prosseguindo o ciclo de vida do parasito. Geralmente é nesta fase que ocorre a expressão clínica da doença, como a febre, que é determinada pela ação de citocinas pirógenas, como o fator de necrose tumoral (FNT) ou a interleucina 1 (IL-1). Durante este ciclo, alguns parasitos evoluem para gametócitos, iniciando a fase sexuada do ciclo do protozoário (Chitnis 2001; Dvorak et al. 1975; Miller 1977; Miller et al. 2002), e serão transmitidos ao mosquito quando do repasto sanguíneo.

### **1.3 Imunologia**

As citocinas inflamatórias exercem um papel importante na infecção, já que podem tanto amenizar quanto agravar a doença (Mitchell et al. 2005; Muniz-Junqueira & Tosta 2007; Torre, Speranza & Martegani 2002). Citocinas inflamatórias, como o FNT, o interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), as interleucinas-12 e 18, e citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e o fator de transformação do crescimento (TGF- $\beta$ ), estão relacionadas com o desenvolvimento da doença e em dependendo das concentrações, podem estar ligadas às formas graves, como a malária cerebral (Ângulo et al. 2002; Mitchell et al. 2005; Torre, Speranza & Martegani 2002).

No início da infecção malárica, os macrófagos irão produzir e secretar IL-12 e 18, que ao serem produzidas, estimularão as células NK e linfócitos T CD8 a produzirem IFN- $\gamma$ . Estas mesmas células podem produzir também o FNT- $\alpha$ , que conjuntamente com o IFN- $\gamma$ , contribuirá no processo de contenção da infecção pelo plasmódio (Torre, Speranza & Martegani 2002). Já na malária grave ocorre uma produção exagerada e persistente do FNT- $\alpha$  e uma redução da IL-10 e TGF- $\beta$ , sendo que a produção deste último está associada com redução da febre (Doodoo et al. 2002).

A ativação da via NF- $\kappa$ B estimula a produção de FNT- $\alpha$ , e está associada com a morte celular programada (apoptose), adesão celular, proliferação, resposta imunitária inata e adaptativa, inflamação e resposta ao estresse celular (O'dea & Hoffmann 2010; Perkins 2007; Yao, Xing & Boyce 2009). O FNT- $\alpha$  ativa a via canônica ou clássica do NF- $\kappa$ B. Esse processo é caracterizado pela

fosforilação rápida do I $\kappa$ B $\alpha$  na Ser32 e Ser36 e uma degradação posterior induzida da ubiquitina pelo proteassoma 26S (Perkins, 2007). A inativação dessa via poderia reduzir efeitos dos processos inflamatórios (Zingarelli, Sheehan & Wong 2003), amenizando a sintomatologia da malária grave.

Existem muitas vias e citocinas associadas com a inflamação e formação do complexo inflamassoma, eicosanoides, PPAR- $\gamma$ , NF- $\kappa$ B. A via dos eicosanoides pode induzir a produção de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e pode estimular tanto resposta pró-inflamatória quanto anti-inflamatória (Okwan-Duodu et al. 2013; Qian et al. 2013), sendo assim um excelente alvo para fármacos imunomoduladores.

O sistema nervoso central (SNC) é protegido pela barreira hematoencefálica e apresenta reatividade inflamatória limitada (Queiroz, Teixeira & Teixeira 2008). Porém, nos casos de malária cerebral, com o processo de sequestro de eritrócitos parasitados na microvasculatura cerebral, o sistema nervoso central fica susceptível à lesão, podendo apresentar danos neurológicos reversíveis ou permanentes (Medana et al. 2002). Na malária cerebral, a hiperativação do endotélio vascular cerebral é reflexo da produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias.

Existem ainda controvérsias na literatura sobre as semelhanças e diferenças nos processos histopatológicos apresentados pelos seres humanos e em modelos murinos da malária. Alguns artigos sugerem a existências de alterações histopatológicas semelhantes, com formação das rosetas, hemorragia, o processo de sequestro de eritrócitos parasitados no endotélio vascular em associação com as citocinas inflamatórias (Nacer et al. 2012), entretanto, isto não foi observado por outros autores. Sendo assim é importante melhor esclarecer as alterações histopatológicas presentes nos modelos murinos da malária, para propiciar a utilização do modelo mais adequado na procura de medidas terapêuticas alternativas para prevenir as formas graves da malária.

Apesar de muito estudado, o entendimento definitivo dos mecanismos que promovem a patogênese da doença está longe de ser alcançado totalmente (Muniz-Junqueira 2007; Muniz-Junqueira & Tosta 2007).

## 1.4 Pentoxifilina como droga imunomoduladora

O desenvolvimento de novas drogas para o combate da malária está sendo cada vez mais procurado, pois de acordo com os relatórios anuais da OMS, existe uma preocupação crescente com os casos que surgiram de parasitos resistentes aos derivados da artemisinina, que são os mais potentes microbicidas atualmente disponíveis para o tratamento da malária. Em 2000, parasitos resistentes ao medicamento surgiram na zona da fronteira do Camboja com a Tailândia e tem se espalhado para outras áreas, inclusive para as Américas (WHO 2012).

A utilização de drogas imunomoduladores como terapia complementar aos antiparasitários pode ser uma alternativa para diminuir a gravidade da doença. Dentre as drogas disponíveis, a pentoxifilina ainda precisa uma melhor avaliação, uma vez que ela pode: Modular a produção exacerbada do fator de necrose tumoral, pode diminuir o sequestro de eritrócitos parasitados pela redução da formação de rosetas, e prevenir as lesões neuronais (Borges, 2013; Muniz-Junqueira, 2007; Muniz-Junqueira & Tosta 2007). Lembrando que, as drogas imunomoduladores devem ser iniciadas precocemente para evitar que ocorram as lesões causadas pelo efeito excessivo de citocinas inflamatórias determinantes da lesão.

A PTX é uma droga inibidora da fosfodiesterase, agindo no interior da célula e aumentando o nível de cAMP e conseqüentemente inibindo a entrada de  $Ca^{2+}$ , que por sua vez é um importante fator na sinalização do macrófago, e também pode interferir na via do NF- $\kappa$ B, pois regula a produção de várias citocinas inflamatórias (FNT, IL-6, IFN- $\gamma$ ), bem como a apoptose, e também, o aumento de citocinas anti-inflamatórias (IL-10), indicando a sua interferência no ramo Ta1 das subpopulações de linfócitos (Borges 2006; Fernandes et al. 2008; González-Espinoza et al. 2012; Sunil et al. 2014). Além destes efeitos, ela possui uma atividade antitrombótica, reduzindo a viscosidade do sangue (Borges 2006). Portanto, a PTX pode ser uma alternativa como adjuvante no tratamento da malária grave, visto que o agravamento é decorrente majoritariamente do excesso de produção de citocinas inflamatórias.

A ação da PTX na malária cerebral ainda está pouco esclarecida, pois em estudos conduzidos em seres humanos que desenvolveram a doença, em

alguns houve melhora de parâmetros clínicos, com redução do tempo de coma e maior sobrevivência (Das et al. 2003), porém, outros estudos (Lell et al. 2010) não mostraram influência na evolução da doença. Já estudos realizados em pacientes que desenvolveram outras formas graves da malária também não foi observado ações da droga sobre a citocina inflamatória FNT ou algum outro fator que chamasse a atenção dos pesquisadores, contudo os autores citam que talvez não ter chegado a algum resultado conclusivo deve-se ao fato de o tratamento ter sido concomitante com potentes antimaláricos, podendo estes terem reduzido ou tornado não visível os efeitos da PTX (Hemmer et al. 1997; Looareesuwan et al. 1998).

Entretanto, a maioria destes estudos foram realizados com amostra pequena de pacientes, alguns com formas clínicas diferentes e pouco caracterizadas e doses diferentes do medicamento, indicando a necessidade ainda de uma melhor caracterização da ação da droga na malária.

Na patogênese da malária há envolvimento de múltiplos órgãos, como fígado, pulmão, cérebro, etc. e entre os fatores que poderiam desencadear esta gama de acometimento de vários órgãos são: fatores genéticos, situação social, nutrição do paciente, local de residência, e se é primo infectado” (Gazzinelli et al. 2014).

## **1.5 Fisiopatologia das alterações no fígado**

Após a inoculação dos esporozoítos pela picada do *Anopheles*, o parasito migrará para o fígado, onde irá infectar os hepatócitos e dar início à esquizogonia hepática. Nessa fase do ciclo do parasito há a liberação de 10.000 a 50.000 merozoítos de cada hepatócito infectado, e estes irão iniciar o ciclo eritrocitário (Miller et al. 2014). Durante esta fase do desenvolvimento intra-hepático, o paciente não apresenta nenhuma manifestação clínica, pois o número de hepatócitos infectados é muito pequeno. As manifestações clínicas relacionadas ao comprometimento hepático somente ocorrerão durante a fase eritrocitária, resultante da ruptura das hemácias e liberação dos parasitos e de restos de hemozoína, que serão fagocitados pelas células de Kupffer, como também fagocitarão os parasitos circulantes. O comprometimento hepático se manifesta por alterações de marcadores bioquímicos e hepatomegalia moderada e dolorosa.

Entre as alterações clínicas e fisiopatológicas relacionadas ao fígado poderão ocorrer: icterícia, hipoglicemia acentuada, encefalopatia hepática, hepatomegalia, disfunção metabólica, hepatite malárica e perda da função do órgão (Baheti, Laddha & Gehlot 2003; Bhalla, Suri & Singh 2006; WHO 2014).

A icterícia é comum na forma grave da doença, e é resultante de vários fatores como a hemólise, ruptura dos hepatócitos e diminuição no fluxo da biliar (Baheti, Laddha & Gehlot 2003; Bhalla, Suri & Singh 2006). Prejuízo da função hepática também pode estar associada com o uso de antimaláricos.

A encefalopatia e a hepatite malárica acontecem devido a diversos fatores. Após o fim do primeiro ciclo eritrocitário, há um aumento de parasitos circulantes, e estes irão infectar novas células. Hemácias infectadas chegam a consumir cerca de 5 vezes mais glicose que as normais, logo há uma exigência de maior produção de energia, além de que a febre também será outro fator que aumentará o consumo de glicose (Mackintosh, Beeson & Marsh 2004).

## **1.6 Fisiopatologia das alterações no pulmão**

Durante a infecção pelo plasmódio, alguns achados clínicos apontam para o comprometimento pulmonar, como algumas manifestações respiratórias, como a tosse, e para formas graves da infecção, como o edema pulmonar e a síndrome da insuficiência respiratória, também referida como síndrome da angústia respiratória (Boulos, Costa & Tosta 1993).

Apesar de manifestações graves como o edema e a insuficiência respiratória estarem bem descritos clinicamente, o que desencadeia essa resposta ainda não está totalmente esclarecido. Vários fatores podem levar ao grave acometimento do pulmão, como: O sequestro na microvasculatura, hipóxia, acidose láctica e aumento na permeabilidade do epitélio. O sequestro tem sido apontado como um dos eventos desencadeadores para as outras agressões. A adesão de hemácias infectadas e leucócitos levarão ao aumento na produção de citocinas no local, podendo ocasionar injúria da unidade alvéolo-capilar. Esse dano ocasionará alterações nos pneumócitos do tipo 1, que revestem cerca de 95% da superfície alveolar, e consequentemente levar aos outros fatores (hipóxia, acidose láctica e aumento da permeabilidade do epitélio) (Boulos, Costa & Tosta 1993; Gomes et al. 2011; Lovegrove et al. 2008).

## 1.7 Fisiopatologia das alterações no cérebro

O acometimento cerebral é a forma mais grave da malária, pode atingir cerca de 1 a 15% dos infectados em áreas endêmicas, e representa aproximadamente 80% das causas de morte (Lou, Lucas & Grau 2001).

A patogênese da malária cerebral ainda possui pontos desconhecidos, porém, o excesso de produção de citocinas e constante inflamação nos microvasos do tecido cerebral são fatores já bem descritos (Borges 2006; Borges 2013; Torre, Esperanza & Martegani 2002). E também os processos mecânicos, como o mecanismo de sequestro de hemácias e obstrução dos vasos, levariam a hipóxia e perda da função do tecido, além do risco de romper as células endoteliais e levar a hemorragia em anel (Gomes et al. 2011). As complicações neurológicas, como convulsões, ataxia e coma, geralmente ocorrem de forma abrupta nas crianças e, nos adultos, tardiamente, com comprometimento múltiplo dos órgãos (Wasay et al. 2010).

A malária cerebral inicia-se pelo sequestro dos eritrócitos parasitados pelo *P. falciparum*, uma vez que este apresenta uma molécula a Proteína de Membrana do Eritrócito 1 do *Plasmodium falciparum* (PfEMP1) que se liga às moléculas de adesão presentes nas células endoteliais dos vasos. Também existe uma associação com os receptores do FNT e da linfotóxina, sendo no caso do FNT, o Receptor do fator de necrose tumoral-2 (TNFR2) e no caso da linfotóxina o Receptor de linfotóxina  $\beta$  (LT $\beta$ R), já que em experimentos a deficiência destes foi associada com o não desenvolvimento do quadro grave da doença (Togbe et al. 2008). Quando as hemácias se aderem, elas são reconhecidas pelos leucócitos que estão no vaso, uma vez que isto aconteça, os leucócitos produzem citocinas inflamatórias que estimulam ainda mais a expressão de adesinas no endotélio vascular. Por sua vez, as adesinas podem aderir não só hemácias infectadas, mas também leucócitos e plaquetas. Essa resposta localizada ainda possibilita a produção de radicais de nitrogênio e oxigênio, que apesar de terem um efeito microbicida, se produzidos em quantidades maiores também se envolvem nos mecanismos que agravam a doença (Clark & Cowden 2003; Medana et al. 2001; Randall & Engwerda 2010). Esses radicais em conjunto com citocinas inflamatórias, como o FNT e a

linfotóxina, estimulam ainda mais o processo de sequestro, promovendo assim a aderência e oclusão dos vasos (Watters & O'Connor 2011). Essas alterações podem levar a hipóxia, hemorragias, e os danos podem evoluir significativamente, levando o paciente a morte.

## **1.8 Modelos experimentais**

Muitos estudos sobre a malária ainda são provenientes de avaliação em modelos experimentais ou biópsias *post-mortem*. Recentemente foi levantado novamente o questionamento se é ou não válido o uso de modelos experimentais para tentar entender a complexa fisiopatogenia da doença nos seres humanos (Zuzarte-Luis, Mota & Vigário 2014), e foi considerado que o vasto número de cepas de plasmódio e manifestações clínicas em camundongos são benéficos para entender as manifestações diversas em seres humanos.

Os camundongos CBA e C57BL/6 são animais que quando infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA, morrem entre o 6º e 8º dia após infecção, com parasitemia baixa e sinais neurológicos como ataxia e convulsões. A linhagem BALB/c não apresenta a doença cerebral, contudo, sobrevive em torno de três semanas e morre com parasitemia alta e profunda anemia (Sousa & Riley 2002). A linhagem C57BL/6 é a que apresenta várias formas graves da doença após a infecção pelo *P. berghei* ANKA. Um resumo das manifestações clínicas dessas três linhagens está na tabela 1.

**Tabela 1: Manifestações da malária grave segundo o modelo experimental**

<i>Modelo Experimental</i>	Manifestações após a infecção pelo <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	Referências
 C57BL/6	Malária cerebral Comprometimento placentário Comprometimento agudo do pulmão Síndrome da Angústia Respiratória Comprometimento agudo do rim Comprometimento agudo do fígado	Zuzarte-Luis (2014)
 CBA	Malária cerebral Lesão Pulmonar	Grau (1989; 2001) Carvalho (2000)
 BALB/c	Anemia grave Comprometimento agudo do rim Comprometimento placentário Lesão pulmonar	Zuzarte-Luis (2014) Lovegrove (2008)



## **JUSTIFICATIVA**

Vários fatores estão envolvidos no desencadeamento da doença nas formas graves da malária. Embora muito estudado, ainda é necessário um melhor esclarecimento da patogênese e alterações histopatológicas da doença. Há ainda grande controvérsia na literatura sobre a utilização de modelos animais para o entendimento e avaliação do efeito de drogas para utilização na malária humana, devido a diferenças nas expressões histopatológicas observadas entre nos animais e estudos de material de necropsia de seres humanos. Por isso é importante uma melhor definição das alterações histopatológicas observadas em modelos experimentais que apresentam a malária cerebral ou não, para que modelos mais representativos possam ser definidos para utilização em pesquisas científicas.

Desde o ano de 2000 tem havido uma crescente detecção de resistência aos antiparasitários atualmente disponíveis para o tratamento da malária, necessitando assim um maior investimento na procura de novos fármacos (WHO 2012), como também na busca de novas maneiras de diminuir a grande morbimortalidade pela doença, que ainda é inaceitavelmente elevada, principalmente entre crianças, pela grande prevalência da doença. Mesmo com tratamento adequado, os pacientes podem apresentar desequilíbrio do sistema imunitário causando a morte, portanto, é importante analisar a abordagem terapêutica pela utilização de drogas imunomoduladoras. O desequilíbrio do sistema imunitário poderia ser amenizado pela utilização de drogas com ação imunomoduladora. Várias vias e citocinas estão diretamente envolvidas nas respostas inflamatórias, a imunomodulação destas vias e citocinas poderia ser importante para evitar resposta exagerada que levaria ao agravamento da malária (Torre, Speranza & Martegani 2002). O estudo da interferência da pentoxifilina, que é imunomoduladora, na doença em modelos experimentais pode também contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na imunopatogênese das formas graves da malária.

## **OBJETIVOS**

- **Objetivo Geral**

Este projeto tem como objetivo avaliar em camundongos suscetíveis ou não à malária grave a influência do tratamento com a pentoxifilina sobre as alterações histopatológicas do fígado, pulmão e cérebro.

- **Objetivo Específico**

1. Analisar alterações histopatológicas no tecido cerebral de três linhagens de camundongos (C57BL/6, CBA, BALB/c) no processo infeccioso e inflamatório e se há alteração pela administração da pentoxifilina.

2. Analisar alterações histopatológicas no fígado de três linhagens de camundongos (C57BL/6, CBA, BALB/c) no processo infeccioso e inflamatório e se há alteração pela administração da pentoxifilina.

3. Analisar alterações histopatológicas no pulmão de três linhagens de camundongos (C57BL/6, CBA, BALB/c) no processo infeccioso e inflamatório e se há alteração pela administração da pentoxifilina.

## **METODOLOGIA**

## Grupos de estudo

Para este estudo foram utilizados camundongos *Mus musculus* de 8 semanas de idade, machos, das linhagens CBA, C57BL/6 e BALB/c, obtidos do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB.

A dose administrada de PTX (8 mg/kg/dia) foi seguida de acordo com a padronização realizada por Paula Jr (2003), onde o autor observou que a administração de 8 mg/kg/dia era uma dose ideal para a ação moduladora da droga.

Os animais foram separados em 20 para cada linhagem e foram distribuídos conforme infecção e tratamento nos seguintes grupos:

**Grupo 1 - Controle:** No qual 5 camundongos/grupo das três linhagens não infectados receberam 200 µL de salina tamponada com fosfato (STF), pH 7,2, por via intraperitoneal, no primeiro dia do experimento e foram tratados a partir do terceiro até o sexto dia de experimentação com NaCl 0,9%, pH 7,2, por via intramuscular, de 12 em 12 horas.

**Grupo 2 - Controle + Pentoxifilina (PTX):** No qual 5 camundongos de cada linhagem não infectados receberam, por via intraperitoneal, 200µL de STF, pH 7,2, no primeiro dia e foram tratados, por via intramuscular, com 8 mg/kg/dia de pentoxifilina (Trental, lote 106708, Laboratório Aventis Pharma LTDA) diluída em 50µL de NaCl 0,9%, pH 7,2, de 12 em 12 horas, a partir do terceiro até o sexto dia da infecção.

**Grupo 3: Infectado (Pb):** No qual 5 camundongos de cada linhagem foram infectados por via intraperitoneal com  $10^6$  eritrócitos parasitados pelo *Plasmodium berghei* ANKA, suspensos em 200µL de STF, pH 7,2 e tratados com 50µL de NaCl 0,9%, pH 7,2, por via intramuscular, a partir do terceiro até o sexto dia da infecção, de 12 em 12 horas.

**Grupo 4: Infectado + Pentoxifilina (Pb + PTX):** no qual 5 camundongos de cada linhagem foram infectados por via intraperitoneal com  $10^6$  eritrócitos parasitados pelo *Plasmodium berghei* ANKA suspensos em 200µL de STF, pH 7,2, e tratados com 8mg/kg/dia de pentoxifilina (Trental, lote 106708, Laboratório Aventis Pharma LTDA) diluída em 50µL de NaCl 0,9%, pH 7,2 por via intramuscular, de 12 em 12 horas, a partir do terceiro até o sexto dia da infecção.

O delineamento do experimento está mostrado no organograma a seguir.

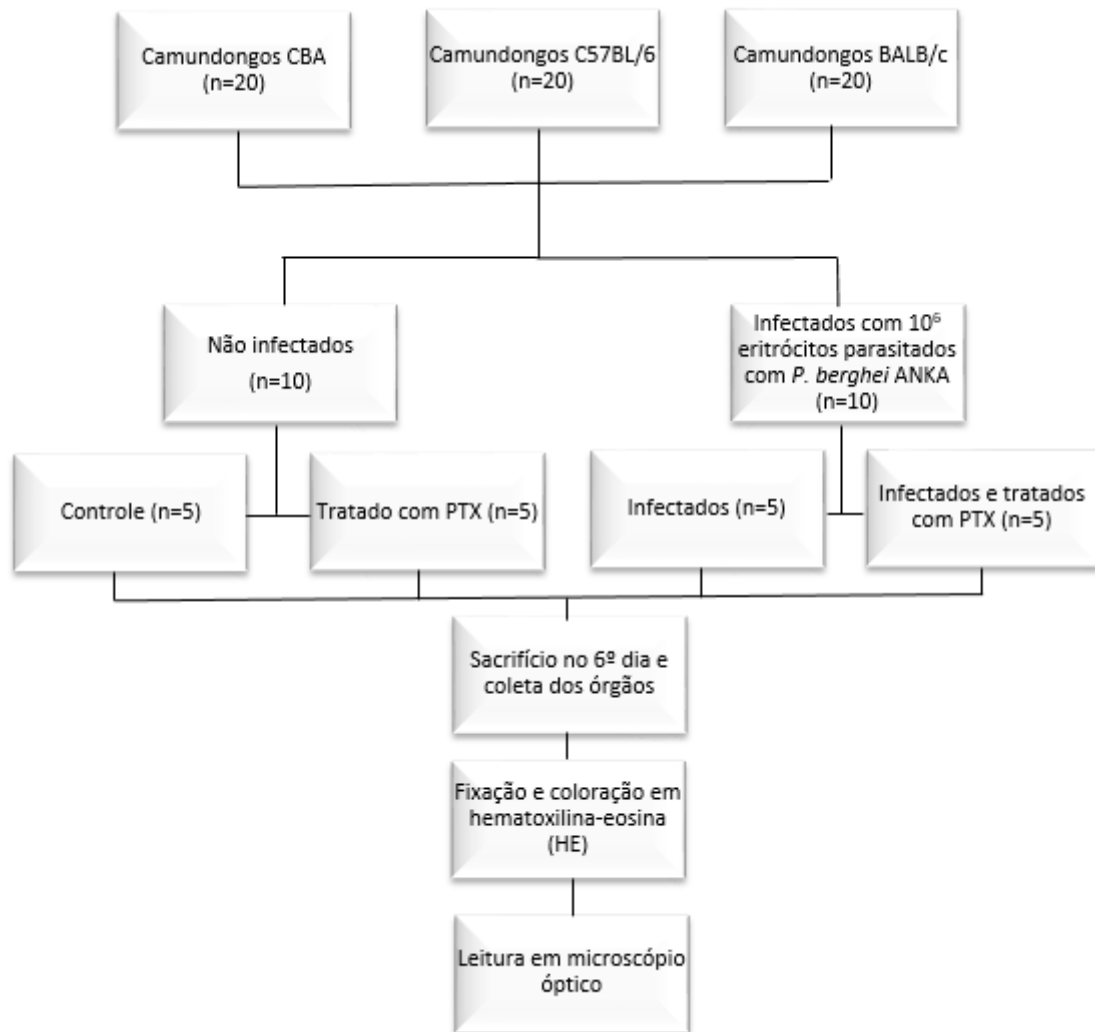


Figura 1: Delineamento experimental.

## Inóculo

A infecção foi realizada pelo inóculo intraperitoneal de  $1 \times 10^6$  hemácias infectadas com o *Plasmodium berghei* ANKA e para confirmar se os animais estavam infectados, a parasitemia foi determinada em uma pequena amostra do sangue, retirado por punção cardíaca com o auxílio de uma seringa de insulina heparinizada. A amostra foi distendida em uma lâmina, secada e corada com coloração panótica. As parasitemias foram avaliadas contando em 500 células, a quantidade de hemácias parasitadas ou não.

## Tratamento

Cada grupo foi tratado a partir do terceiro dia de infecção, para que haja a resposta inflamatória natural sem a intervenção da droga. Foi administrada por via intramuscular uma dose de 8 mg/kg/dia de Pentoxifilina (Trental, lote 106708, Laboratório Aventis Pharma LTDA) dividida em 12 horas (4 mg/kg a cada 12 horas) e diluída em soro fisiológico 0,9% com um volume total de 50 µL, e quanto aos tratados somente com salina substituído por uma injeção intramuscular de 50 µL de soro fisiológico 0,9%.

## Coleta do tecido cerebral

Após o sexto dia de infecção, os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e imediatamente após sua morte foi realizada a perfusão cardíaca com 20mL de solução contendo (glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2%), em seguida, os cérebros e cerebelos foram retirados, lavados em STF, PH 7,2, e fixados em paraformaldeído 4%. Os cérebros fixados foram cortados sagitalmente, aproximadamente na região do bregma -2 e -4 compreendendo a região hipocampal conforme mostrado na figura 2.

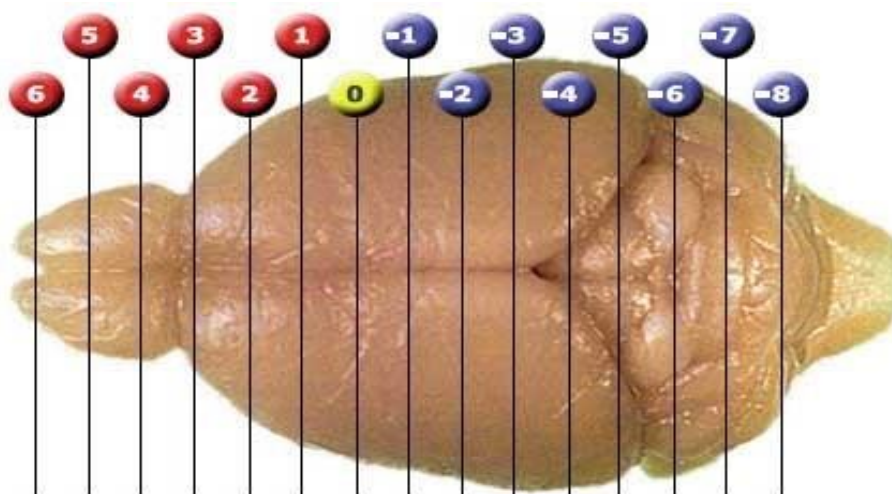


Figura 2: Cérebro de camundongo. Mostrando as regiões de secção. Adaptado de Mouse Brain Library. Disponível em ([www.mbl.org](http://www.mbl.org)).

## Coleta dos órgãos

Após o sexto dia de infecção, os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e prontamente após sua morte foi realizada a perfusão cardíaca com



20mL de solução contendo (glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2%), após isso os órgãos (fígado e pulmão) foram retirados para processamento histológico, os fígados e pulmões foram processados inteiros.

### **Processamento Histológico**

Após a coleta e fixação em paraformaldeído 4%, os órgãos seguiram para o processamento, sendo primeiro a desidratação seriada com álcool 70%, 80%, 90% e 100%, seguidas para o Xilol por três vezes e enfim para a parafina três vezes, sendo que na última parafina ocorre a etapa final para emblocamento.

Os cortes foram realizados em micrótomo em secções de 5 µm de espessura e foram corados com hematoxilina-eosina. Durante a coloração, as lâminas foram imersas em três Xilóis, 5 minutos no primeiro e dois minutos nos próximos, em seguida dois minutos em três cubas de álcool 100%, e após isso, dois minutos nos álcoois 90%, 80% e 70%, a partir daí as lâminas foram lavadas em água corrente por alguns minutos e coradas em hematoxilina por 5 minutos, após a coloração, o excesso de corante foi retirado em água e lavados novamente em água destilada, em sequência as lâminas foram imersas em eosina por três minutos, e em seguida dois minutos em três cubas de álcool 100%, seguido de dois minutos em três cubas de xilol, e assim montadas em meio de montagem com resina sintética (Enthelan ® Merck) em lamínulas sobrepostas.

### **Avaliação histopatológica**

Para a análise dos cortes histológicos, cada lâmina foi analisada em microscópio óptico, em 10 campos, para cada órgão diversos aspectos foram observados.

- **Cérebro e cerebello:** Número de neurônios, necrose neuronal, adesão leucocitária e eritrocitária, congestão vascular.
- **Fígado:** Número total de células Kupffer, número de células de Kupffer com pigmento malárico, número de sinusóides congestionados e com pigmentos maláricos, adesão eritrocitária e leucocitária nos sinusóides, adesão eritrocitária e leucocitária nos vasos do espaço porta, células mononucleares com pigmento malárico nos vasos do espaço porta, congestão vascular.

- **Pulmão:** Lesão alveolar, edema intra-septal, congestão vascular, adesão eritrocitária e leucocitária.

A morfometria do estudo foi realizada utilizando uma objetiva micrométrica em escala manométrica.

Para homogeneização dos resultados, como o número total de neurônios e células de Kupffer foram diferentes entre os animais, os dados foram normalizados para 100 células, com exceção dos números totais de células (Kupffer e neurônios).

Todas as lâminas foram analisadas e os parâmetros quantificados por um único avaliador (DC).

### **Análise Estatística**

Os dados foram analisados pelo programa Graphpad Prism para Windows (GraphPad Software – San Diego, USA). Para avaliar a normalidade da amostra foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. A partir da normalidade das amostras foi utilizado teste paramétrico ou não paramétrico. Quando avaliados os quatro grupos o teste utilizado foi ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls, ou Kruskal-Wallis, caso a distribuição não tenha sido normal, seguido do método de comparação de Dunn. Para dois grupos, foi utilizado o teste *t*-Student quando a distribuição foi normal, ou o teste de Mann-Whitney para quando não houve distribuição normal. A comparação entre as variáveis foi considerada estatisticamente significativa quando a diferença probabilística de ocorrência devida ao acaso foi menor do que 5% ( $p < 0,05$ ).

## **RESULTADOS**

Não observamos hemorragias em anel (característica histopatológica de humanos) nos camundongos.

Ademais, observamos as seguintes alterações no cérebro dos animais C57BL/6, CBA e BALB/c:

- Figura 3: Encontram-se imagens de neurônios normais (A, B e C), na imagem D observa-se um neurônio em necrose, com aspecto de cariólise (fase final da necrose, perda do núcleo e citoplasma eosinofílico), imagem E observa-se neurônios em necrose, um em picnose (fase inicial, condensação da cromatina e eosinofilia do citoplasma e núcleo) e cariólise, na imagem F observa-se dois neurônios em cariólise.

- Figura 4: Encontram-se imagens representativas de congestões vasculares (A, B e C), adesão de hemácias (E) e de leucócitos (D).

Observamos as seguintes alterações no fígado dos animais C57BL/6, CBA e BALB/c:

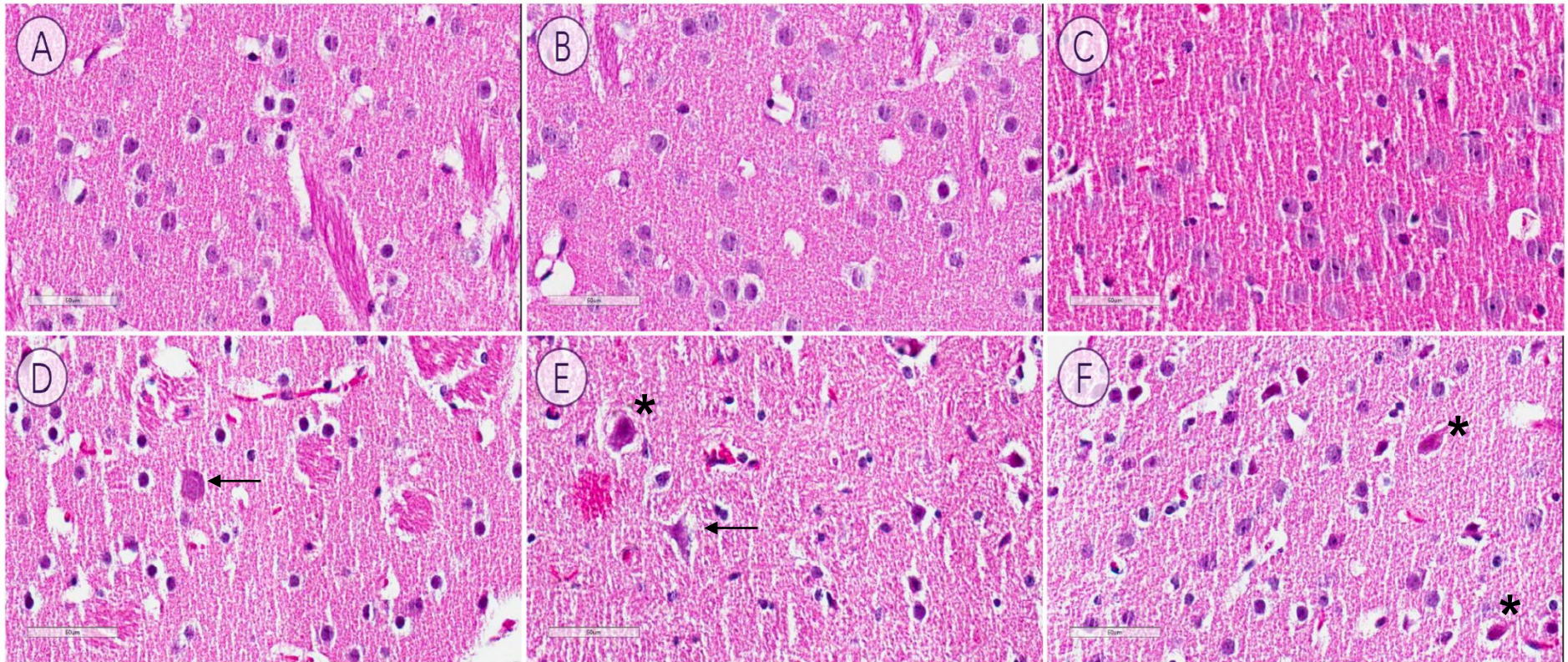
- Figura 5: Encontram-se imagens representativas dos vasos do espaço porta, normais (A) e com adesão de células mononucleares (B e C), vaso sem adesão após administração da PTX (D).

- Figura 6: Encontram-se imagens representativas de sinusóides hepáticos e células de Kupffer com pigmento malárico (A, B e C) e redução dessa característica após administração da PTX (D, E e F) .

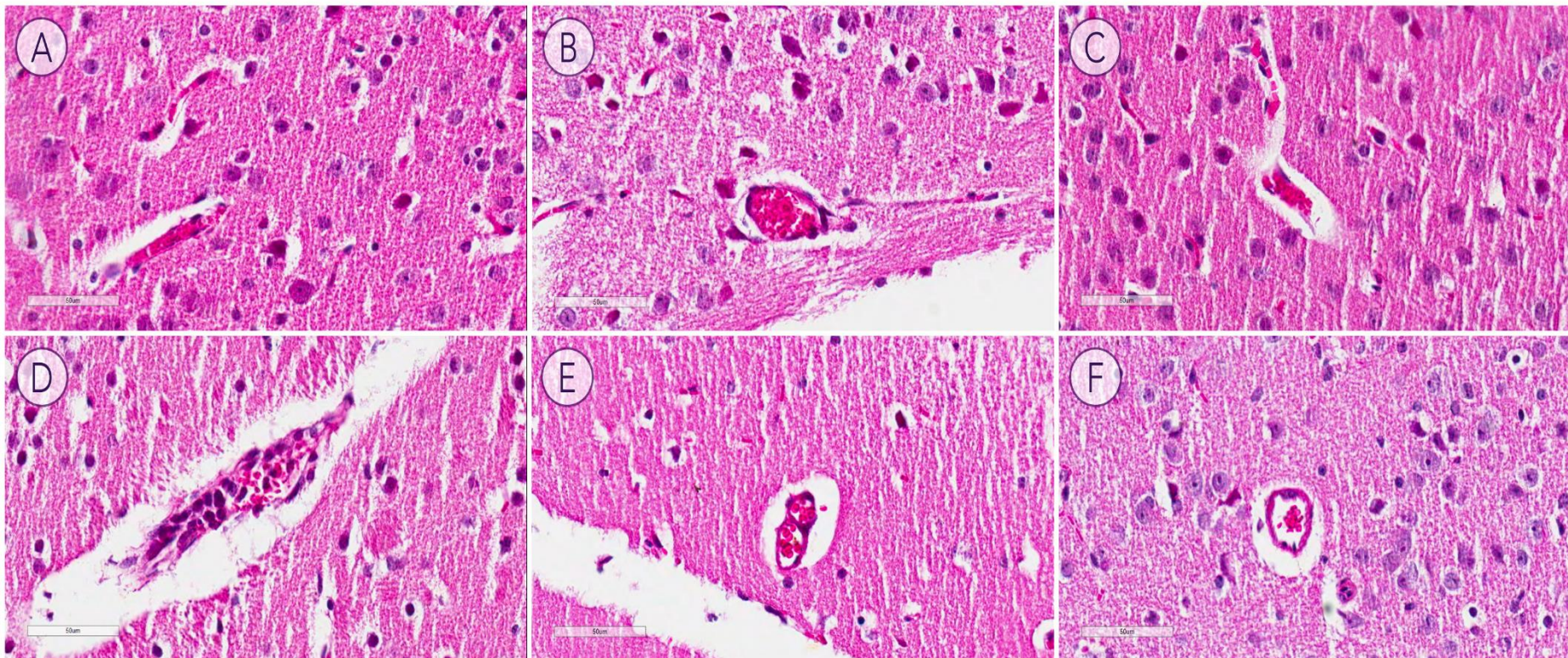
Observamos as seguintes alterações no pulmão dos animais C57BL/6, CBA e BALB/c:

- Figura 7: Encontram-se imagens representativas de lesões pulmonares e edema dos septos e alvéolos e desestruturação dos alvéolos (A, B e C).

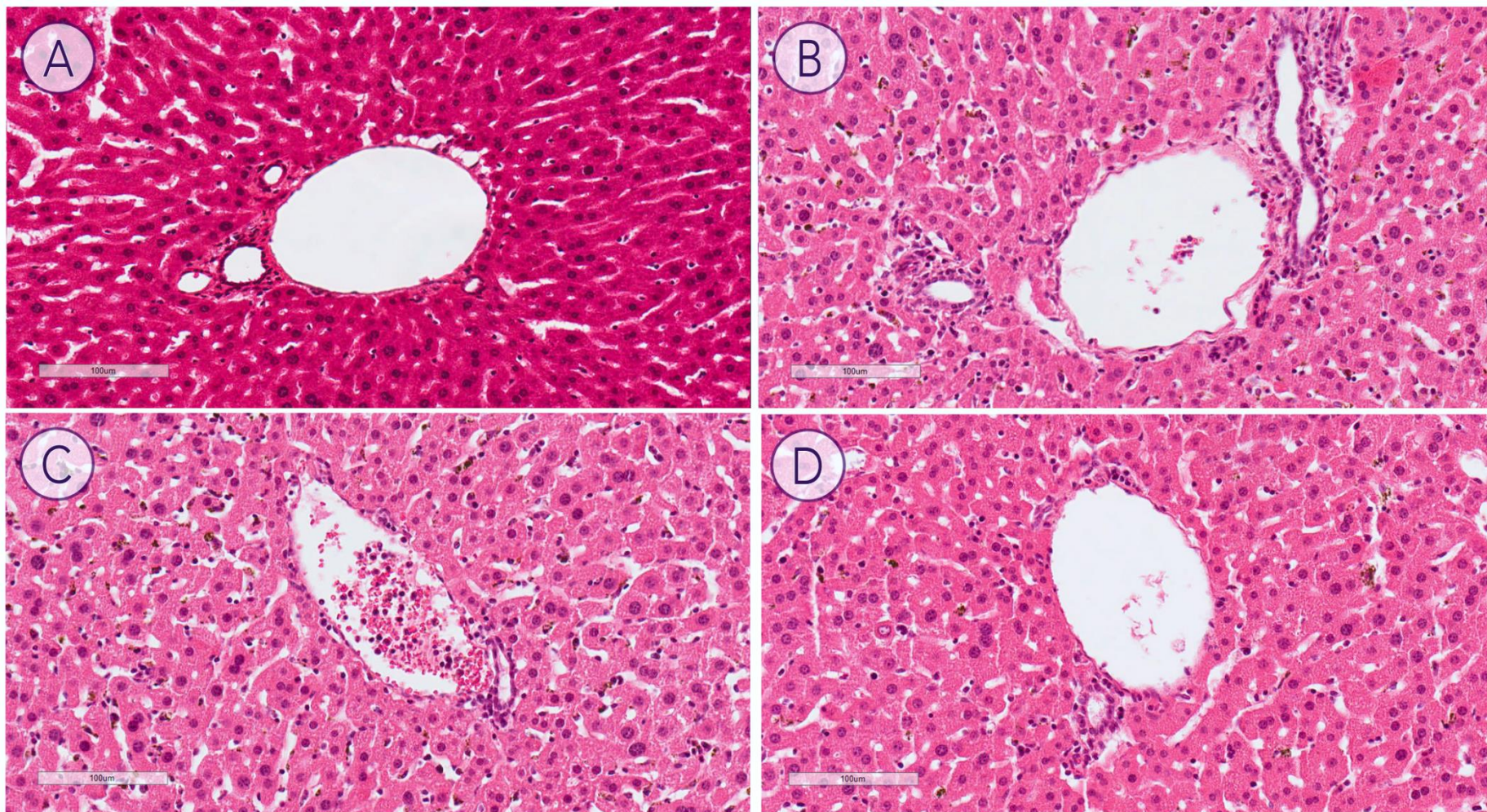
- Figura 8: Encontram-se imagens de pulmões normais (A, B e C), congestão vascular (D), menor congestão após administração da PTX (E) e edema intra-septal (F).



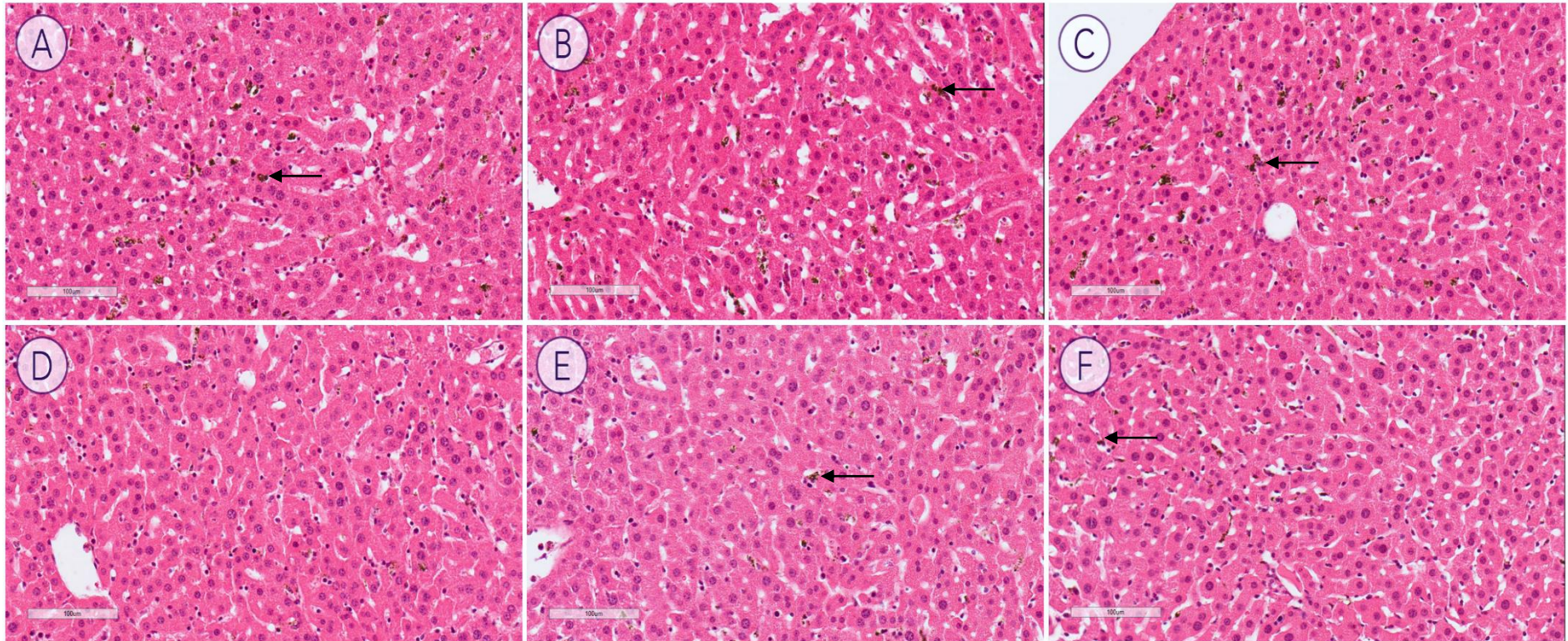
**Figura 3: Análise histopatológica dos cérebros.** No sexto dia de infecção, os cérebros foram coletados, após perfusão e fixados em paraformaldeído e emblocados em parafina. Cortes de 5 µm foram corados com hematoxilina-eosina e analisados em microscópio óptico de luz. A, B e C: Figura representativa de neurônios normais. D: Neurônio em necrose de animais BALB/c, com aspecto de cariólise (observar intensa eosinofilia do citoplasma e ausência de núcleo). E: Neurônios em necrose de animais CBA, com aspecto de picnose (observar eosinofilia do citoplasma e cromatina condensada no núcleo) e cariólise. F: Neurônios em necrose de animais C57BL/6 após tratamento com PTX, com aspecto de picnose. Seta menor: cariólise. Asterisco: picnose. Aumento: 1000x



**Figura 4: Análise histopatológica dos cérebros. Congestão vascular.** No sexto dia de infecção, os cérebros foram coletados, após perfusão e fixados em paraformaldeído e emblocados em parafina. Cortes de 5  $\mu$ m foram corados com hematoxilina-eosina e analisados em microscópio óptico de luz. A, B e C: Congestões vasculares, mostrando completa oclusão do vaso por hemácias. D: Adesão de leucócitos ao endotélio. E: Adesão de hemácias ao endotélio. F: Vaso de animal infectado aparentando melhora do quadro de congestão. Aumento: 1000x

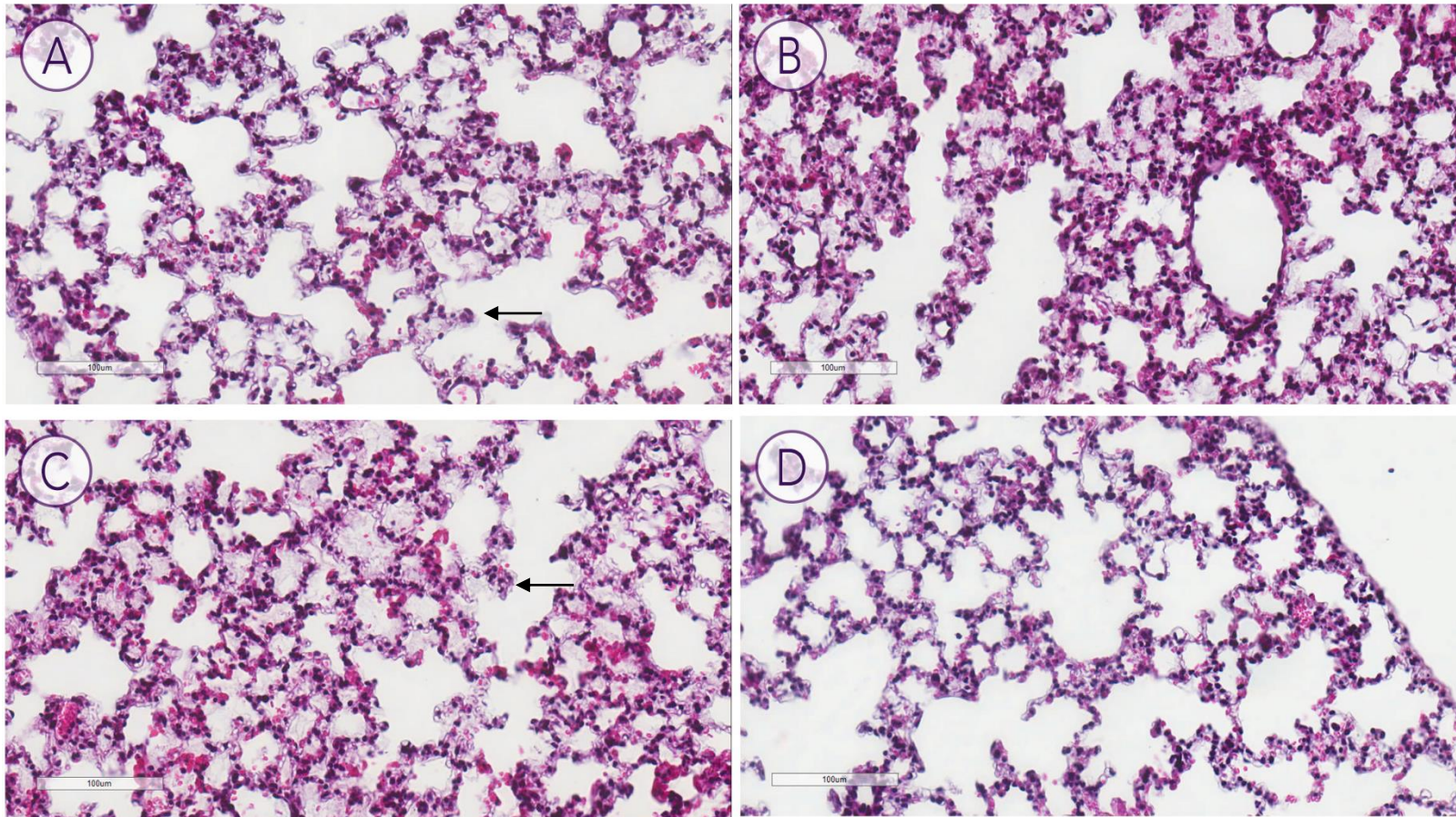


**Figura 5: Análise histopatológica do fígado. Vasos do espaço porta.** No sexto dia de infecção, os fígados foram coletados, após perfusão e fixados em paraformaldeído e emblocados em parafina. Cortes de 5 µm foram corados com hematoxilina-eosina e analisados em microscópio óptico de luz. A: Espaço porta normal em animal não infectado. B: Espaço porta de animal infectado, com CMNs aderidas ao endotélio, e aparente infiltrado inflamatório. C: Presença de hemácias infectadas aderidas entre si e CMNs em animal infectado. D: Aparente melhora da adesão em animal infectado e tratado com PTX. Aumento: 400x

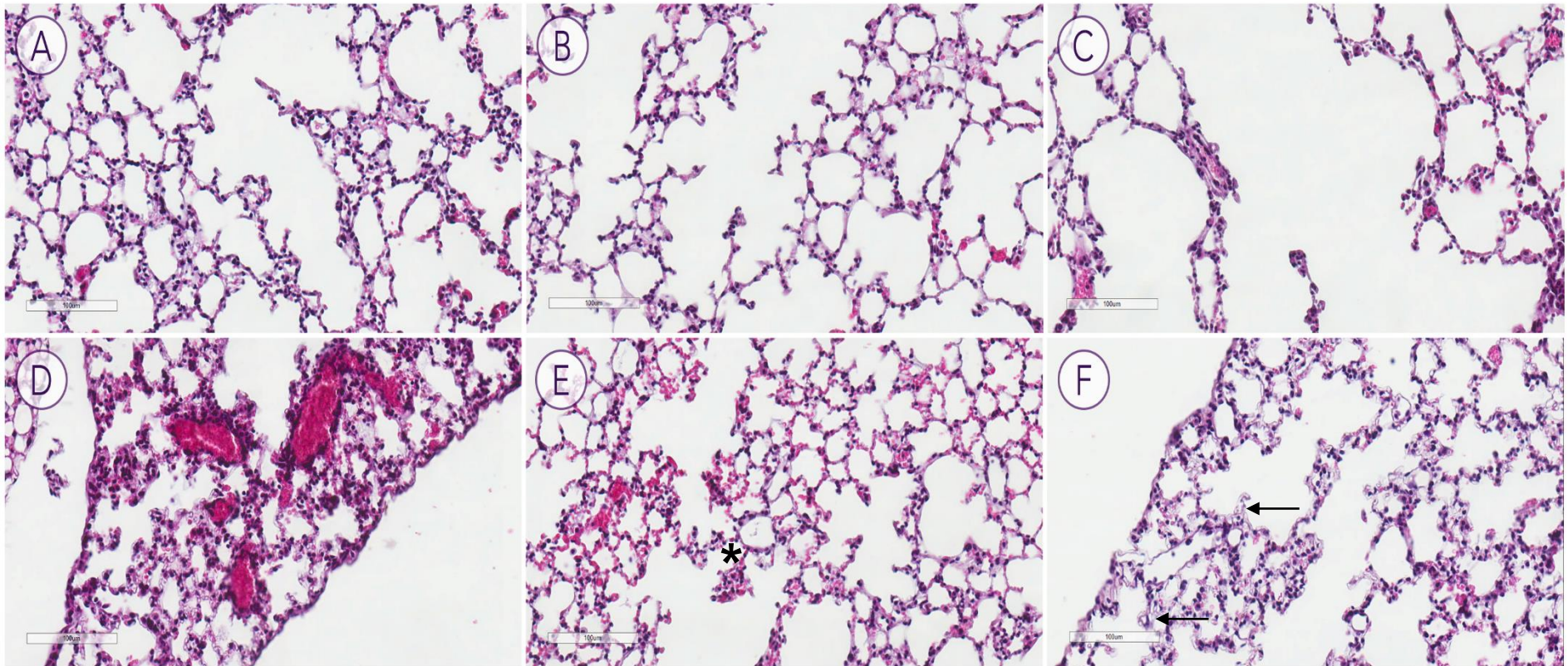


**Figura 6: Análise histopatológica do fígado. Sinusóides hepáticos.** No sexto dia de infecção, os fígados foram coletados, após perfusão e fixados em paraformaldeído e emblocados em parafina. Cortes de 5 µm foram corados com hematoxilina-eosina e analisados em microscópio óptico de luz. A, B e C: Presença de hemozoína em células de Kupffer em animais infectados. D, E e F: Redução da hemozoína em células de Kupffer em animais infectados e tratados com PTX. Seta: hemozoína + célula de Kupffer. Aumento: 400x





**Figura 7: Análise histopatológica do pulmão. Lesões pulmonares.** No sexto dia de infecção, os pulmões foram coletados, após perfusão e fixados em paraformaldeído e emblocados em parafina. Cortes de 5 µm foram corados com hematoxilina-eosina e analisados em microscópio óptico de luz. A, B e C: Lesões pulmonares com desestruturação dos alvéolos e edema no interior dos alvéolos de animais infectados. D: Aparente melhora do tecido após tratamento com PTX, redução do muco e espaços alveolares mais preservados. Seta menor: edema intra-septal. Aumento: 400x



**Figura 8: Análise histopatológica do pulmão. Lesões pulmonares.** No sexto dia de infecção, os pulmões foram coletados, após perfusão e fixados em paraformaldeído e emblocados em parafina. Cortes de 5 µm foram corados com hematoxilina-eosina e analisados em microscópio óptico de luz. A, B e C: Pulmão normal em animais não infectados. D: Extensa congestão vascular em animais infectados. E: Diminuição da congestão em animais infectados e tratados com PTX. F: Edema intra-septal em animais infectados. Seta menor: Edema intra-septal. Asterisco: observe o menor congestionamento dos vasos em relação ao animal não tratado com a PTX. Aumento: 400x

## 5.1. Córtex Cerebral

Na região do córtex cerebral as alterações relativas ao número de neurônios, presença de necrose neuronal, congestão vascular, aderência de eritrócitos e leucócitos ao endotélio vascular foram analisadas em camundongos das três cepas estudadas (CBA, C57BL/6 e BALB/c) infectados ou não pelo *P. berghei* ANKA. Foram analisados 10 campos por preparação de cada animal (n=5) em lâminas coradas por hematoxilina-eosina (HE), e os parâmetros quantificados em objetiva de imersão (1000X).

Para avaliar a influência da pentoxifilina sobre as alterações histopatológicas foram comparados os grupos controle, tratado com a pentoxifilina (PTX), infectado com o *Plasmodium berghei* ANKA (Pb) e infectado com o plasmódio e tratado com pentoxifilina (Pb + PTX) de cada cepa de camundongo individualmente. Foi também feita a comparação da resposta de cada grupo entre as três cepas de camundongos estudadas.

### 5.1.a. Avaliação da influência da pentoxifilina sobre o número total de neurônios presentes em 10 campos

Nos dois modelos que desenvolvem malária cerebral, o número de neurônios quantificados em 10 campos no córtex foi diferente após a infecção e o tratamento com a PTX. No modelo C57BL/6, o número de neurônios no córtex dos animais infectados pelo plasmódio foi menor do que os dos grupos controle e tratado com a PTX ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos;  $Pb < C$  e PTX) (Figura 9A). Para os camundongos CBA, o número de neurônios também foi menor nos animais infectados pelo plasmódio. Entretanto, nos animais tratados com a PTX, este número foi maior

do que nos animais infectados e não tratados ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparação múltipla entre os grupos (C > Pb, PTX e Pb+PTX; Pb < C, PTX e Pb+PTX) (Figura 9B). Não houve diferença no número de neurônios no córtex nem após a infecção e nem pelo tratamento no modelo BALB/c, que não apresenta o comprometimento cerebral ( $p > 0,05$ ; ANOVA seguido do Student-Newman-Keuls) (Figura 9C).

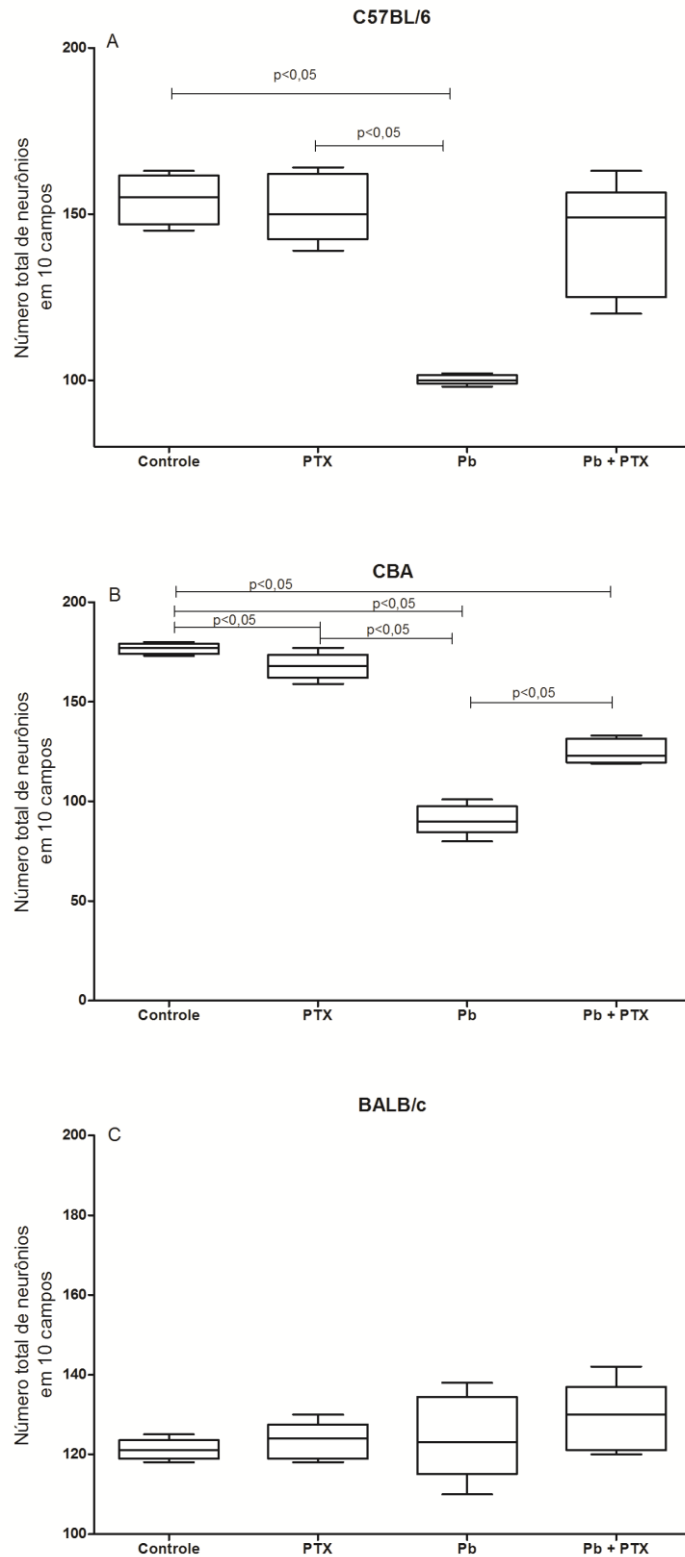


Figura 9: Número total de neurônios quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c nos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX). C57BL/6: Os animais infectados tiveram uma queda no número total de neurônios em comparação com o basal e o tratado ( $p < 0,05$  Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). CBA: Os animais infectados também reduziram o número total de neurônios ( $p < 0,05$  ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls). BALB/c: Não houve alterações significativas no número total de neurônios. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Pela análise comparativa entre os três modelos, verificamos que no grupo controle, os camundongos BALB/c apresentavam um número menor de neurônios em 10 campos do córtex do que os outros dois grupos. Enquanto o CBA apresentava um número significativamente maior do que os outros dois modelos ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguido do Student-Newman-Keuls) (Figura 10A). Este mesmo perfil foi observado pelos animais tratados com a PTX ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguido do Student-Newman-Keuls) (Figura 10B). Porém, após a infecção, os camundongos CBA apresentaram menor número de neurônios que o camundongo BALB/c ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 10C). Já nos animais infectados e tratados com PTX, não foi observado diferença entre os grupos ( $p > 0,08$ , ANOVA seguido do Student-Newman-Keuls) (Figura 10D).

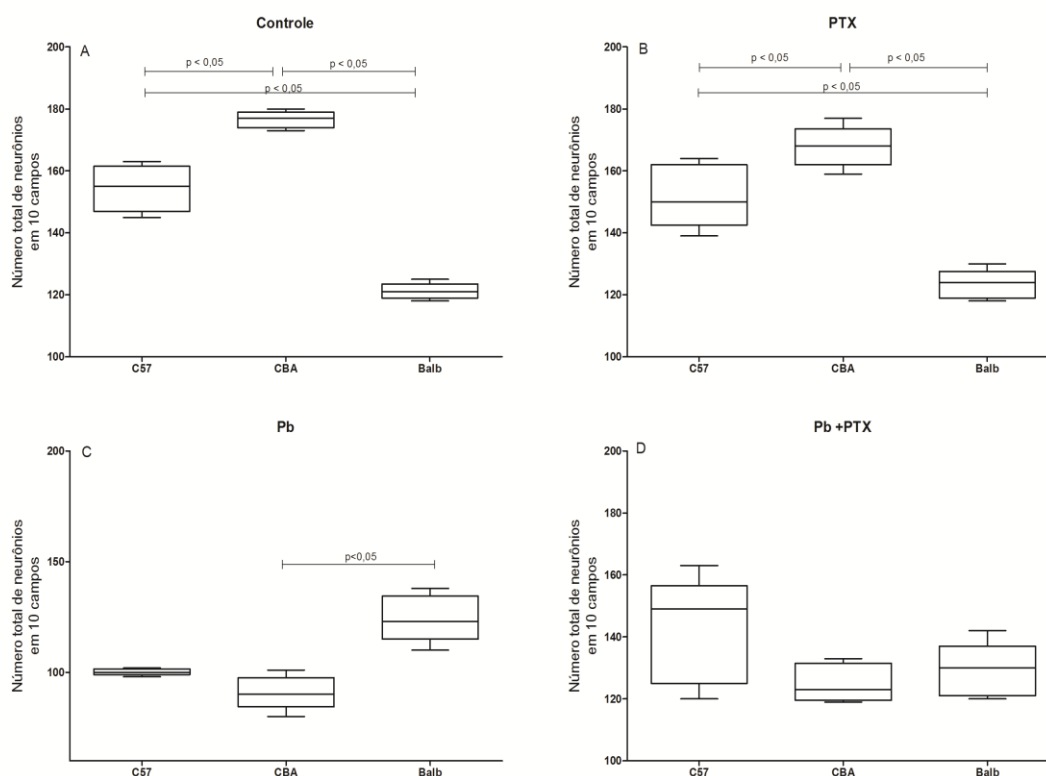


Figura 10: Número total de neurônios quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c nos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX), comparação entre todos os grupos. Controle: diferença entre os três grupos, CBA possuía mais neurônios que os outros 2 modelos ( $p < 0,05$  ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls). PTX: Mantendo a diferença do grupo controle, o modelo CBA segue com maior número de neurônios que os outros modelos ( $p < 0,05$  ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls). Pb: Diferença entre os modelos, desta vez o modelo BALB/c manteve o número de neurônios maior que o CBA ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Pb + PTX: não houve diferença significativa. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Em conclusão, tanto os camundongos CBA quanto os C57BL/6 apresentaram menor número de neurônios após a infecção e a PTX aumentou o número de neurônios em camundongos CBA infectados e tratados. O BALB/c manteve níveis semelhantes de neurônios nos quatro grupos. E ao comparar os grupos das três linhagens entre si, após a infecção os camundongos CBA apresentaram menor número de neurônios do que os BALB/c, que foi o contrário do observado nos grupos controle e PTX

#### **5.1.b. Avaliação da influência da pentoxifilina sobre a presença de necrose neuronal**

Não observamos a presença de necrose neuronal na região do córtex nos grupos controle e PTX. Contudo nos grupos infectados pelo plasmódio (Pb), observamos presença de necrose de neurônio em todos os modelos estudados, inclusive no modelo BALB/c que não mostra comprometimento cerebral clínico (C57BL/6, CBA e BALB/c). Nos animais infectados e tratados com a PTX (Pb + PTX), as respostas foram diferentes nos três modelos, enquanto a PTX não influenciou expressão da necrose neuronal no modelo BALB/c, a droga aumentou a necrose no grupo C57BL/6, enquanto diminuiu a necrose dos neurônios do córtex no grupo CBA. (Figura 11)

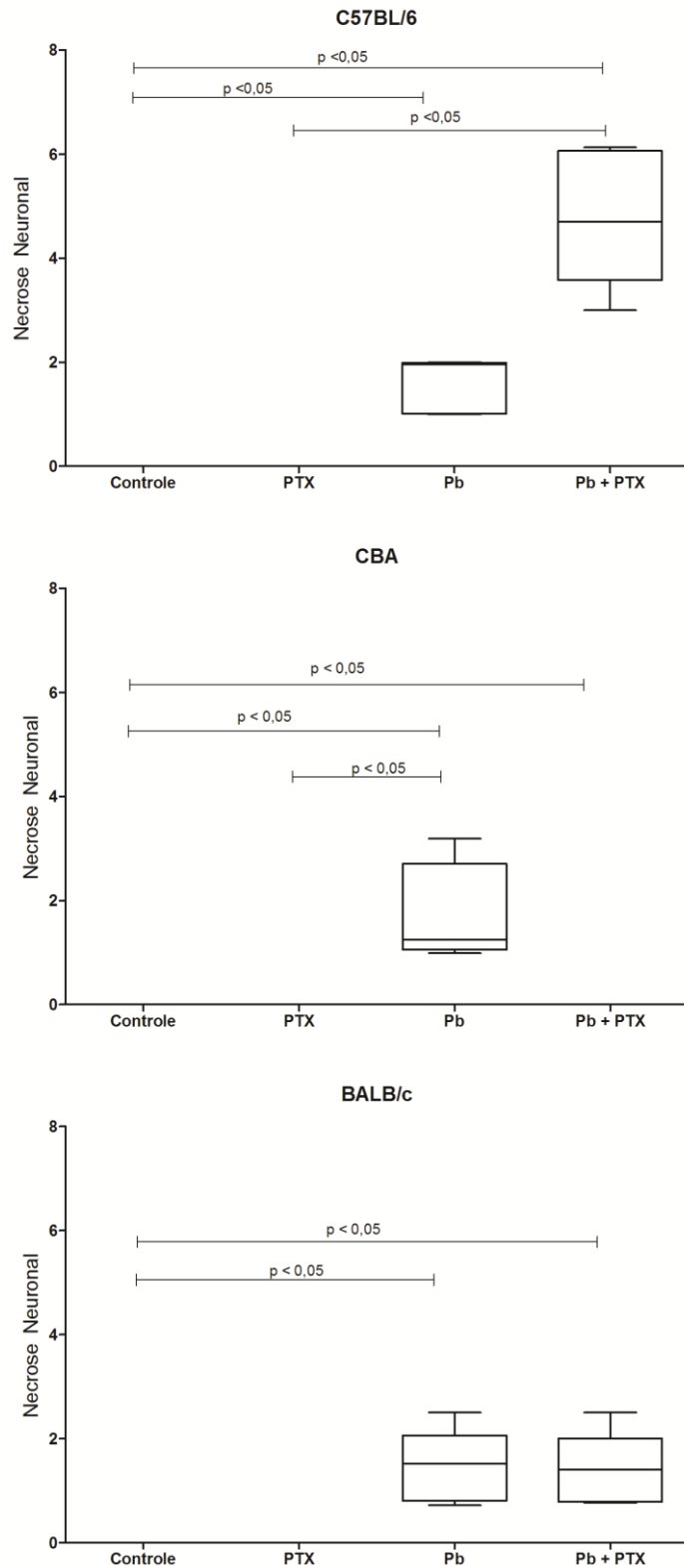


Figura 11: Número total de neurônios com necrose quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c nos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX). C57BL/6: não houve diferença entre as medianas ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de Dunn de comparação múltipla). CBA: apresentou menor número de neurônios em necrose no grupo Pb + PTX ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls). BALB/c: não houve diferença estatística entre os grupos Pb e Pb + PTX ( $p > 0,05$  ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.



Quando comparamos a presença de necrose neuronal no córtex entre os três modelos, não encontramos neurônios com necrose nos grupos controle e nos grupos tratados com PTX nos camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c. Entretanto, quando avaliamos os animais infectados pelo plasmódio (Pb), a necrose estava presente de modo semelhante em todos os modelos (Figura 12B), e o tratamento com a PTX, diminuiu a necrose no grupo CBA, mas aumentou no grupo C57BL/6 e não modificou a necrose observada no grupo BALB/c ( $p=0,0019$ , Kruskal-Wallis) (Figura 12A).

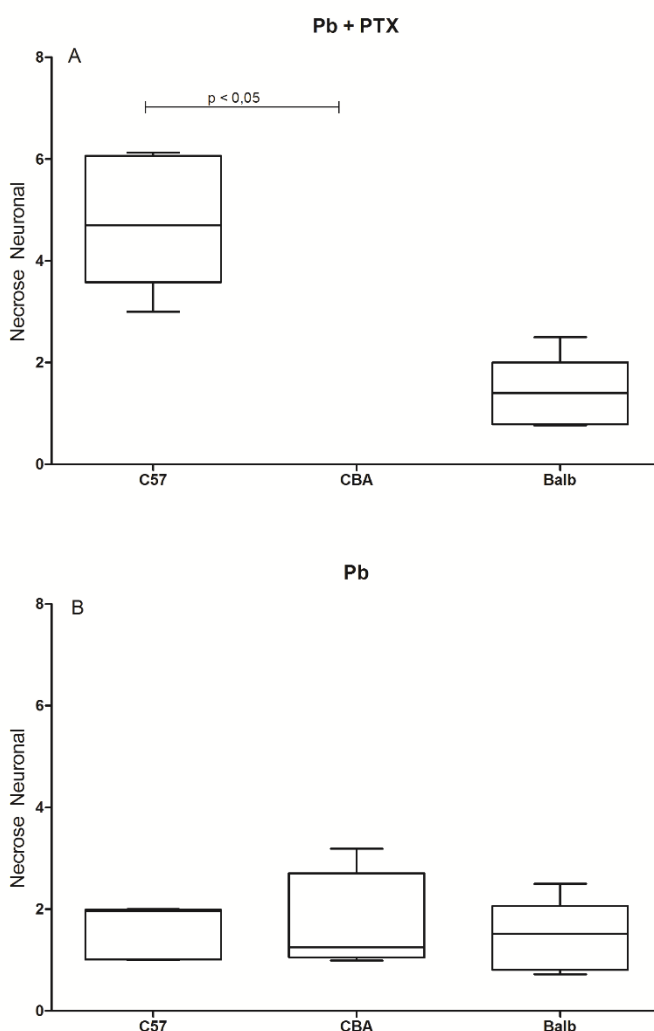


Figura 12: Número total de necrose neuronal quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c nos grupos infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX). Comparação entre os grupos. Pb: não houve diferença estatística ( $p>0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Pb + PTX: o animal C57BL/6 apresentou maior necrose neuronal que o animal CBA ( $p<0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

### 5.1.c. Influência da pentoxifilina sobre a congestão vascular

Observamos que nos camundongos C57BL/6 que não apresentaram congestão vascular mesmo após infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA, após o tratamento com a pentoxifilina, embora em valores menores que os camundongos CBA ( $p=0,01$ , teste t), 11,7% dos vasos passaram a apresentar congestão vascular, que não existia nos animais infectados e não tratados (Figura 13).

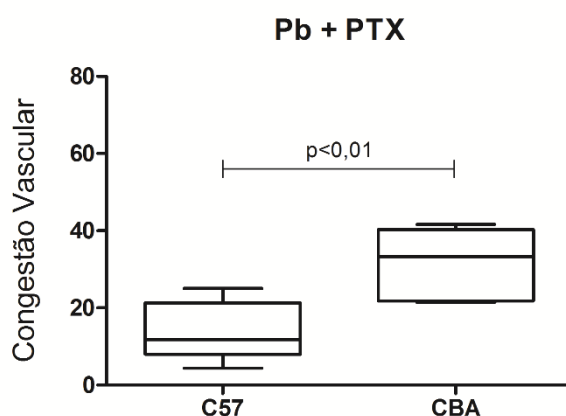


Figura 13: Número de vasos congestionados quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6 e CBA do grupo infectados tratados (Pb + PTX). C57BL/6: apresentou congestão após o tratamento com a PTX ( $p=0,0122$ ; teste t). CBA: Apresentou diferença estatística onde Pb > Pb + PTX, ( $p=0,0122$ ; teste t). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Em conclusão, apenas o modelo de malária cerebral CBA apresentou congestão vascular, e o tratamento com a PTX foi capaz de diminuir esta congestão. Enquanto o modelo C57BL/6 não apresentou congestão vascular após a infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA, mas congestão vascular foi evidenciada após o tratamento com a PTX. Nos camundongos BALB/c, não houve congestão vascular nos grupos estudados. Portanto, a PTX melhorou a congestão vascular no modelo CBA, mas desenvolveu congestão, que não estava presente, no modelo C57BL/6;

### 5.1.d. Influência da pentoxifilina sobre a aderência de leucócitos

Não foi observada aderência de leucócitos nos vasos do córtex nos grupos controle e PTX, nos três modelos.

Após a infecção pelo plasmódio, observou-se aderência de leucócitos aos vasos do córtex nos modelos CBA e BALB/c ( $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn), (Figura 14B e 14C). Entretanto, após o tratamento com a PTX, observou-se que a droga diminuiu a aderência dos leucócitos nos camundongos BALB/c ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 14C), mas induziu a aderência dos leucócitos no córtex no grupo C57BL/6 ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 14A).

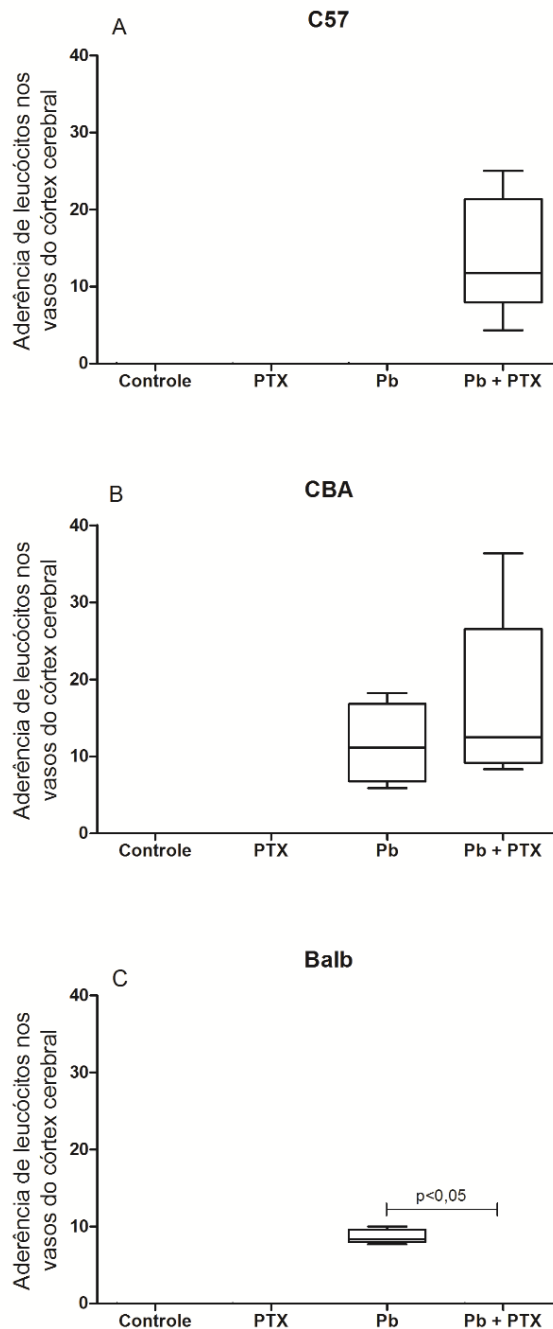


Figura 14: Número total de leucócitos aderidos nos vasos do córtex cerebral quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX). C57BL/6: Apresentou congestão vascular após o tratamento com PTX ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). CBA: não houve diferença estatística entre os dois grupos (Pb vs Pb + PTX) ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). BALB/c: Apresentou menor congestão vascular após o tratamento com PTX ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Em conclusão, após a infecção pelo plasmódio, os camundongos CBA e BALB/c apresentaram aderência de leucócitos ao endotélio vascular. Após o tratamento dos animais infectados com a PTX, houve menor aderência de

leucócitos ao endotélio no grupo BALB/c, porém a droga provocou a aderência nos animais C57BL/6, que não apresentavam este fenômeno previamente, e não influenciou a aderência dos leucócitos nos camundongos CBA.

#### **5.1.e. Influência da pentoxifilina sobre a aderência de eritrócitos ao endotélio do córtex cerebral**

Não houve aderência de eritrócitos ao endotélio do córtex cerebral nos grupos controle e PTX para todos os modelos estudados. Também não houve aderência de eritrócitos ao endotélio nos vasos do córtex para nenhum dos grupos dos camundongos BALB/c. No entanto, após a infecção pelo plasmódio, tanto os camundongos CBA ( $p=0,0018$ , Kruskal-Wallis) quanto C57BL/6 ( $p=0,0124$ , Kruskal-Wallis) apresentaram aderência de eritrócitos ao endotélio vascular do córtex cerebral. O tratamento dos animais infectados com a PTX diminuiu a aderência dos eritrócitos no modelo C57BL/6 ( $p<0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 15A).

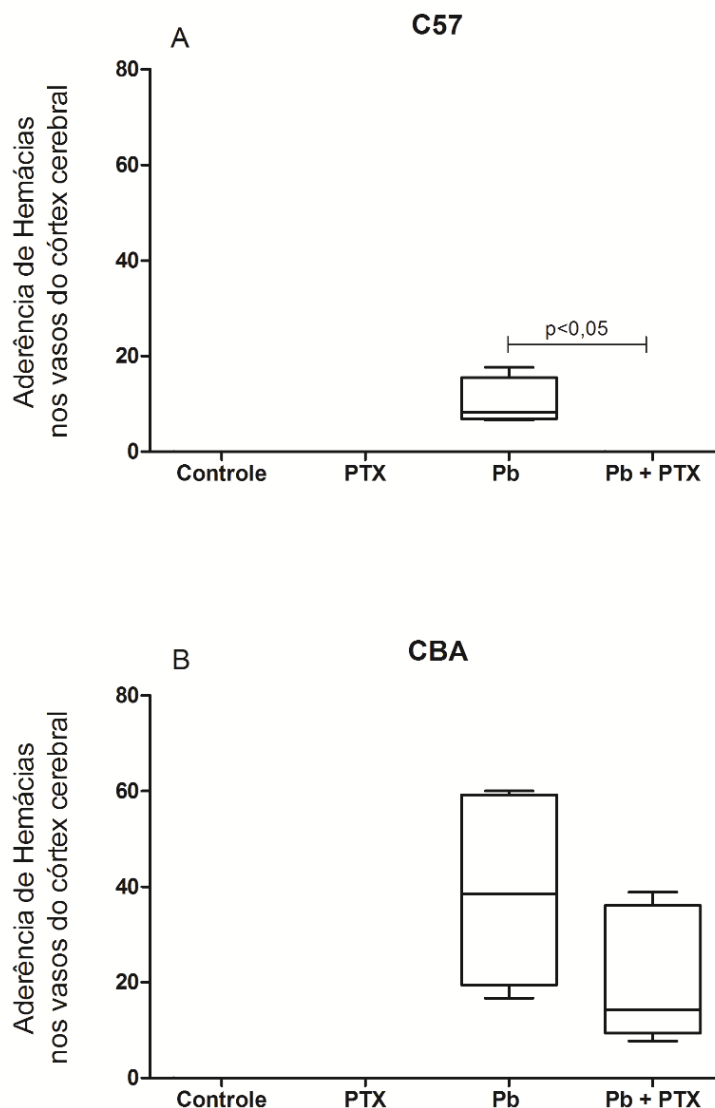


Figura 15: Número total de eritrócitos aderidos nos vasos do córtex cerebral quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX). C57bl/6: os animais apresentaram aderência somente no grupo Pb. CBA: Não houve diferença significativa entre o grupo infectado e infectado e tratado ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Quando comparamos a aderência de eritrócitos ao endotélio do córtex cerebral entre os três modelos estudados, verificamos que a infecção pelo plasmódio aumentou a aderência dos eritrócitos nos modelos CBA e C57BL/6 ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) e que o tratamento com a PTX foi capaz de diminuir a aderência nos camundongos C57BL/6, mas não nos animais CBA ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 16B).

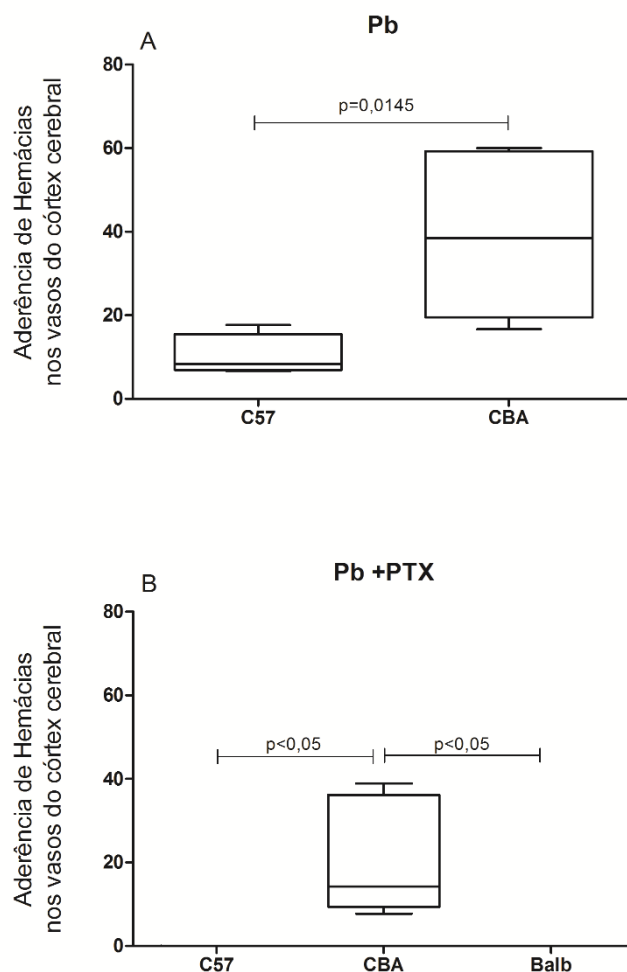


Figura 16: Número total de eritrócitos aderidos nos vasos do córtex cerebral quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX). Comparação entre grupos. Pb: Houve diferença significativa entre os modelos, onde a aderência de hemácias foi menor no C57BL/6 que no CBA ( $p=0,01$  teste t). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Em conclusão, tanto nos camundongos CBA quanto C57BL/6 houve aderência de eritrócitos ao endotélio do córtex cerebral pela infecção com o *Plasmodium berghei* ANKA e a PTX foi capaz de diminuir a aderência destas células ao endotélio vascular no modelo C57BL/6.

## 5.2 Hipocampo

Na região do hipocampo as alterações relativas ao número de neurônios, presença de necrose neuronal, congestão vascular, aderência de eritrócitos e leucócitos foram analisadas em camundongos das três cepas estudadas (CBA, C57BL/6 e BALB/c) infectados ou não pelo *P. berghei* ANKA. Foram analisados 10 campos por preparação de cada animal ( $n=5$ ) em lâminas coradas por

hematoxilina-eosina (HE), e os parâmetros quantificados em objetiva de imersão (1000x)

### **5.2.a. Avaliação da influência da pentoxifilina sobre o número total de neurônios presentes em 10 campos**

Nos animais que desenvolvem malária cerebral, os resultados foram semelhantes aos observados no córtex cerebral. Os animais C57BL/6 infectados apresentaram um menor número de neurônios ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn;  $P_b < \text{Controle e PTX}$ ) (Figura 17A). Para os modelos CBA também houve uma queda no número total de neurônios nos animais infectados e infectados e tratados ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguido Student-Newman-Keuls;  $C > \text{PTX, } P_b \text{ e } P_b + \text{PTX}$ ;  $P_b < \text{PTX, Controle e } P_b + \text{PTX}$ ) (Figura 17B). Não observamos diferenças no número total de neurônios nos animais BALB/c ( $p > 0,05$ ; ANOVA seguido Student-Newman-Keuls) (Figura 17C).



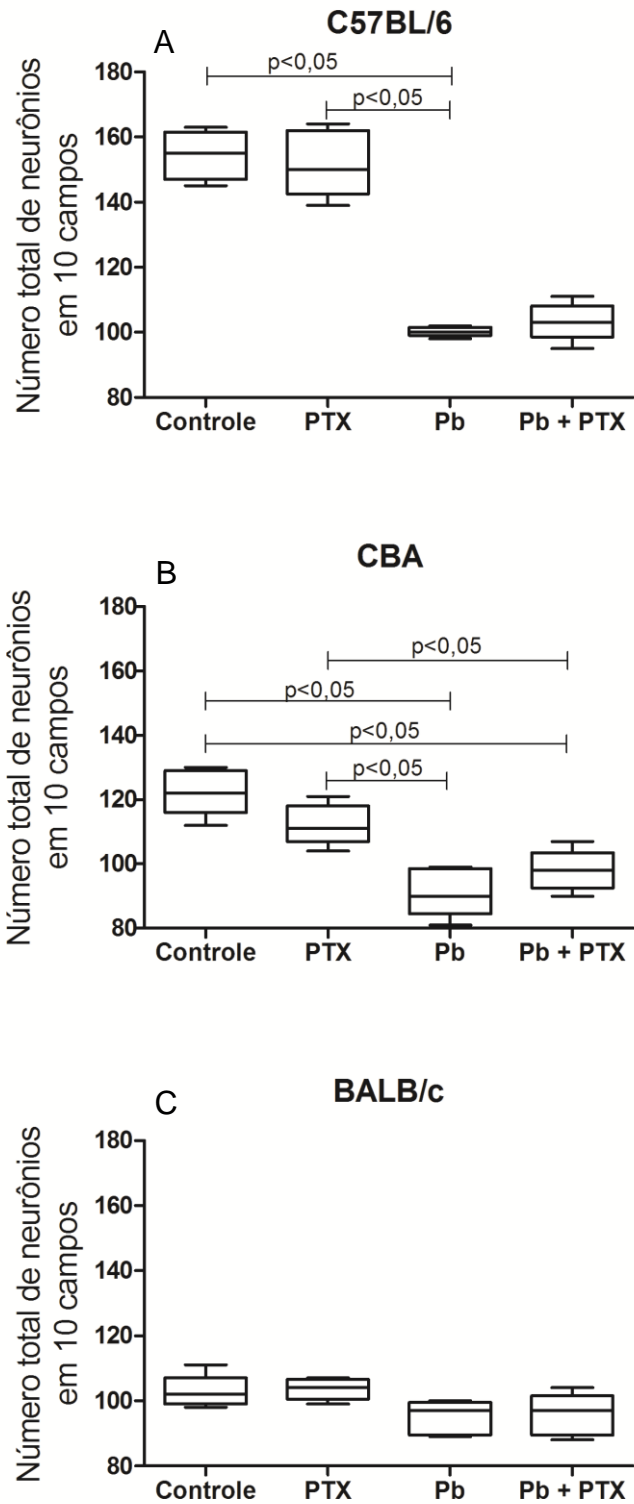


Figura 17: Número total de neurônios quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX). C57BL/6: apresentaram um número total de neurônios menor quando infectados ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn;  $Pb < Controle$  e  $PTX$ ). CBA: Os animais CBA apresentaram número menor de neurônios nos grupos infectados ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguido Student-Newman-Keuls;  $C > PTX$ ,  $Pb$  e  $Pb + PTX$ ;  $Pb < PTX$ ,  $Controle$  e  $Pb + PTX$ ). BALB/c: não apresentou diferenças significativas. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Ao comparar os três modelos, observamos que no nível basal, nos animais controle antes da infecção ou tratamento, os animais BALB/c apresentaram número menor de neurônios que os outros dois modelos, enquanto o maior número foi observado nos camundongos C57BL/6 ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguido do Student-Newman-Keuls) (Figura 18A). Este perfil foi mantido após administração da PTX ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguido do Student-Newman-Keuls) (Figura 18B). Nos animais infectados pelo plasmódio, observamos menor número de neurônios nos animais CBA ao comparar com os animais C57BL/6 (C57BL/6 > CBA) ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 18C). No entanto não observamos diferença entre os 3 modelos quando administrada a droga aos animais infectados ( $p > 0,05$ ; ANOVA seguido do Student-Newman-Keuls) (Figura 18D).

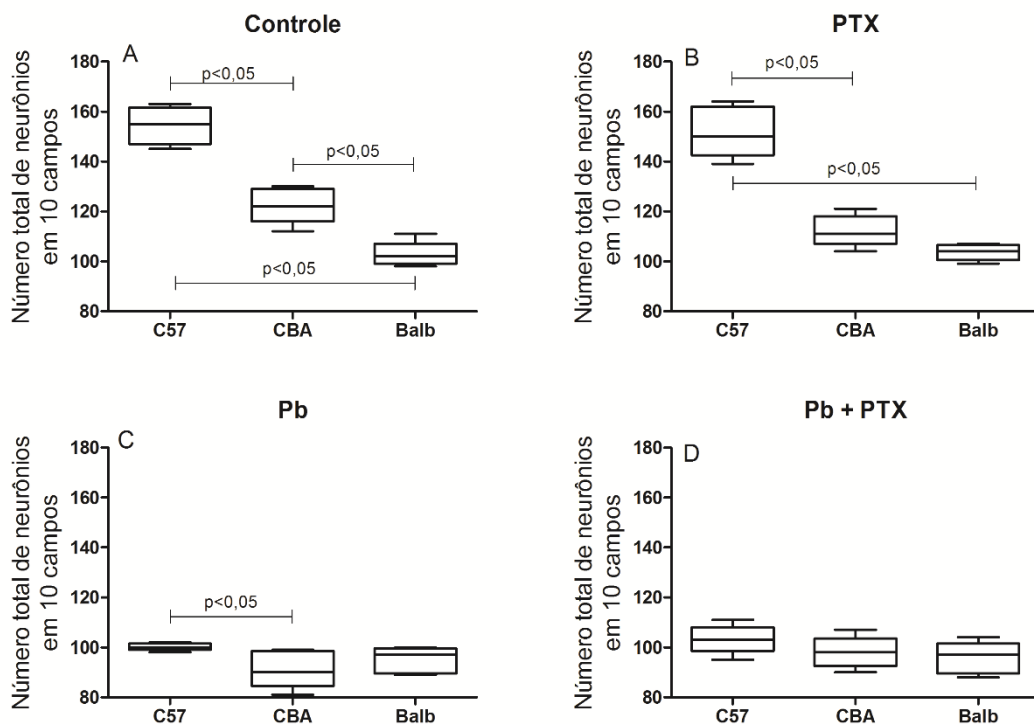


Figura 18: Número total de neurônios quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX). Comparação entre grupos. Controle: animais C57BL/6 apresentaram maior número de neurônios que os outros dois modelos ( $p < 0,05$  ANOVA seguido do Student-Newman-Keuls). PTX: C57BL/6 mantiveram o número maior de neurônios ( $p < 0,05$  ANOVA seguido do Student-Newman-Keuls). Pb: os animais CBA apresentaram diferença no número total de neurônios dos C57BL/6 ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Pb + PTX: não tiveram diferenças significativas. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Em conclusão, nos animais CBA e C57BL/6, a infecção pelo plasmódio determinou um menor número total de neurônios, do que nos animais BALB/c (que não desenvolvem malária cerebral), e que mantiveram um número semelhante de neurônios totais mesmo após a infecção. Ao comparar os grupos entre si das três linhagens, no grupo Pb, os camundongos C57BL/6 apresentaram maior número de neurônios que o CBA, e maior que o BALB/c nos grupos controle e PTX.

#### **5.2.b. Avaliação da influência da pentoxifilina sobre a necrose neuronal**

Não observamos necrose neuronal quando analisamos o hipocampo dos cortes cerebrais nos três modelos estudados quando não infectados. Porém observamos que os três modelos apresentaram necrose neuronal, mesmo o animal BALB/c que não demonstra sinais clínicos de malária cerebral após a infecção. A droga não modificou a necrose neuronal nos animais (Figura 19).

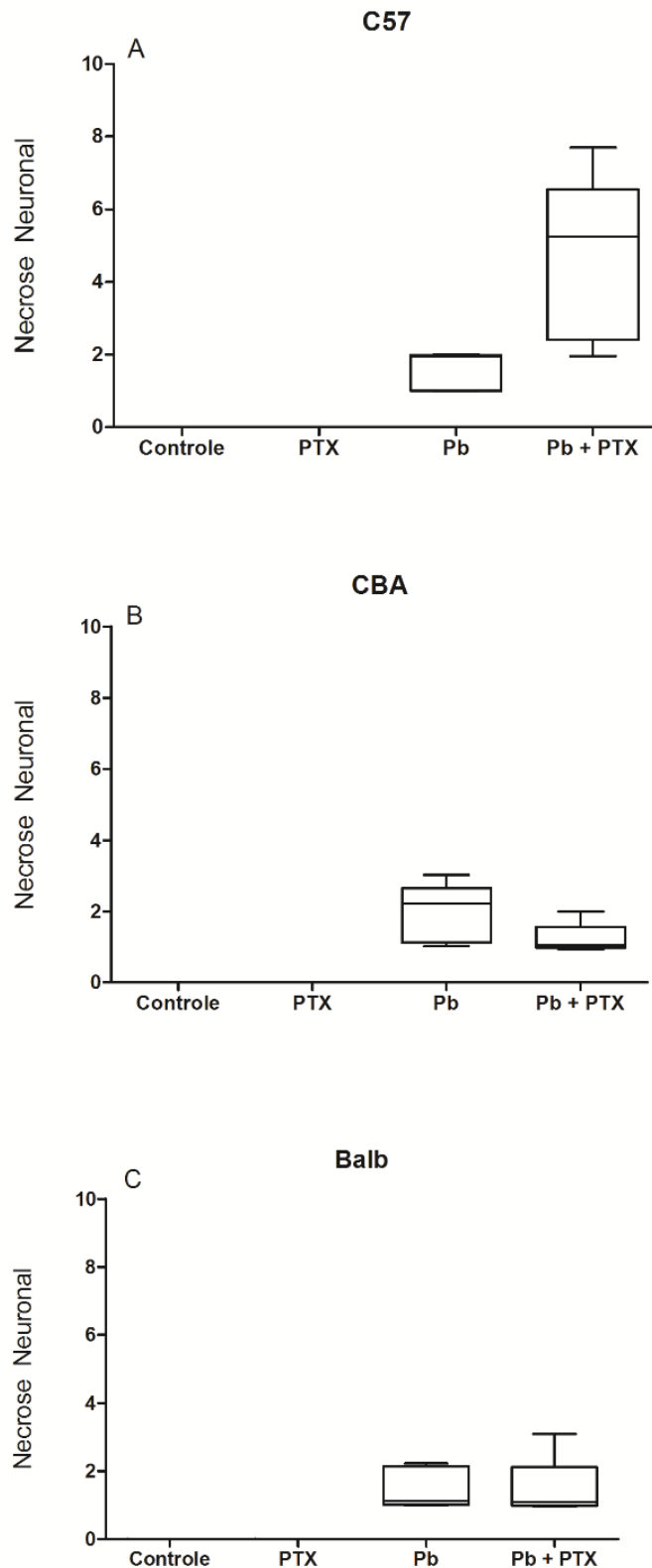


Figura 19: Número de neurônios com necrose no hipocampo quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX). Controles e PTX não apresentaram necroses neuronais, tampouco houve diferença significativa entre os outros grupos nos dois modelos (CBA e BALB/c) ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Ao comparar o número de neurônios apresentando necrose no hipocampo entre os três modelos, observamos que o número de neurônios apresentando necrose foi semelhante nos animais infectados (Pb) (Figura 20A). Já após o tratamento com a PTX dos animais infectados (Pb + PTX), observamos que foi menor o número de neurônios com necrose no CBA, entretanto, foi maior no C57BL/6, e os camundongos C57BL/6 apresentaram um número maior de neurônios com necrose do que os animais CBA ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 20B).

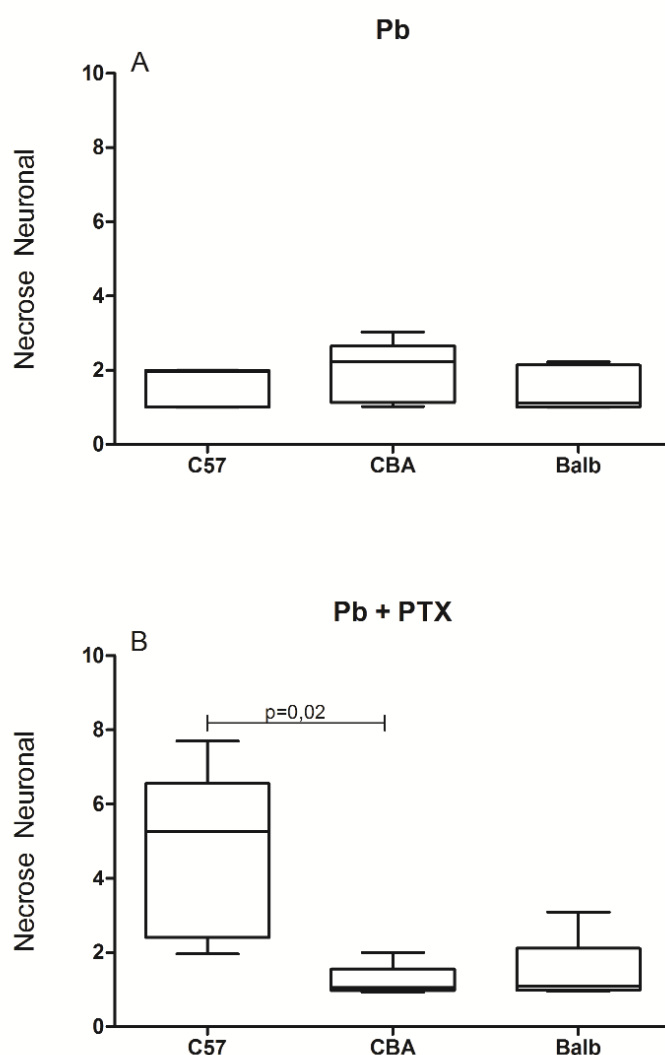


Figura 20: Número de neurônios com necrose quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX). Comparação entre grupos. Pb: não houve diferença estatística ( $p > 0,05$  Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Pb + PTX: Os animais C57BL/6 apresentaram um número maior de necrose neuronal que o CBA ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Concluimos que a PTX não influenciou o número de neurônios com necrose, e aumentou significativamente este efeito necrótico nos animais C57BL/6.

### 5.3.c. Influência da pentoxifilina sobre a congestão vascular

Os animais BALB/c e C57BL/6 não apresentaram congestão vascular em nenhum dos grupos analisados, porém os animais CBA apresentaram alguns vasos congestionados nos grupos Pb (12,55% de congestão vascular) e Pb + PTX (22,51% de congestão vascular) ( $p = 0,0020$ ; Kruskal-Wallis), porém não houve diferença entre os grupos ( $p > 0,05$  método de comparação de Dunn) (Figura 21).

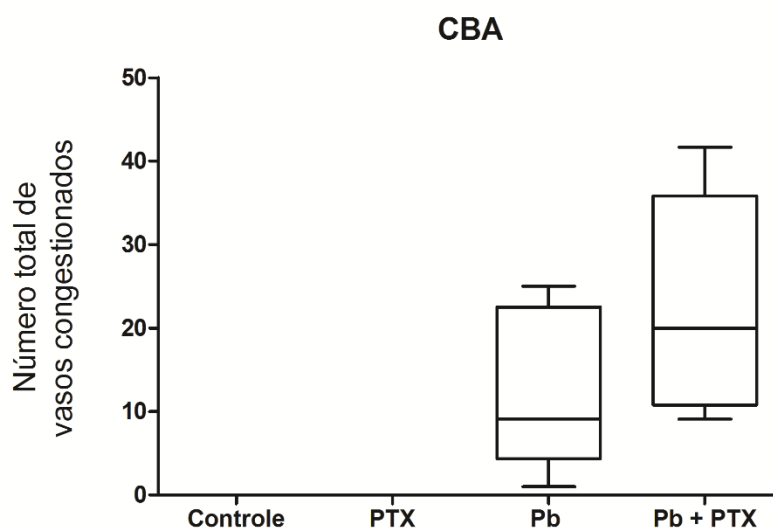


Figura 21: Número de vasos congestionados quantificados em 10 campos em camundongos CBA controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX). CBA: não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Concluimos que não houve influência da PTX na congestão vascular, e que os animais BALB/c e C57BL/6 não apresentaram congestão no hipocampo.

### 5.4.d. Influência da pentoxifilina na aderência de leucócitos ao endotélio vascular na região do hipocampo

Não observamos aderências de leucócitos na área do hipocampo nos grupos controle e PTX dos três modelos estudados.

Após a infecção pelo plasmódio, observou-se aderência de leucócitos nos vasos do hipocampo em todos os três modelos. O modelo BALB/c o número total

de leucócitos aderidos ao endotélio vascular foi menor nesta região do cérebro ( $p < 0,0124$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 22).

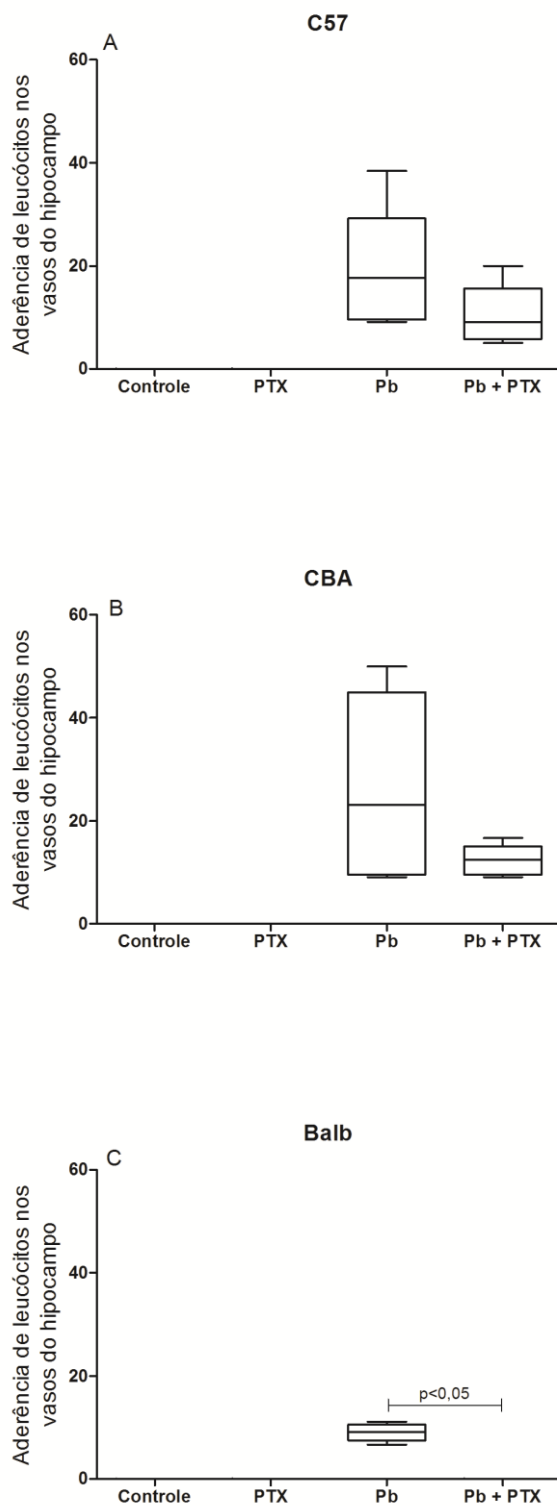


Figura 22: Número de leucócitos aderidos nos vasos do hipocampo quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX). C57BL/6: não houve relevância estatística entre os grupos infectados ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). CBA: também não apresentou relevância estatística. BALB/c: apresentou aderência somente no grupo Pb, e após administração da droga o número de aderência leucocitária foi menor ( $p < 0,05$  Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.



Comparando os três modelos, observamos que não houve diferença estatística no grupo Pb entre os três modelos ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 23A). Após o tratamento com a PTX, não foram mais observados leucócitos aderidos ao endotélio no modelo BALB/c, mas o tratamento com a droga não alterou a aderência de leucócitos ao endotélio nos outros grupos, que mostraram valores semelhantes ( $p = 0,5275$  teste t) (Figura 23B).

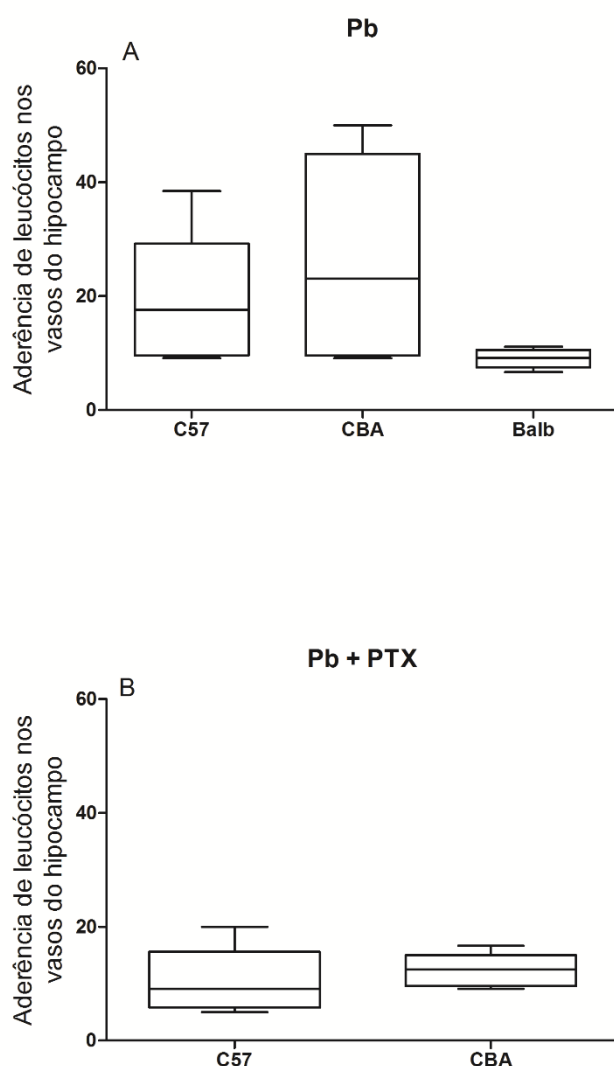


Figura 23: Número de leucócitos aderidos nos vasos do hipocampo quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX). Comparação entre grupos. Pb: não houve diferença estatística. Pb + PTX: Houve semelhança em ambos os grupos ( $p = 0,052$  teste t). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Concluimos que a PTX mostrou uma tendência biológica para reduzir o número de leucócitos aderidos ao endotélio vascular no hipocampo nos três modelos estudados (C57BL/6, CBA e BALB/c). Os animais CBA foram os que apresentaram o maior número de leucócitos aderidos ao endotélio dos vasos no hipocampo.

#### **5.2.e. Influência da pentoxifilina sobre a aderência de eritrócitos ao endotélio vascular no hipocampo**

Os camundongos C57BL/6 não apresentaram aderência de eritrócitos em nenhum dos grupos estudados. Os camundongos CBA e BALB/c dos grupos não infectados (controle e PTX) também não apresentaram aderência de eritrócitos ao endotélio vascular no hipocampo.

Após a infecção, os animais CBA ( $p = 0,0018$ ; Kruskal-Wallis) e BALB/c ( $p = 0,0124$ ; Kruskal-Wallis) apresentaram eritrócitos aderidos ao endotélio e o BALB/c apresentou um número menor de eritrócitos aderidos após administração da PTX (Figura 24B).

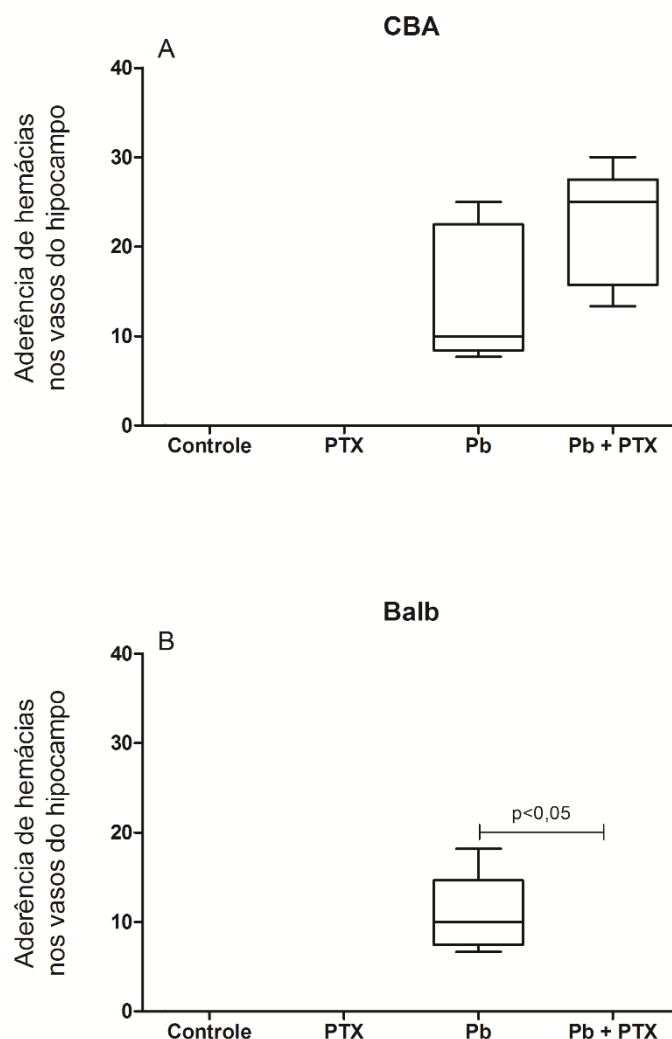


Figura 24: Número de eritrócitos aderidos nos vasos do hipocampo quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX). CBA: não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). BALB/c: apresentou aderência somente no grupo Pb, e após administração da droga o número de aderência eritrocitária foi menor ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Comparando os três modelos em relação ao grupo infectado pelo plasmódio (Pb), tanto os animais CBA quanto os BALB/c apresentaram número de eritrócitos aderidos semelhantes ( $p = 0,4033$ ; teste t) (Figura 25).

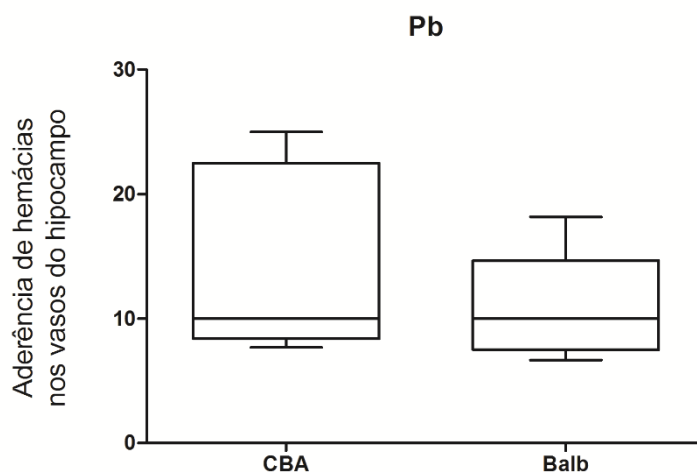


Figura 25: Número de eritrócitos aderidos nos vasos do hipocampo quantificados em 10 campos em camundongos CBA e BALB/c dos grupos infectados (Pb). Comparação entre grupos. Não houve diferença significativa entre os dois grupos ( $p = 0,40$  teste  $t$ ). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Em conclusão, observamos que os animais CBA apresentaram maior número de eritrócitos aderidos ao endotélio vascular no hipocampo no grupo infectado e que a PTX aboliu o número de eritrócitos aderidos ao endotélio vascular no modelo BALB/c.

### 5.3 Núcleos da Base

Na região dos Núcleos da Base as alterações relativas ao número de neurônios, presença de necrose neuronal, congestão vascular, aderência de eritrócitos e leucócitos foram analisadas em camundongos das três cepas estudadas (CBA, C57BL/6 e BALB/c) infectados ou não pelo *P. berghei* ANKA. Foram analisados 10 campos por preparação de cada animal ( $n=5$ ) em lâminas coradas por hematoxilina-eosina (HE), e os parâmetros quantificados em objetiva de imersão (1000x)

#### 5.3.a. Avaliação da influência da pentoxifilina sobre o número total de neurônios presentes em 10 campos

Observamos que o número total de neurônios na região dos núcleos da base foi menor nos animais infectados pelo plasmódio em todos os três modelos. O número total de neurônios foi significativamente menor nos camundongos C57BL/6 infectados pelo plasmódio (Pb e Pb + PTX) comparados com os grupos

controle e PTX. Resposta semelhante foi observada nos modelos CBA ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguido Student-Newman-Keuls;  $Pb < C$ , PTX e  $Pb + PTX$ ;  $Pb + PTX < C$  e PTX) (Figura 26B) e BALB/c ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguido Student-Newman-Keuls;  $Pb < C$ , PTX e  $Pb + PTX$ ;  $Pb + PTX < C$  e PTX). Entretanto, nestes dois modelos, o tratamento com a PTX dos animais infectados foi aparentemente protetor quanto a destruição dos neurônios pela infecção, pois em ambos, o número total de neurônios foi maior nos animais tratados ( $Pb+PTX$ ) do que nos infectados ( $Pb$ ). (Figura 26C).

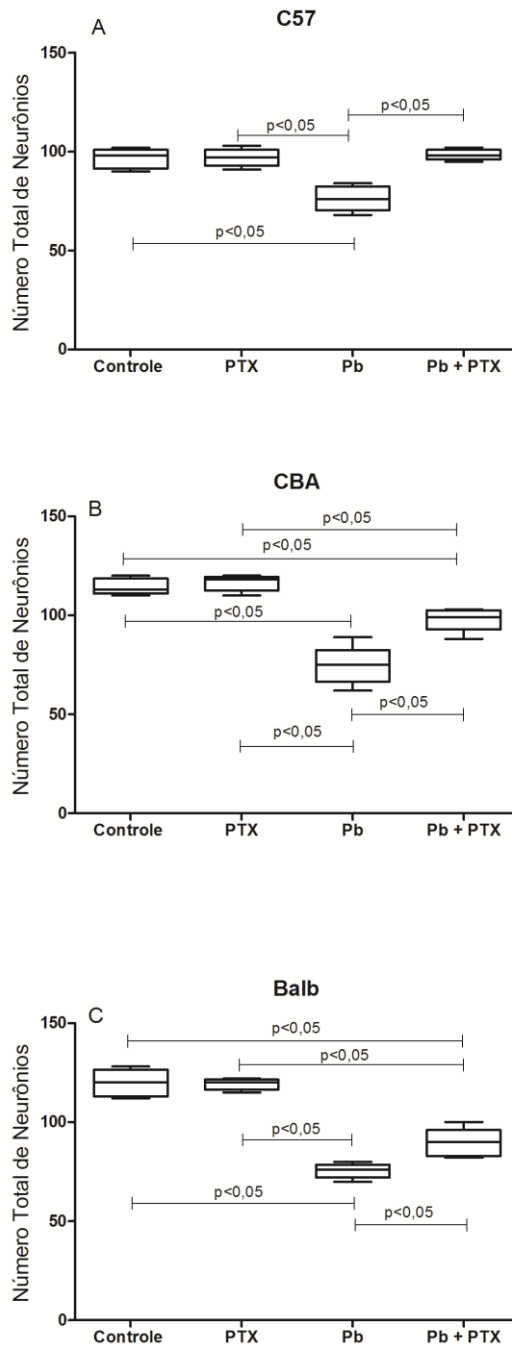


Figura 26: Número total de neurônios quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX). Os animais C57BL/6 demonstraram uma queda significativa no número total de neurônios nos grupos infectados (Pb) comparados com o nível basal (Controle) e tratado e infectado e tratado (Pb + PTX) ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguido Student-Newman-Keuls). No modelo CBA nota-se semelhanças com os resultados observados no C57BL/6, de forma que houve efeito semelhante da droga nos camundongos infectados ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguido Student-Newman-Keuls;  $Pb < C$ ,  $PTX$  e  $Pb + PTX$ ;  $Pb + PTX < C$  e  $PTX$ ). No modelo BALB/c também houve aspectos semelhantes aos outros dois modelos ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguido Student-Newman-Keuls;  $Pb < C$ ,  $PTX$  e  $Pb + PTX$ ;  $Pb + PTX < C$  e  $PTX$ ). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Ao comparar os modelos, observamos que o grupo controle dos camundongos C57BL/6 apresentou menor número de neurônios comparados aos outros dois modelos ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls) (Figura 27A) e que a mesma diferença foi observada no grupo tratado com pentoxifilina (Figura 27B). Porém não observamos diferenças significativas ao comparar os três modelos para os grupos infectados e infectados e tratados.

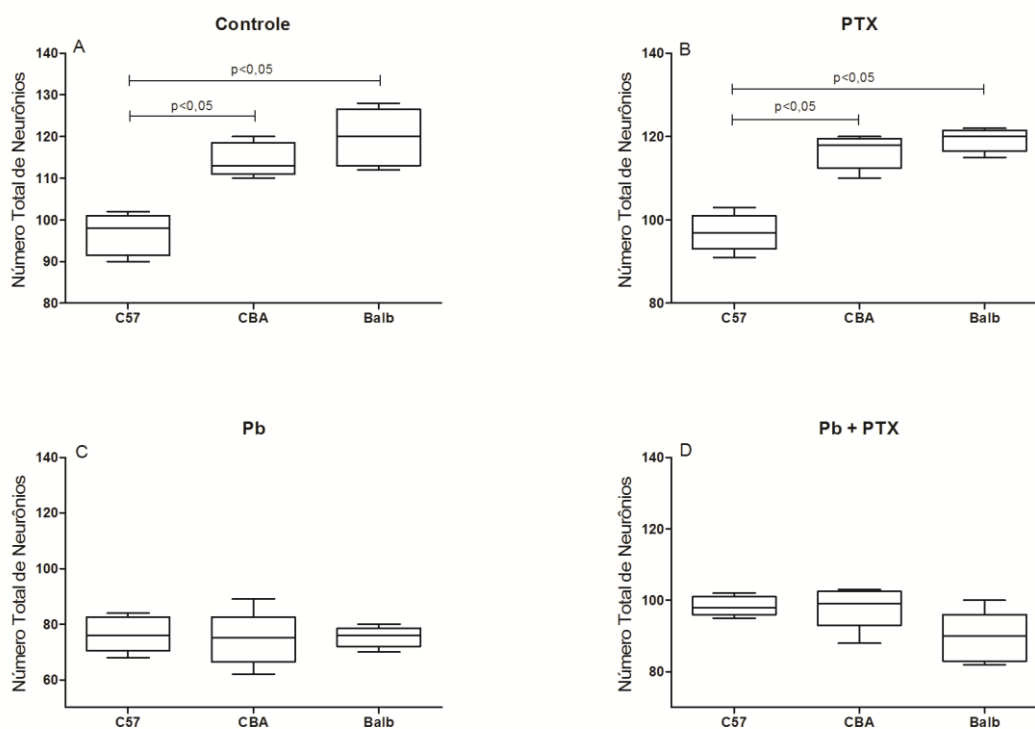


Figura 27: Número total de neurônios quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX). Comparação entre os grupos. Controle: diferença no número total de neurônios dos camundongos C57BL/6. PTX: a droga não influenciou no número total. Pb e Pb + PTX: não houve diferenças estatísticas. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Em conclusão observamos que o número total de neurônios foi diferente entre os três modelos no nível basal (Controle). Os animais não apresentaram diferenças significativas no número total de neurônios nos grupos infectados (Pb e Pb + PTX).

### 5.3.b. Avaliação da influência da pentoxifilina sobre a necrose neuronal

Todos os três modelos estudados apresentaram necrose neuronal quando infectados pelo plasmódio, mas somente nos animais C57BL/6 a

presença de neurônios com necrose persistiu após o tratamento com a PTX. Nos camundongos CBA e BALB/c, a PTX aboliu a necrose neuronal, que não foram mais observadas nos grupos Pb+PTX ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 28A).

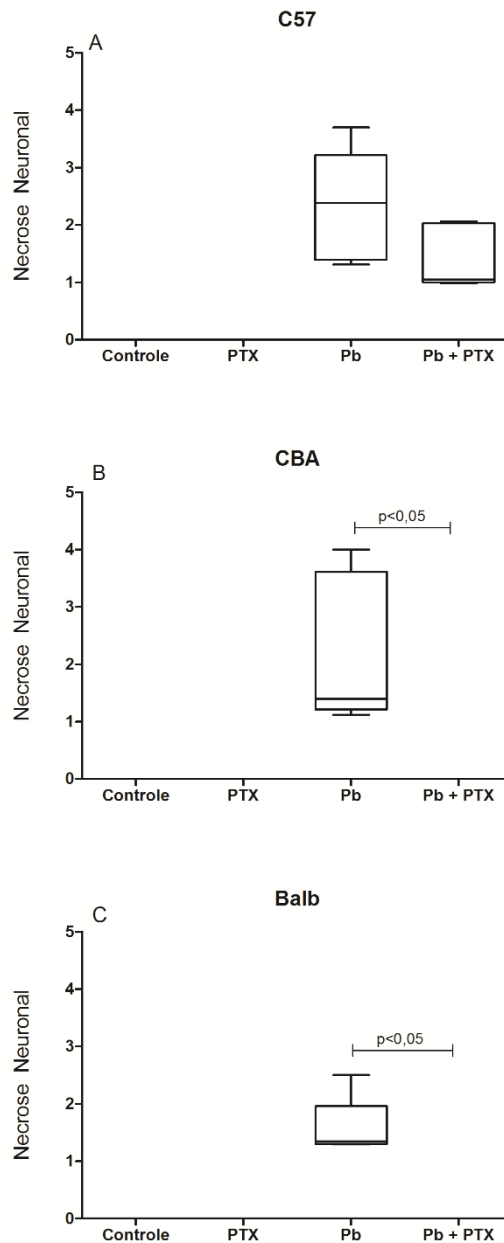


Figura 28: Número total de neurônios com necrose quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX). C57BL/6: não houve diferença significativa entre os grupos Pb vs Pb + PTX ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). CBA e BALB/c: notou-se que a droga aboliu a necrose neuronal nos infectados e tratados ( $p < 0,05$  Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.



Ao realizarmos a comparação entre os três modelos no grupo Pb, não observamos diferenças estatísticas ( $p > 0,05$  Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 29).

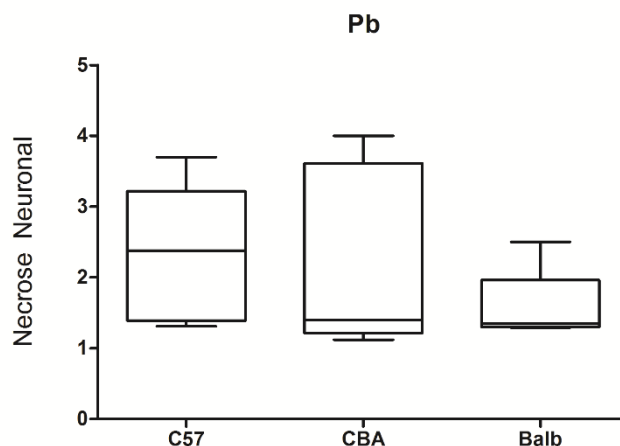


Figura 29: Número total de neurônios com necrose contados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX). Comparação entre grupos. Pb: Não houve diferenças significantes ( $p > 0,05$  Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Concluimos que a droga foi aparentemente efetiva na proteção contra necrose neuronal nos núcleos da base para os camundongos CBA e BALB/c, porém, não teve influência nos camundongos C57BL/6.

### 5.3.c. Influência da pentoxifilina sobre a congestão vascular

Nos animais C57BL/6 não observamos congestão vascular em nenhum dos quatro grupos estudados.

Os animais BALB/c apresentaram congestão vascular (7,64%) apenas no grupo infectado com o plasmódio (Pb) ( $p = 0,0124$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 30A), contudo o modelo CBA infectado pelo plasmódio continuou apresentando congestão vascular mesmo após o tratamento com a PTX (Pb - 24,32%; Pb + PTX - 11,05%), e não houve diferença estatística quando comparamos estes dois grupos ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 30B).

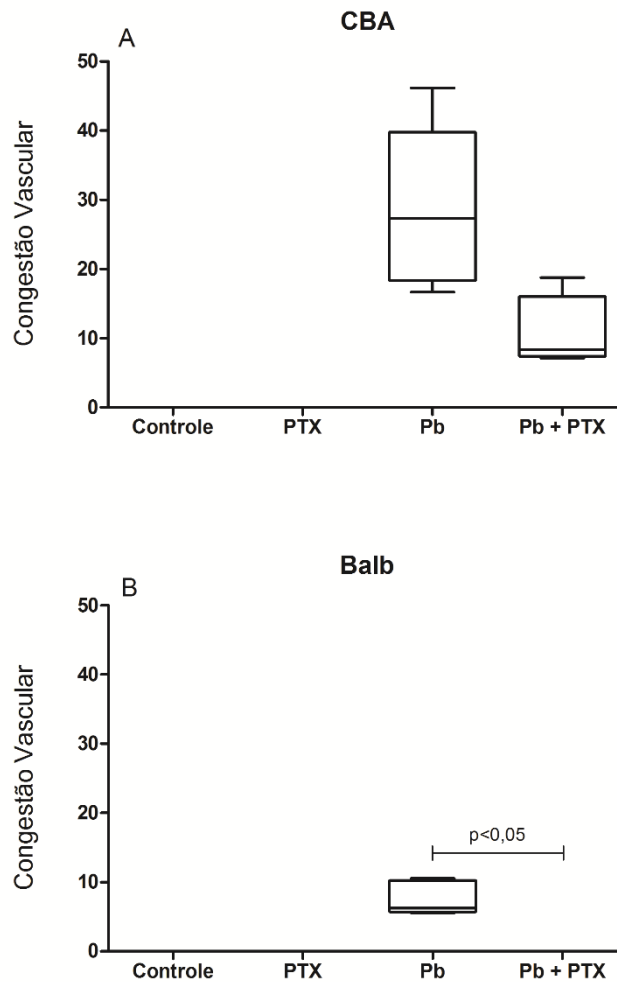


Figura 30: Número total de vasos congestionados quantificados em 10 campos em camundongos CBA e BALB/c controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX). CBA: nota-se que não houve diferenças significativas entre os dois grupos ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). BALB/c: Houve um aparente efeito benéfico da droga nos animais infectados e tratados ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Ao comparar os grupos infectados pelo plasmódio (Pb) dos modelos CBA e BALB/c, observamos que os camundongos BALB/c apresentaram menor congestão vascular que os animais CBA ( $p = 0,0043$  teste t) (Figura 31).

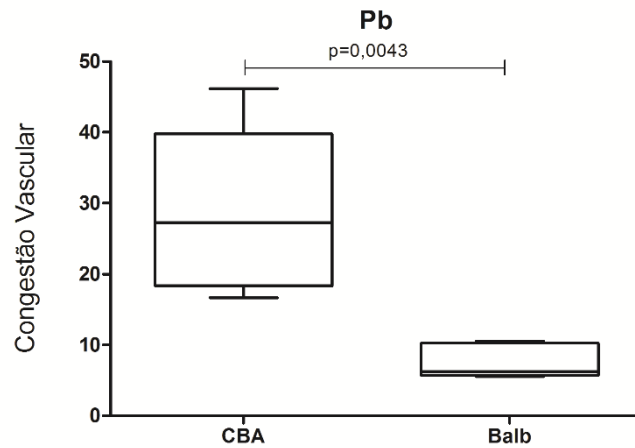


Figura 31: Número total de vasos congestionados quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA infectados (Pb). Comparação entre grupos. Pb: houve diferença no número de vasos congestionados, onde o CBA apresentou maior congestão ( $p=0,0043$  teste t). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Concluimos que os animais BALB/c apresentaram menor congestão vascular após administração da PTX no grupo infectado e tratado, e que não houve efeito significativo no modelo CBA.

#### 5.3.d. Influência da pentoxifilina na aderência de leucócitos ao endotélio vascular dos núcleos da base

Os animais BALB/c não apresentaram aderência ao endotélio dos vasos nos quatro grupos estudados, o modelo C57BL/6 apresentou leucócitos aderidos apenas no grupo infectado (Pb), enquanto o grupo Pb+PTX não mostrou aderência, sugerindo um efeito de menor aderência de leucócitos após a administração da PTX neste modelo ( $p<0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido pelo método de comparação de Dunn) (Figura 32A). Já o modelo CBA apresentou adesão de leucócitos em ambos os grupos infectados (Pb e Pb + PTX), porém, não apresentou relevância estatística ( $p>0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). (Figura 32B)

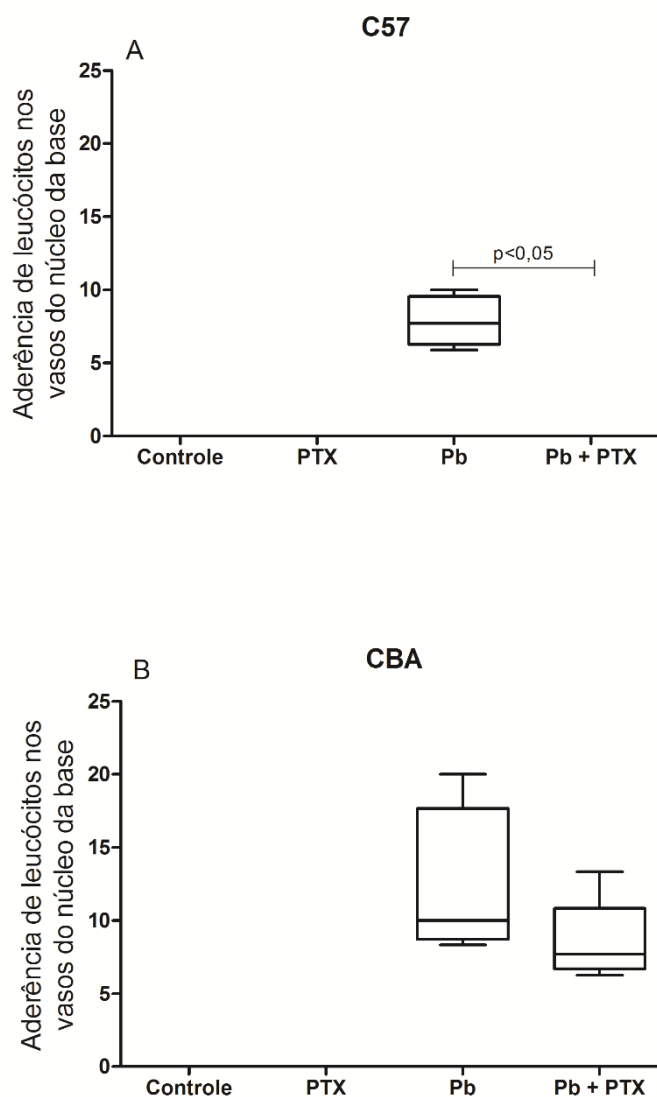


Figura 32: Número total de leucócitos aderidos nos vasos dos núcleos da base quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX). C57BL/6: diferença entre o grupo Pb e o Pb + PTX que não apresentou aderência leucocitária ( $p < 0,05$  Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). CBA: não houve diferença estatística. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Já ao comparar os animais C57BL/6 e CBA do grupo infectado pelo plasmódio (Pb), os animais CBA mostraram uma tendência para apresentar uma maior aderência de leucócitos que os animais C57BL/6 ( $p = 0,0818$  teste t) (Figura 33).

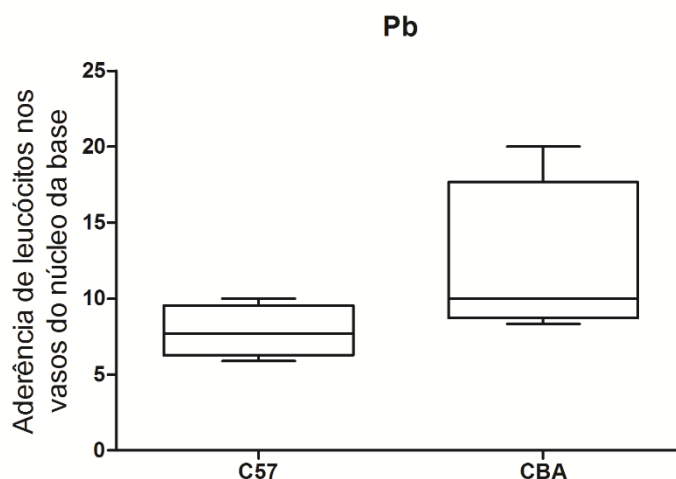


Figura 33: Número total de leucócitos aderidos nos vasos dos núcleos da base quantificados em 10 campos em camundongos C57BL/6, CBA dos grupos infectados (Pb). Comparação entre grupos. Pb: Não houve diferença significativa entre os modelos ( $p > 0,05$  ANOVA seguido do Student Newman-Keuls). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Concluimos que os camundongos C57BL/6 apresentaram uma menor aderência de leucócitos nos vasos dos núcleos da base após administração da droga PTX no grupo infectado e tratado, porém, este mesmo efeito não foi tão evidente no modelo CBA.

### 5.3.e. Influência da pentoxifilina sobre a aderência de eritrócitos ao endotélio vascular dos núcleos da base

Não houve aderência de eritrócitos ao endotélio dos vasos dos núcleos da base em nenhum dos grupos nos animais C57BL/6, tampouco nos grupos controle e PTX dos outros modelos. Nos camundongos CBA e BALB/c infectados pelo plasmódio observamos aderência de eritrócitos ao endotélio, e o tratamento com a PTX (Pb + PTX) diminuiu significativamente a aderência somente nos animais BALB/c. ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 34A). Para o modelo CBA a diminuição observada não teve significância estatística ( $p > 0,05$  Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 34B).

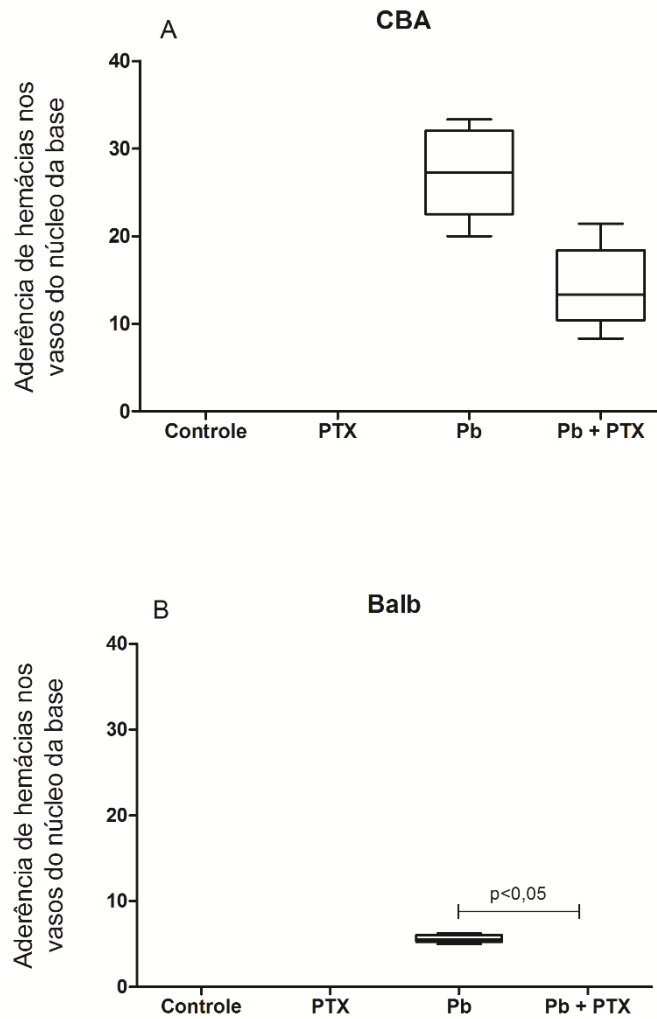


Figura 34: Número total de eritrócitos aderidos aos vasos dos núcleos da base quantificados em 10 campos em camundongos CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX). CBA: não houve relevância estatística ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). BALB/c: apresentou menor número de adesão eritrocitária após administração da PTX ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Quando comparamos a aderência de eritrócitos entre dois grupos infectados pelo plasmódio (Pb) nos dois modelos CBA e BALB/c, os camundongos BALB/c apresentaram menor aderência de eritrócitos que os CBA ( $p < 0,001$ ; teste t) (Figura 35).

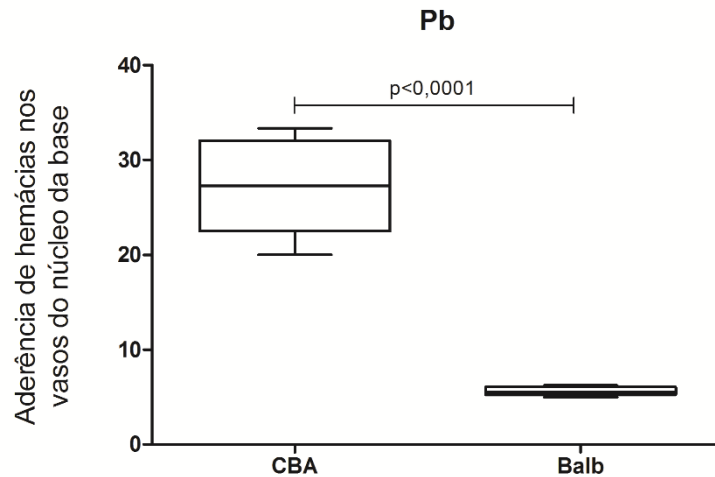


Figura 35: Número total de eritrócitos aderidos aos vasos dos núcleos da base quantificados em 10 campos em camundongos CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados tratados (Pb + PTX). Comparação entre os grupos. Pb: Houve diferença significativa entre os modelos, onde o CBA apresentou maior número de adesão eritrocitária que o modelo BALB/c ( $p < 0,0001$  teste t). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Concluimos que os animais C57BL/6 não apresentaram adesão de eritrócitos ao endotélio nos vasos dos núcleos da base, e que a pentoxifilina aparentemente diminuiu a adesão eritrocitária nos animais BALB/c, porém não foi observado o mesmo efeito de modo significativo no modelo CBA.

## 5.4 Cerebelo

No cerebelo as alterações relativas ao número de neurônios, presença de necrose neuronal, congestão vascular, aderência de eritrócitos e leucócitos foram analisadas em camundongos das três cepas estudadas (CBA, C57BL/6 e BALB/c) infectados ou não pelo *P. berghei* ANKA. Foram analisados 10 campos por preparação de cada animal (n=5) em lâminas coradas por hematoxilina-eosina (HE), e os parâmetros quantificados em objetiva de imersão (1000x)

### 5.4.a. Avaliação da influência da pentoxifilina sobre o número total de neurônios presentes em 10 campos

Em relação ao número total de neurônios quantificados em 10 campos no cerebelo observamos um menor número de neurônios nos camundongos C57BL/6 e CBA infectados pelo plasmódio do que no grupo controle, enquanto

não houve diferença para o modelo BALB/c ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguido do teste de Student-Newman-Keuls) (Figura 36).

O tratamento com a PTX foi aparentemente capaz de proteger os neurônios dos camundongos C57BL/6, mas não dos CBA. Observamos um maior número de neurônios após tratamento com a PTX no grupo C57BL/6 ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls) (Figura 36A), o que não foi observado para os camundongos CBA ( $p > 0,05$ ; ANOVA seguido do teste de Student-Newman-Keuls) (Figura 36B). Não houve modificação no número de neurônios nos animais BALB/c após a infecção.



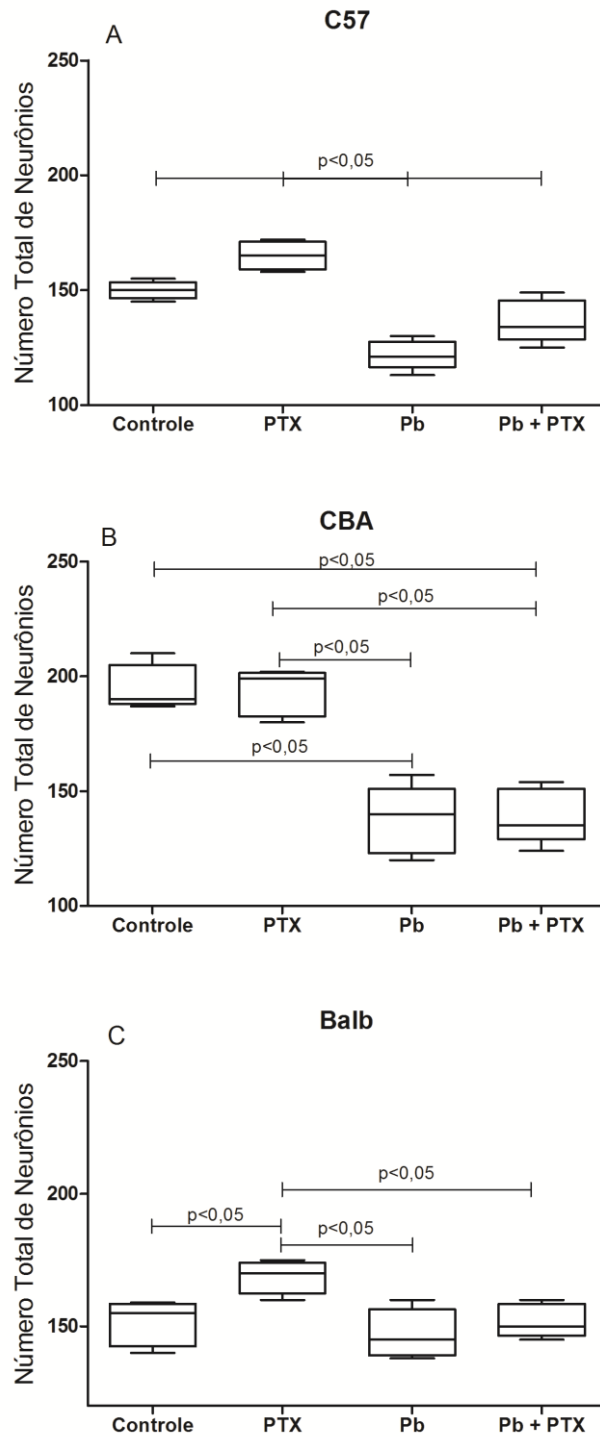
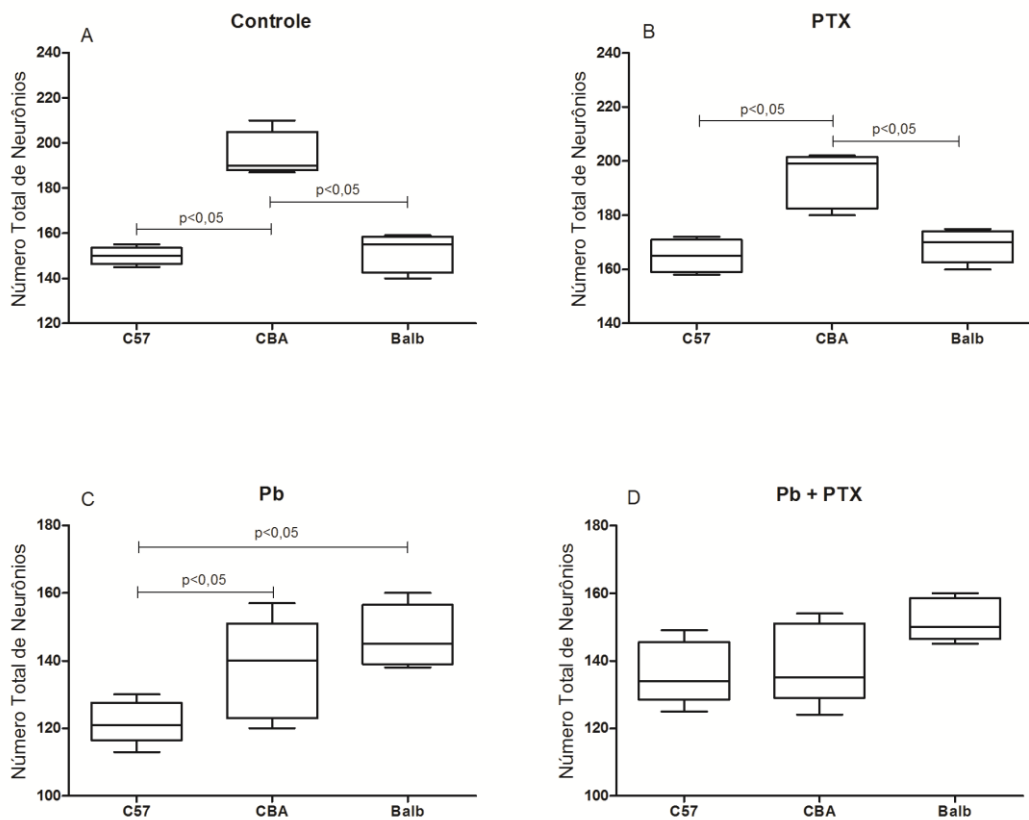


Figura 36: Número total de neurônios quantificados em 10 campos no cerebelo em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX). C57BL/6: Apresentaram diferenças significativas no total de neurônios ao comparar todos os grupos ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls). CBA: os grupos controle e tratado apresentaram maior número de neurônios que os grupos infectados ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls). BALB/c: O grupo tratado com pentoxifilina apresentou o maior número de neurônios comparando com os outros grupos ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Ao compararmos os três modelos para cada grupo, observamos que no nível basal, o modelo CBA apresentou o maior número de neurônios comparado aos outros dois modelos ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls) (Figura 37A). Este perfil foi mantido no grupo tratado com PTX ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls) (Figura 37B). No grupo infectado pelo plasmódio (Pb), observamos que o C57BL/6 estava com o menor número total de neurônios em comparação com os outros dois modelos ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls) (Figura 37C). No grupo infectado e tratado com PTX, não foram observadas quaisquer alterações significativas ( $p > 0,05$ ; ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls) (Figura 37D).



**Figura 37:** Número total de neurônios quantificados em 10 campos no cerebelo em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX). Comparação entre os grupos. Controle: Os animais CBA apresentaram um número significativamente maior do que os outros dois modelos ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls). PTX: Os animais CBA mantiveram os padrões observados no grupo controle ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls). Pb: Neste grupo, o modelo C57BL/6 apresentou menor número total de neurônios em comparação com os outros dois modelos ( $p < 0,05$  ANOVA seguido do Student-Newman-Keuls). Pb + PTX: Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$  ANOVA seguido do Student-Newman-Keuls). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Em conclusão, nos animais CBA e C57BL/6 infectados pelo plasmódio observamos um menor número total de neurônios do que nos animais BALB/c (que não desenvolvem malária cerebral), e esses animais mantiveram um número semelhante de neurônios totais mesmo após a infecção. Os animais CBA apresentaram maior número de neurônios ao administrar a PTX.

#### **5.4.b. Avaliação da influência da pentoxifilina sobre a necrose neuronal no cerebelo**

Os animais BALB/c não apresentaram quaisquer sinais de necrose neuronal no cerebelo em nenhum dos grupos estudados, tampouco houve alteração nos grupos controle e PTX dos outros dois modelos (C57BL/6 e CBA). Ambos os modelos C57BL/6 e CBA apresentaram necrose neuronal quando infectados pelo plasmódio, porém, não houve diferença estatística em relação ao grupo tratado com PTX (Pb+PTX) ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 38).

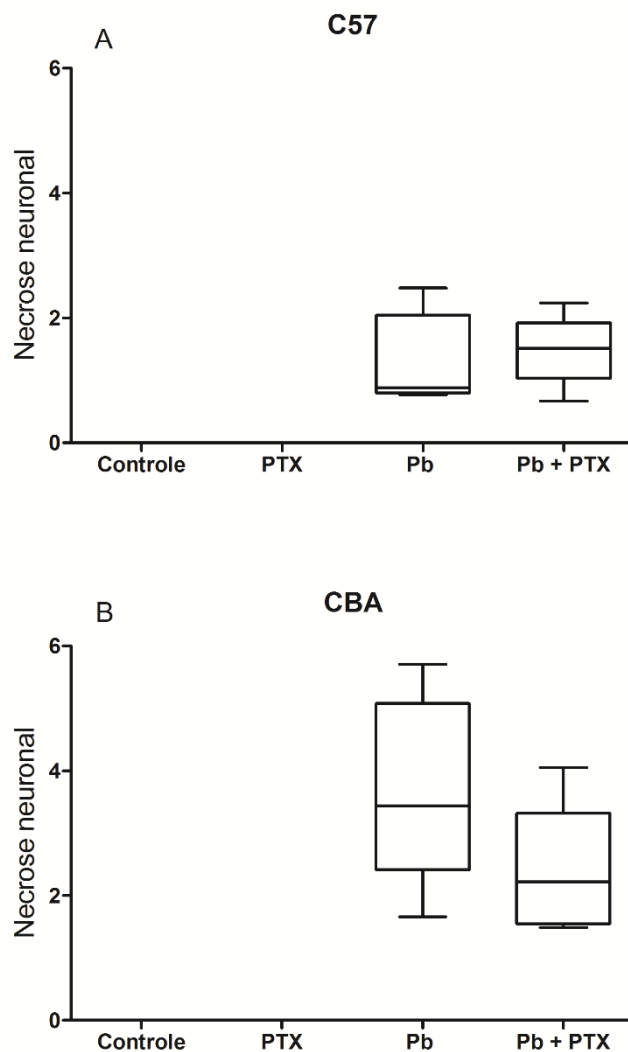


Figura 38: Número total de neurônios apresentando necrose, quantificados em 10 campos no cerebelo em camundongos C57BL/6, CBA dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX). C57BL/6 e CBA: Apresentaram necrose neuronal, porém, não apresentaram diferenças estatísticas ao comparar os grupos ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Ao comparar os grupos infectados e infectados e tratados (Pb e Pb + PTX), observamos que o modelo CBA apresentou um maior número de neurônios com necrose que o C57BL/6 ( $p=0,013$  teste t) (Figura 39A). Não houve relevância estatística ao comparar os modelos no grupo Pb + PTX ( $p=0,1216$  teste t) (Figura 39B).

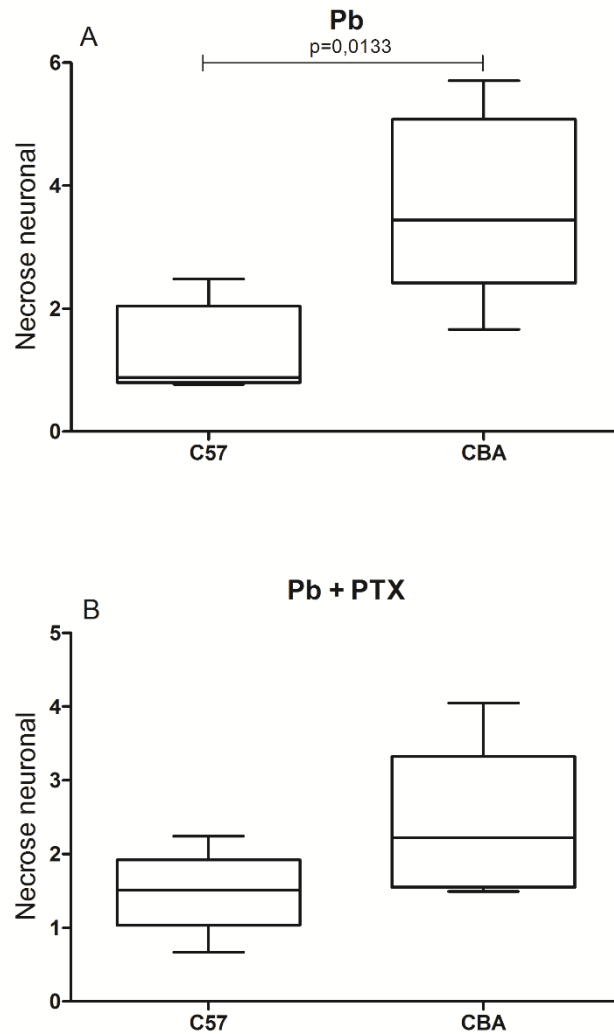


Figura 39: Número total de neurônios apresentando necrose quantificados em 10 campos no cerebelo em camundongos C57BL/6, CBA dos infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX). Comparação entre grupos. Pb: Os animais CBA apresentaram maior número de neurônios com necrose do que os C57BL/6 ( $p=0,013$  teste t). Pb + PTX: não apresentou relevância estatística ( $p=0,1216$  teste t). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Concluimos que os animais CBA apresentaram maior número de neurônios com necrose que o modelo C57BL/6, e que o animal BALB/c não apresentou necrose neuronal no cerebelo. A PTX não influenciou na presença de necrose neuronal.

#### 5.4.c. Influência da pentoxifilina sobre a congestão vascular no cerebelo

Não observamos congestão vascular nos grupos não infectados dos três modelos (controle e PTX). Os animais BALB/c apresentaram congestão vascular somente no grupo infectado e tratado com PTX ( $p = 0,0124$ ; Kruskal-Wallis) (Figura 40C), enquanto que os animais CBA e C57BL/6 apresentaram em ambos

os grupos infectados, porém, sem diferenças estatísticas entre eles ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 40).

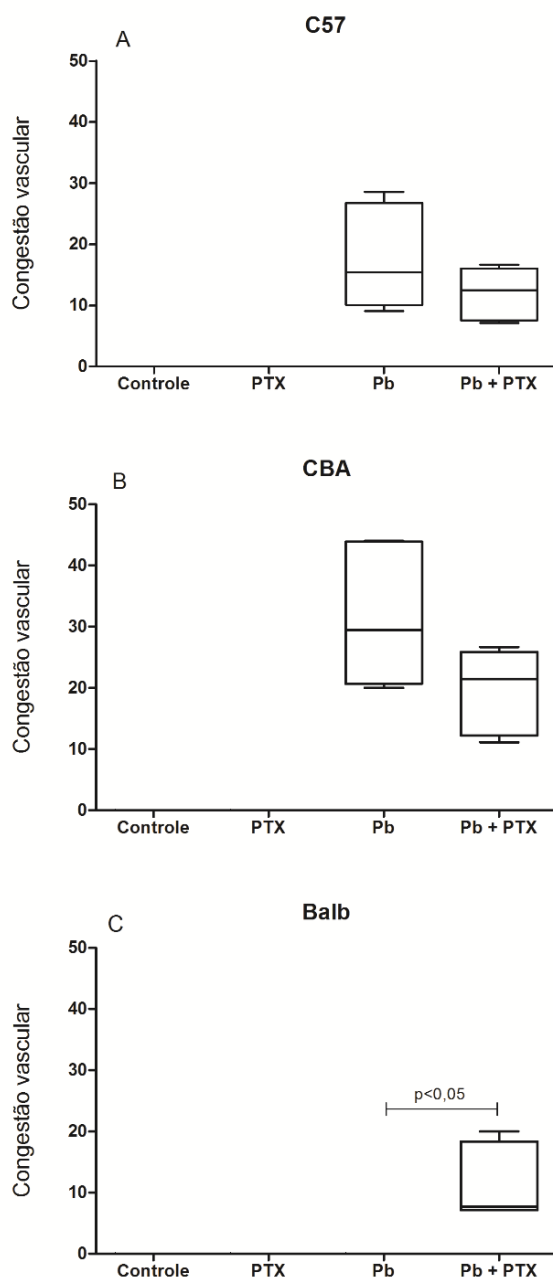


Figura 40: Número total de vasos apresentando congestão vascular, quantificados em 10 campos no cerebelo em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX). C57BL/6 e CBA: Ambos os grupos estavam com vasos congestionados, porém, não apresentaram diferenças significantes ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). BALB/c: apresentou congestão nos animais infectados e tratados com a PTX ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Ao comparar os grupos infectados (Pb e Pb + PTX), não observamos diferenças estatísticas no grupo Pb ( $p = 0,0643$  teste t) (Figura 41A), tampouco

no grupo infectado e tratado ( $p > 0,05$ ; ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls) (Figura 41B).

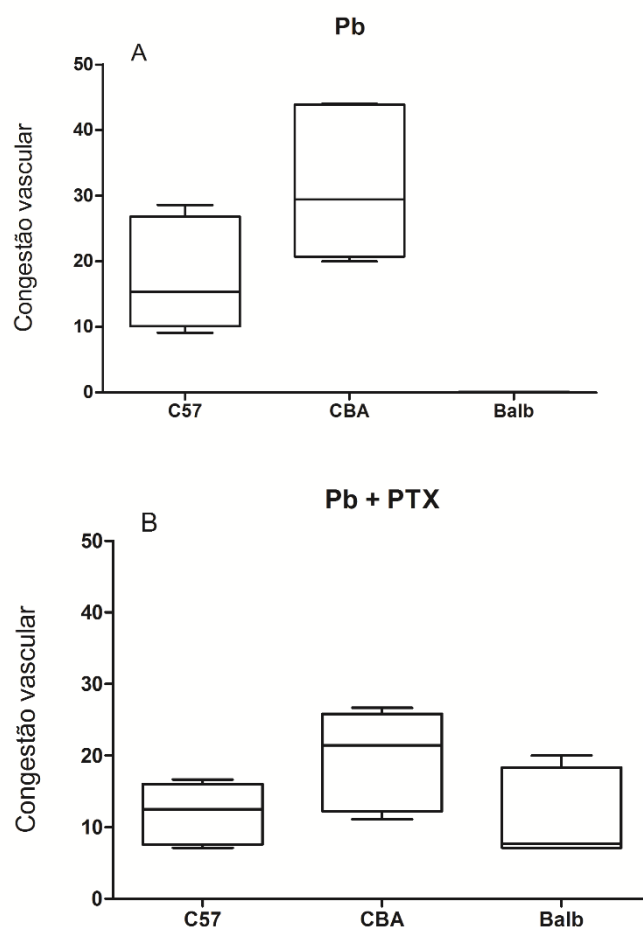


Figura 41: Número total de vasos apresentando congestão vascular, quantificados em 10 campos no cerebelo em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX). Comparação entre os grupos. Pb: não houve diferença significativa ( $p=0,06$  teste *t*). Pb + PTX: não houve relevância estatística ( $p > 0,05$  ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Em conclusão, observamos que a PTX influenciou na congestão vascular nos animais BALB/c, e não influenciou em nada nos outros dois modelos.

#### 5.4.d. Influência da pentoxifilina na aderência de leucócitos ao endotélio vascular do cerebelo

Observamos que os animais BALB/c não apresentaram quaisquer sinais de aderência de leucócitos ao endotélio vascular em todos os grupos analisados, tampouco houve alteração nos grupos controle e PTX dos outros dois modelos. O modelo C57BL/6 apresentou aderência em ambos os grupos infectados (Pb e

Pb + PTX), porém, ao compararmos estes grupos, não houve diferença estatística entre eles ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 42A). O mesmo foi observado nos animais CBA ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 42B).

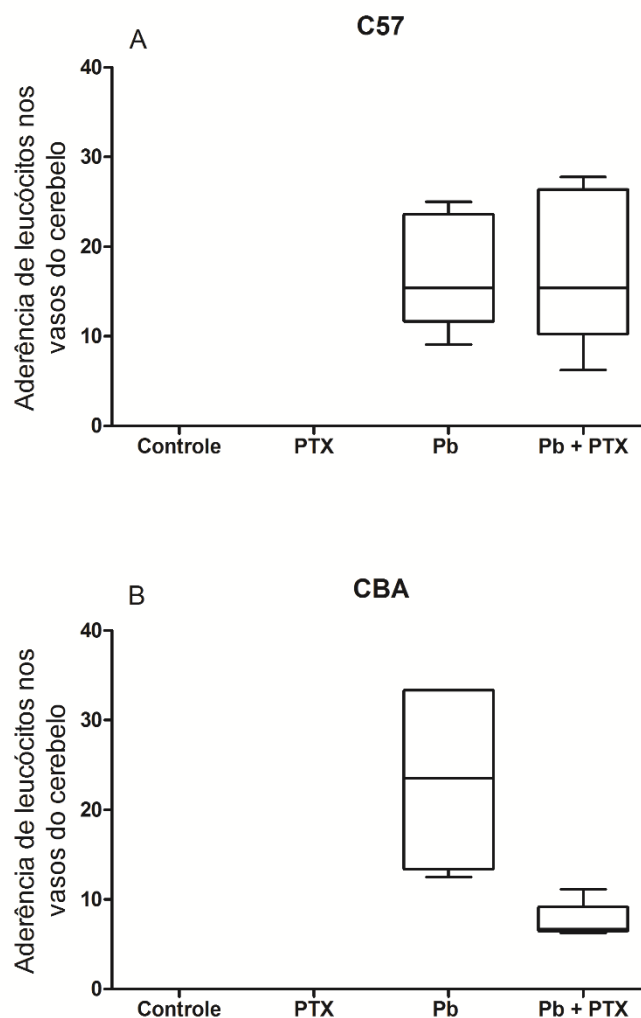


Figura 42: Número total de leucócitos aderidos ao endotélio dos vasos do cerebello, quantificados em 10 campos no cerebello, em camundongos C57BL/6, CBA e dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX). C57BL/6: Não apresentou diferença significativa na comparação entre grupos para os animais infectados ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). CBA: Não apresentou diferença estatística na comparação entre os grupos infectados ( $p > 0,05$  Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Observamos que ao comparar os grupos infectados pelo plasmódio (Pb e Pb + PTX) nos animais C57BL/6 e CBA, não houve quaisquer diferenças entre os grupos nos animais C57BL/6 ( $p = 0,2763$  teste t), tampouco para os CBA ( $p = 0,1161$  teste de Mann Whitney) (Figura 43).



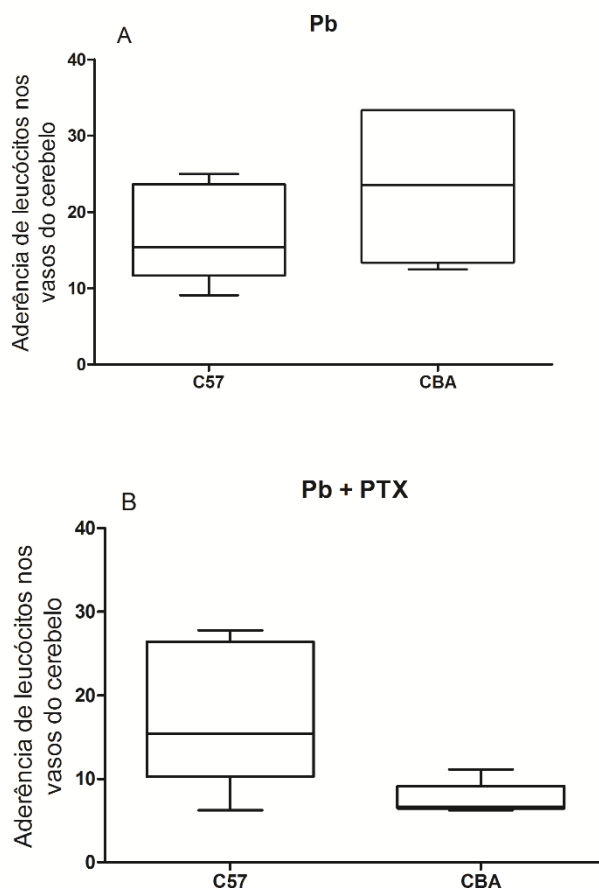


Figura 43: Número total de leucócitos aderidos ao endotélio dos vasos do cerebelo, quantificados em 10 campos no cerebelo em camundongos C57BL/6, CBA e dos grupos infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX). Comparação entre grupos. Pb: Não houve alteração significativa ( $p=0,2763$  teste t). CBA: Não houve diferença estatística ( $p=0,1161$  teste de Mann Whitney). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Concluimos que ambos os modelos que desenvolvem malária cerebral (CBA e C57BL/6) apresentaram adesão de leucócitos no cerebelo, entretanto, não observamos influência da PTX sobre a aderência. O modelo BALB/c não apresentou aderência leucocitária (Figura 42).

#### 5.4.e. Influência da pentoxifilina sobre a aderência de eritrócitos ao endotélio vascular do cerebelo

Nenhum dos grupos não infectados (controle e PTX) apresentou aderência de eritrócitos ao endotélio dos vasos no cerebelo. Para os grupos infectados pelo plasmódio (Pb), observamos que apenas os animais CBA apresentaram adesão de eritrócitos ao endotélio dos vasos, entretanto, não observamos efeitos da PTX sobre a aderência ( $p>0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 44B). Entretanto, observamos que

após o tratamento com a pentoxifilina dos animais infectados dos modelos BALB/c e C57BL/6 apareceu aderência dos eritrócitos ao endotélio dos vasos, que não estava presente nos animais infectados sem o tratamento com a PTX ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 44A e 44C).

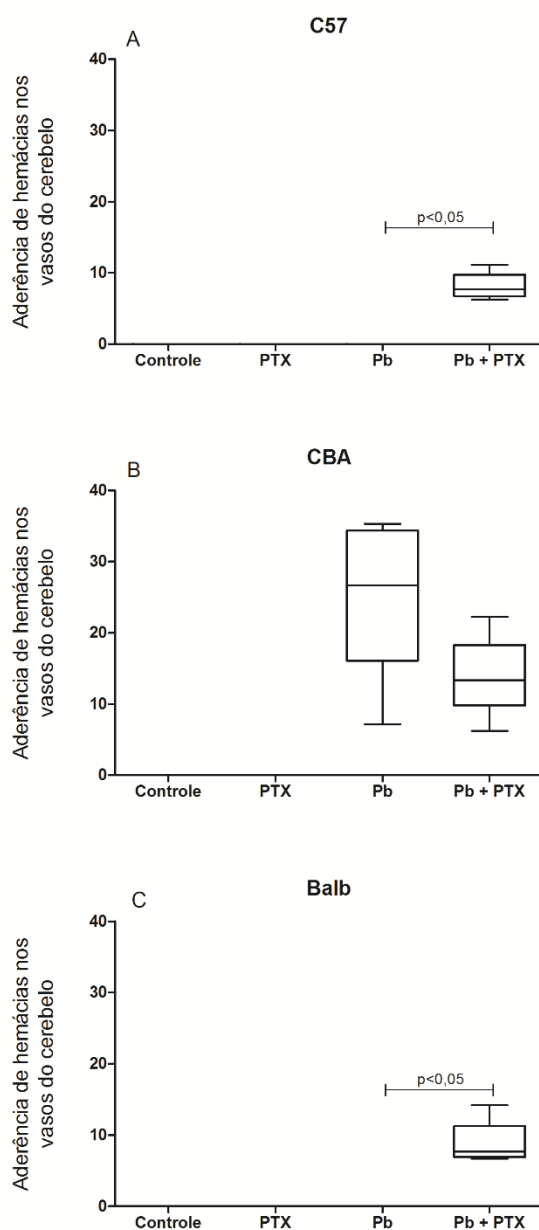


Figura 44: Número total de eritrócitos aderidos ao endotélio dos vasos do cerebelo, quantificados em 10 campos no cerebelo em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX). C57BL/6: Apresentou aderência após o tratamento com a PTX no grupo infectado ( $p = 0,0124$ ; Kruskal-Wallis). CBA: Apresentou aderência em ambos os grupos infectados, porém, sem significância estatística ao compararmos Pb vs Pb + PTX ( $p > 0,05$  Kruskal-Wallis seguido método de comparação de Dunn). BALB/c: Apresentou aderência após administração da PTX, semelhante ao C57BL/6 ( $p = 0,0124$ ; Kruskal-Wallis). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Observamos que ao comparar os três modelos do grupo Pb + PTX, não houve qualquer diferença estatística ( $p=0,2392$  Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). (Figura 45)

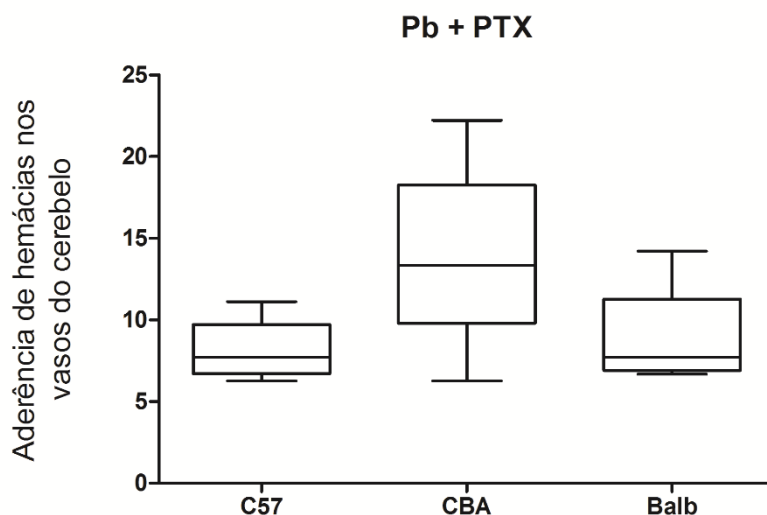


Figura 45: Número total de eritrócitos aderidos ao endotélio vascular, quantificados em 10 campos no cerebelo em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos infectados e tratados com PTX (Pb + PTX). Comparação entre grupos. Pb + PTX: não houve diferença estatística na comparação entre os três modelos ( $p=0,2392$  Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Em conclusão, observamos que a PTX aumentou a adesão de eritrócitos no cerebelo, para os modelos BALB/c e C57BL/6, e que a PTX não modificou a aderência dos eritrócitos ao endotélio nos animais CBA.

## 5.5 Fígado

No fígado as alterações (aspectos gerais dos hepatócitos, aderência de hemácias e leucócitos nos vasos do espaço porta e sinusóides e infiltrados celulares) foram analisadas em camundongos das três cepas estudadas (CBA, C57BL/6 e BALB/c) infectados ou não pelo *P. berghei* ANKA. Foram analisados 10 campos por preparação de cada animal ( $n = 5$ ) em lâminas coradas por hematoxilina-eosina (HE), e os parâmetros quantificados em objetiva de imersão (1000X)

### 5.5.1.Sinusóides

### **5.5.1.a. Avaliação da influência da pentoxifilina sobre o número total de células de Kupffer**

Para os camundongos C57BL/6, o número total de células de Kupffer foi maior no grupo infectado pelo plasmódio do que nos grupos não infectados. Nos animais dos três modelos estudados, o número de células de Kupffer em 10 campos foi maior no grupo de animais infectados pelo plasmódio e tratado com a PTX (Pb+PTX): (para os camundongos C57BL/6:  $p < 0,05$ ; ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls;  $PTX < Pb$  e  $Pb + PTX$ ) (Figura 46A); (para os camundongos CBA:  $p < 0,05$ ; ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls) (Figura 46B); (para os camundongos BALB/c:  $p < 0,05$ ; ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls;  $Pb + PTX > C$  e  $PTX$ ) (Figura 46C).

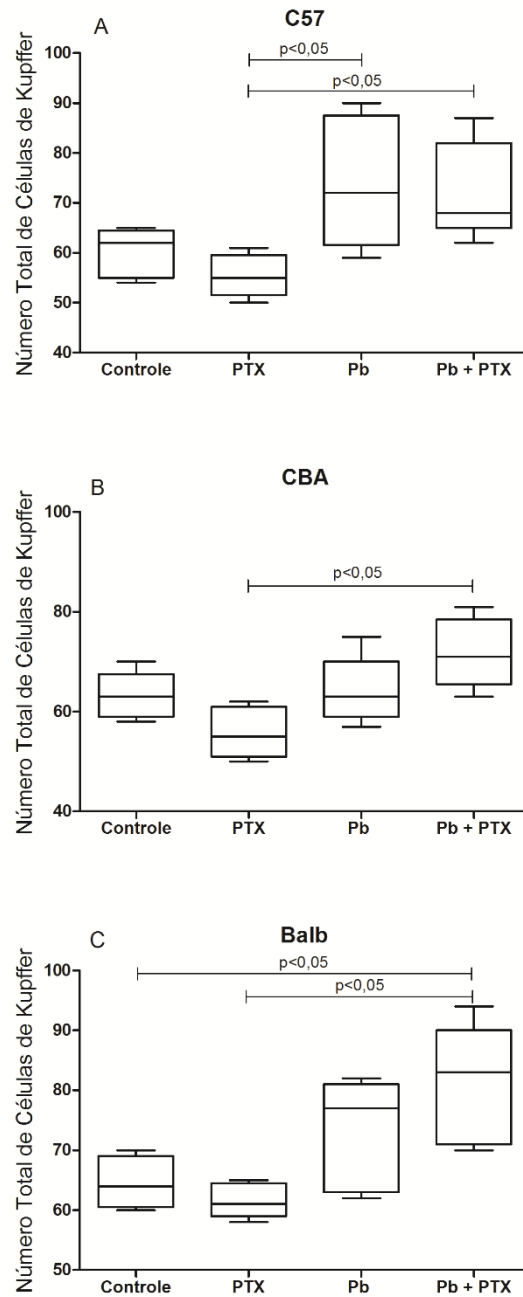


Figura 46: Número total de células de Kupffer quantificados em 10 campos no fígado de camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX). Número total de células no grupo Pb + PTX maior que os outros grupos em todas as linhagens ( $p < 0,05$  ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Ao comparar os quatro grupos dos três modelos experimentais, não observamos diferenças estatísticas (Figura 47).

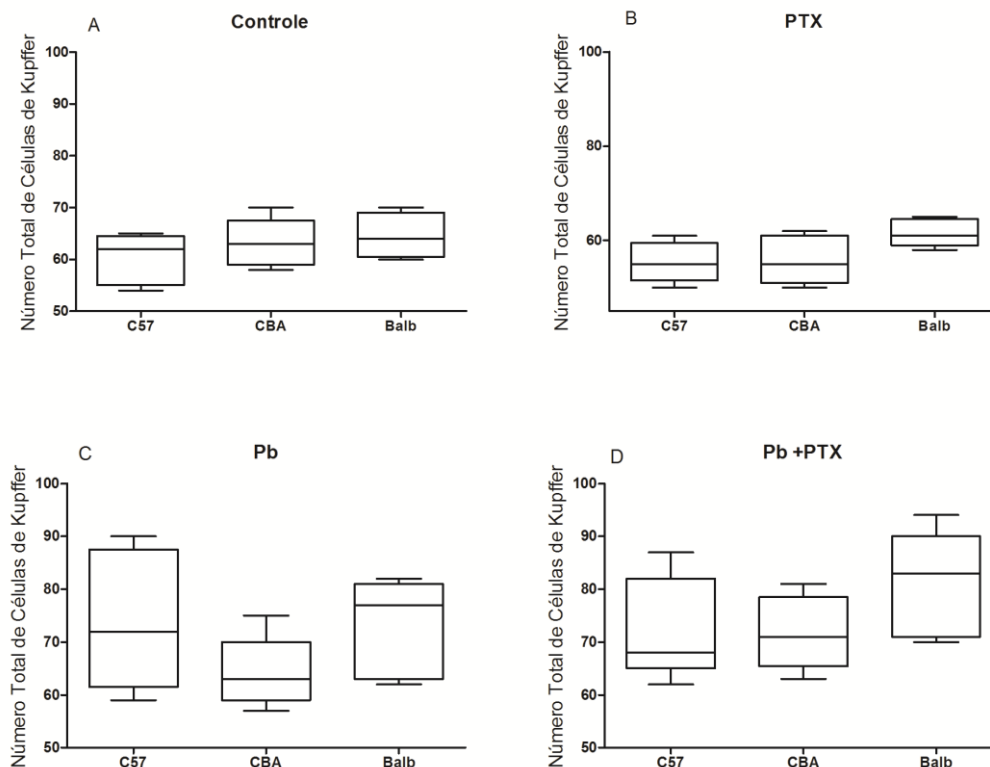


Figura 47: Número total de células de Kupffer quantificados em 10 campos no fígado de camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX). Não houve diferenças significativas em todas as comparações ( $p > 0,05$  ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Concluimos que nos animais infectados e tratados com a PTX, o número total de células de Kupffer foi maior do que os outros grupos para os três modelos de camundongos estudados.

### 5.5.1.b. Avaliação da influência da pentoxifilina no número total de células de Kupffer com pigmento malárico

Os grupos controle e PTX não foram incluídos nesta análise, pois os animais não foram infectados pelo plasmódio.

Observamos que nos animais C57BL/6 ( $p = 0,0227$  teste t) e BALB/c ( $p = 0,0230$  teste t) infectados pelo plasmódio e tratados com a PTX o número de células de Kupffer com pigmento malárico foi significativamente menor do que no grupo não tratado (Figuras 48A e 48C). Para os camundongos CBA, a diminuição do número de células de Kupffer com pigmento malárico não foi estatisticamente significativa ( $p = 0,2288$  teste t) (Figura 48B).

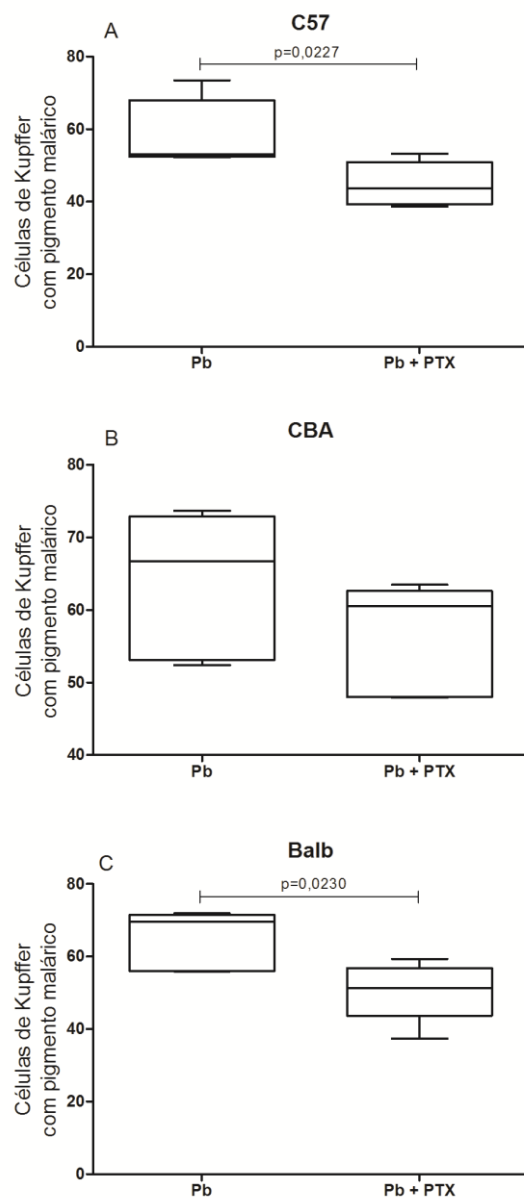


Figura 48: Número total de células de Kupffer com pigmento malárico quantificados em 10 campos no fígado de camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX). C57BL/6: No grupo Pb + PTX o número total de células com pigmento malárico foi menor que no grupo Pb ( $p=0,0227$  teste t). BALB/c: Observamos efeito similar ao do modelo C57BL/6 ( $p=0,0230$  teste t). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Não houve diferença estatística na comparação dos grupos entre os três modelos experimentais ( $p>0,05$  ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls) (Figura 49)

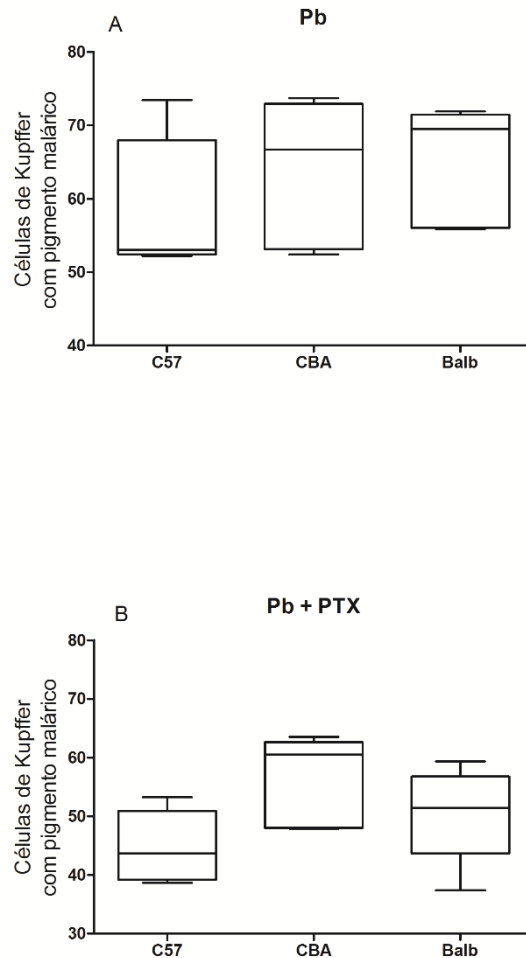


Figura 49: Número total de células de Kupffer com pigmento malárico quantificados em 10 campos no fígado em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX). Comparação entre grupos. Pb e Pb + PTX: Não houve alterações significativas quando comparados ( $p > 0,05$  ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Concluimos que nos animais infectados pelo plasmódio e tratados com a PTX o número de células de Kupffer com pigmento malárico no fígado dos animais C57BL/6 e BALB/c foi menor do que no fígado dos animais destes grupos não tratados pela droga (Pb).

### 5.5.1.c. Avaliação da influência da pentoxifilina no número total de sinusóides hepáticos com pigmento malárico

Os grupos não infectados não foram incluídos nesta análise.

Não observamos alterações significativas nos três modelos estudados em ambos os grupos (Pb e Pb + PTX) ( $p > 0,1$  teste t) (Figura 50).



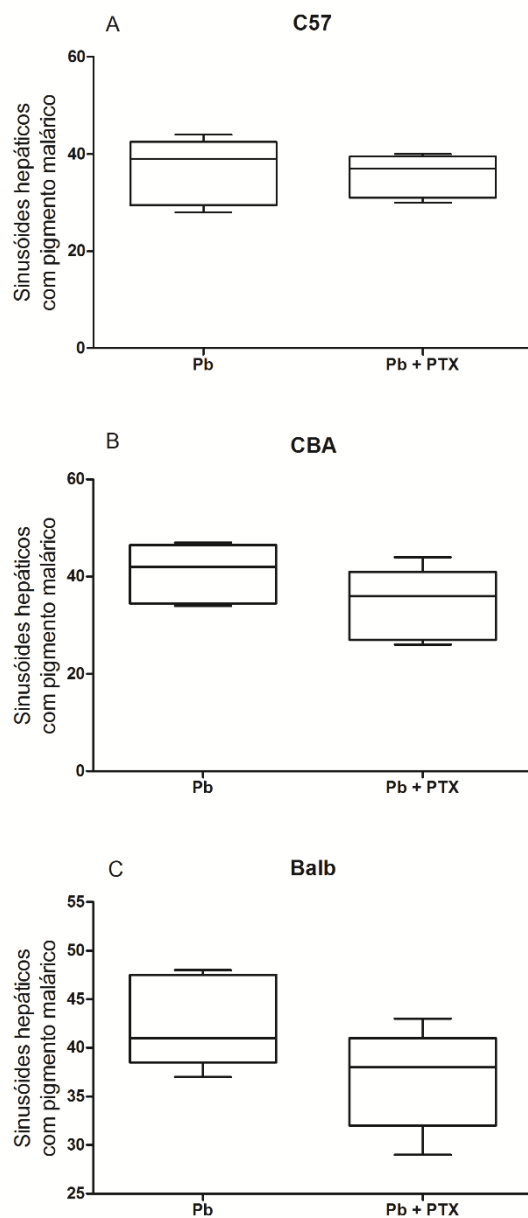


Figura 50: Número total de sinusóides hepáticos com pigmento malárico quantificados em 10 campos no fígado de camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX). Não houve alterações significativas nos três modelos experimentais ( $p > 0,1$  teste  $t$  não pareado). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Ao comparar os dois grupos nos três modelos, também não foram observadas alterações significativas no número de sinusóides com pigmento malárico ( $p > 0,05$  ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls) (Figura 51).

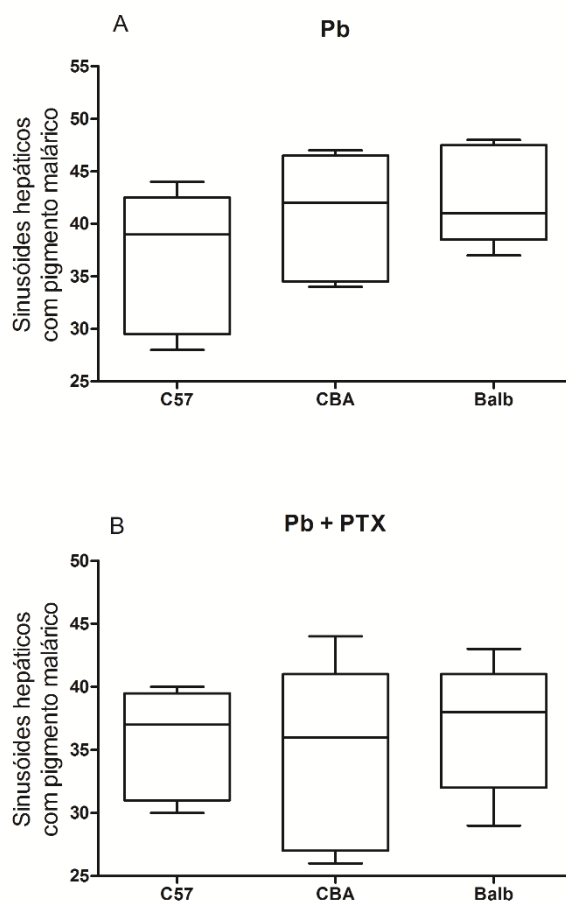


Figura 51: Número total de sinusóides com pigmento malárico quantificados em 10 campos no fígado em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c dos grupos infectados (Pb) e infectados e tratados com PTX (Pb + PTX). Comparação entre grupos. Pb e Pb + PTX: não houve alterações significativas entre os animais ( $p > 0,05$  ANOVA seguido de Student Newman-Keuls). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Concluimos que a PTX não foi capaz de modificar o número total de sinusóides hepáticos com pigmento malárico nos modelos estudados.

Observamos que nem a infecção pelo plasmódio tampouco o tratamento com a PTX, influenciaram a aderência de hemácias parasitadas ou não ao endotélio dos sinusóides, adesão de células mononucleares entre si, ao endotélio, e pigmento malárico nas células mononucleares (Tabela 2).

**Tabela 2: Aspectos histopatológicos nos modelos e grupos nos sinusóides hepáticos.**

Sinusóides Hepáticos					
Aspectos Histopatológicos		C57BL/6 (n=5) Mediana (Quartis)	CBA (n=5) Mediana (Quartis)	BALB/c (n=5) Mediana (Quartis)	Teste (p) C57BL/6 vs CBA vs BALB/c
Pigmento malárico	Controle	-	-	-	-
	PTX	-	-	-	-
	Pb	39 (29,5-45,5)	42 (34,5-46,5)	41 (38,5-47,5)	p>0,05*
	Pb + PTX	37 (31-39,5)	36 (27-41)	38(32-41)	p>0,05*
Hemácias não parasitadas aderidas ao endotélio	Controle	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	-
	PTX	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	-
	Pb	0 (0-0)	60 (35-80)	60 (30-100)	p=0,7745**
	Pb + PTX	0 (0-0)	60 (15-80)	40 (10-65)	p=0,5622**
Hemácias parasitadas aderidas ao endotélio	Controle	-	-	-	-
	PTX	-	-	-	-
	Pb	0 (0-0)	50 (75-10)	70 (40-100)	p=0,2982**
	Pb + PTX	0 (0-0)	30 (10-45)	10 (10-30)	p=0,4884**
CMN aderidas ao endotélio	Controle	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	-
	PTX	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	-
	Pb	99,99 (99,98-100)	99,98 (90-100)	99,98 (99,97-100)	p>0,05*
	Pb + PTX	90 (75-100)	90 (80-100)	99,98 (90-100)	p>0,05*
CMN aderidas entre si	Controle	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	-
	PTX	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	-
	Pb	0 (0-0) -	15 (10-20)	25 (10-30)	p=0,5796**
	Pb + PTX	0 (0-0)	10 (10-10)	35 (30-40)	p=0,3947**
CMN com pigmento malárico	Controle	-	-	-	-
	PTX	-	-	-	-
	Pb	100 (100-100)	90 (90-100)	100 (100-100)	p>0,05*
	Pb + PTX	90 (90-100)	80 (65-95)	90 (75-100)	p>0,05*

\*Student-Newman-Keuls ou Método de comparação de Dunn; \*\*teste t;  
CMN – Células mononucleares.

## **5.5.2. Espaço Porta**

### **5.5.2.a. Avaliação da influência da pentoxifilina na adesão de células mononucleares no endotélio dos vasos do espaço porta**

Os grupos não infectados (Controle e PTX) não apresentaram células mononucleares aderidas aos vasos do espaço porta.

No modelo C57BL/6 observamos adesão de células mononucleares no grupo infectado (Pb), e também que a droga aparentou menor adesão de células mononucleares no endotélio dos vasos do espaço porta ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 52A). Entretanto, o modelo CBA não apresentou diferença na adesão de células mononucleares ao comparar os dois grupos (Figura 52B). Os animais BALB/c apresentaram um resultado contrário do observado nos C57BL/6, onde o grupo infectado pelo plasmódio e tratado com pentoxifilina apresentou um efeito de adesão de células mononucleares maior que no observado na outra linhagem ( $p < 0,05$  Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 52C).

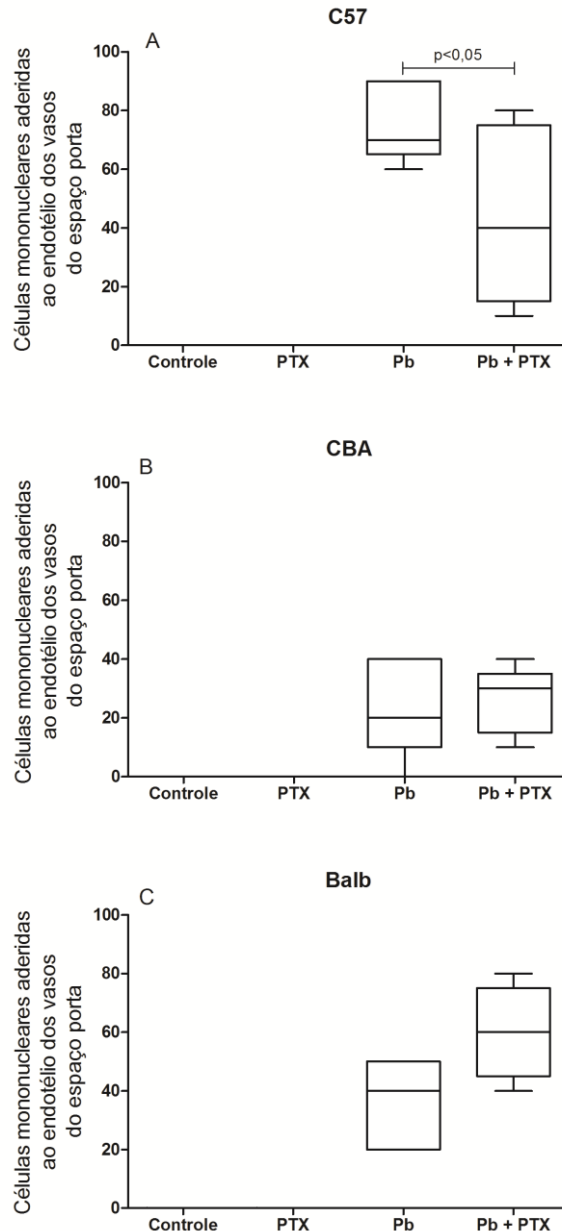


Figura 52: Número de células mononucleares aderidas ao endotélio dos vasos do espaço porta quantificados em 10 campos no fígado de camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c nos grupos Controle, tratados (PTX), infectados (Pb) e infectados e tratados (Pb + PTX). C57BL/6: apresentaram uma menor adesão no grupo Pb para o Pb + PTX, ( $p < 0,05$  Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) CBA: Não apresentou diferenças significativas ( $p > 0,05$  Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). BALB/c: apresentaram maior adesão sob influência da droga ( $p < 0,05$  Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Quando comparamos as respostas nas três linhagens, foi observado uma diferença significativa no grupo infectado pelo plasmódio (Pb), os animais C57BL/6 apresentaram o maior número de aderência de células mononucleares (C57 > BALB e CBA,  $p < 0,05$ ; ANOVA Student-Newman-Keuls) (Figura 53A). Entretanto, não foram observadas alterações significativas na comparação do

grupo Pb + PTX ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls) (Figura 53B).

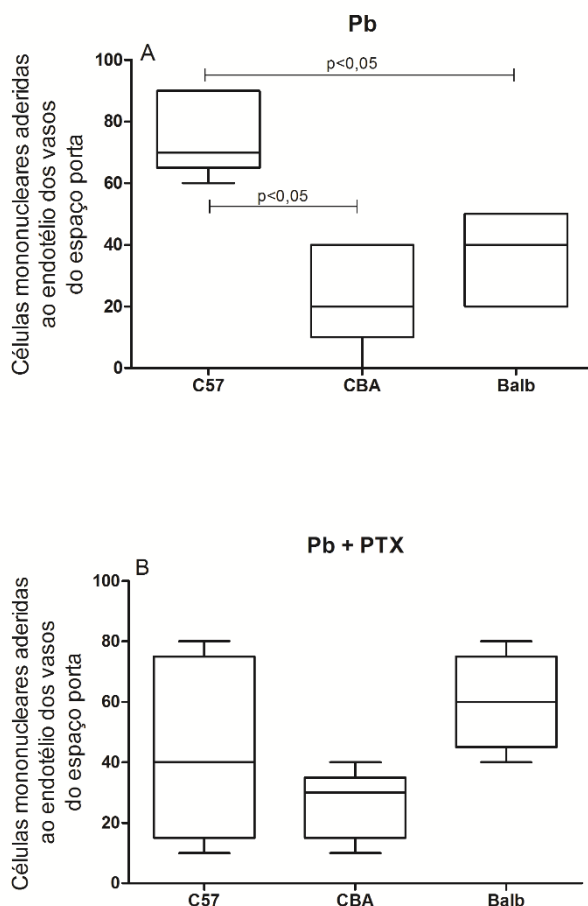


Figura 53: Número de células mononucleares aderidas ao endotélio dos vasos do espaço porta quantificados em 10 campos no fígado de camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c nos grupos infectados (Pb) e infectados e tratados (Pb + PTX). Comparação entre grupos. Pb: os animais C57BL/6 apresentaram um maior número de células mononucleares aderidas ao endotélio dos vasos do espaço porta em comparação com os outros dois modelos ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls). Pb + PTX: não apresentaram diferenças relevantes ( $p > 0,05$ ; ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Concluimos que o animal C57BL/6 apresentou maior número de células mononucleares e que após administração da droga a aderência destas células foi menor no endotélio dos vasos do espaço porta. Os animais CBA foram os que apresentaram menor número de células mononucleares aderindo aos vasos. Os animais BALB/c apresentaram aderência mediana e a adesão foi maior após administração da droga.

### 5.5.2.b. Avaliação da influência da pentoxifilina na adesão entre si de células mononucleares nos vasos do espaço porta

Observamos que os animais dos grupos não infectados (Controle e PTX) não apresentaram aderência de células mononucleares entre si nos vasos do espaço porta. Os outros três modelos apresentaram adesão de células mononucleares entre si nos vasos do espaço porta, para os dois grupos infectados (Pb e Pb + PTX), porém, não observamos influência significativa da droga na adesão de células mononucleares entre si ( $p > 0,05$  Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 54)

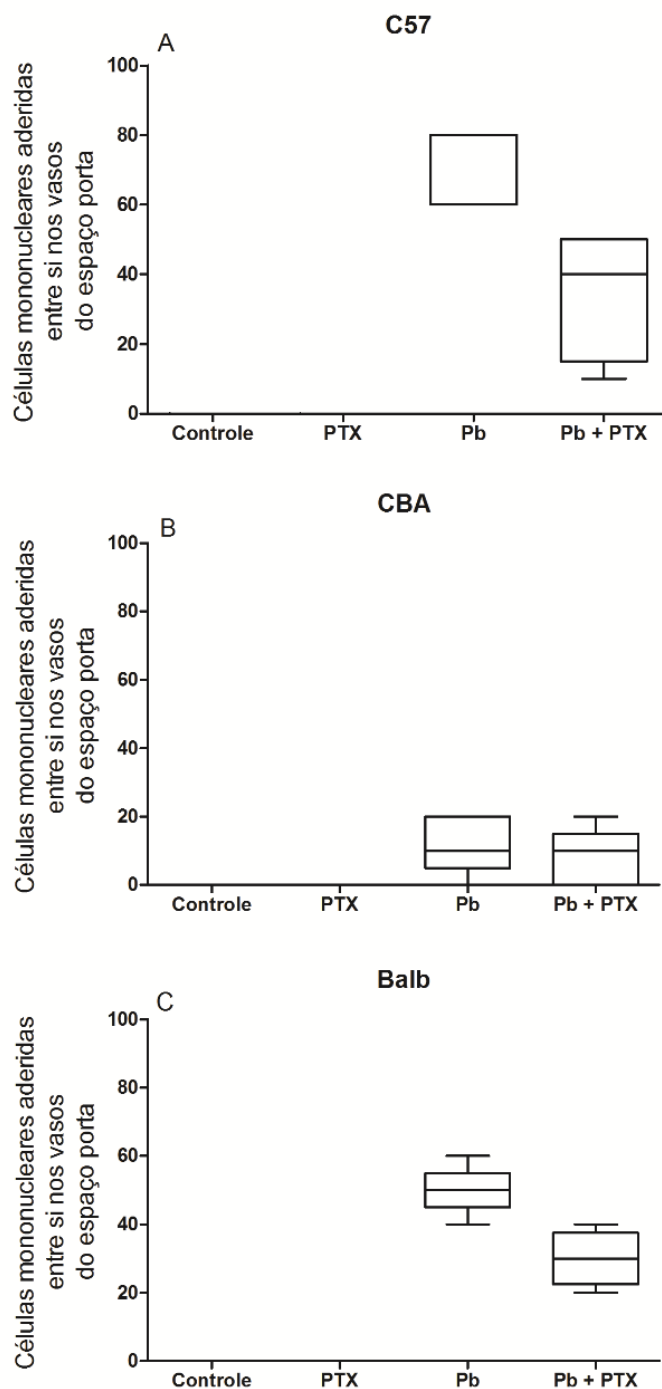


Figura 54: Células mononucleares aderidas entre si nos vasos do espaço porta quantificados em 10 campos no fígado de camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c nos grupos Controle, tratados (PTX), infectados (Pb) e infectados e tratados (Pb + PTX). Em nenhum dos três gráficos observou-se influência significativa da droga no número de células aderidas entre si nos vasos do espaço porta ( $p > 0,05$  Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Ao comparar os grupos, observamos que o modelo C57BL/6 apresentou maior número de células mononucleares aderidas entre si do que o modelo



BALB/c no grupo Pb, e que este padrão foi observado no grupo infectado e tratado (Pb + PTX) (Figura 55)

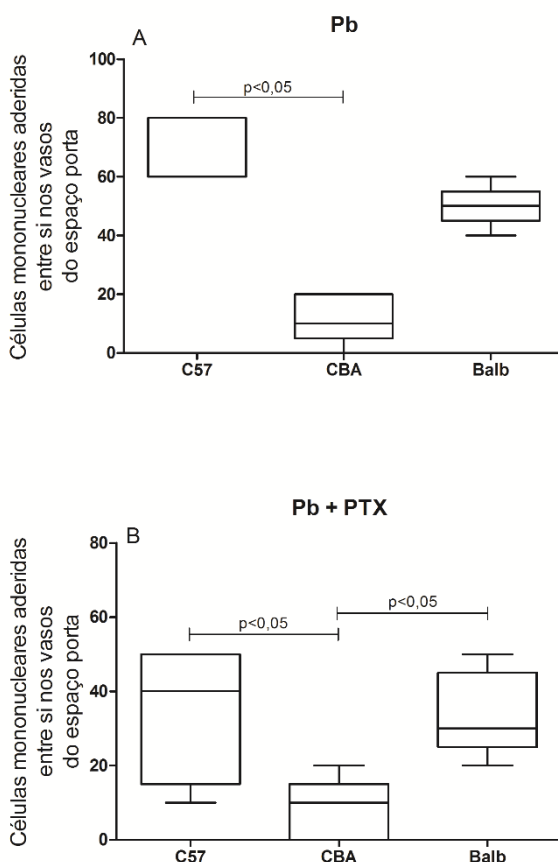


Figura 55: Células mononucleares aderidas entre si nos vasos do espaço porta quantificados em 10 campos no fígado de camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c nos grupos infectados (Pb) e infectados e tratados (Pb + PTX). Comparação entre grupos. Em ambos os grupos, o modelo C57BL/6 apresentou maior aderência de células mononucleares entre si do que o BALB/c ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls). Os dados estão representados por medianas, quartis inferiores e superiores, limites mínimos e máximos.

Concluimos que os animais C57BL/6 e BALB/c apresentaram maior número de adesão de células mononucleares entre si, do que o CBA, e que a droga não foi capaz de influenciar significativamente esse parâmetro.

### 5.5.2.c. Avaliação da influência da pentoxifilina na quantidade de células mononucleares com pigmento malárico nos vasos do espaço porta

Os grupos não infectados (Controle e PTX) não fizeram parte desta análise.

Observamos que os animais C57BL/6 apresentaram menor número de células mononucleares com pigmento malárico no grupo tratado com a droga pentoxifilina (Pb + PTX) ( $p=0,0232$  teste de Mann Whitney) (Figura 56A). Os animais CBA e BALB/c apresentaram células mononucleares com pigmento malárico nos vasos do espaço porta, entretanto, a droga não proporcionou um efeito significativo ( $p>0,05$  teste de Mann Whitney) (Figura 56B).

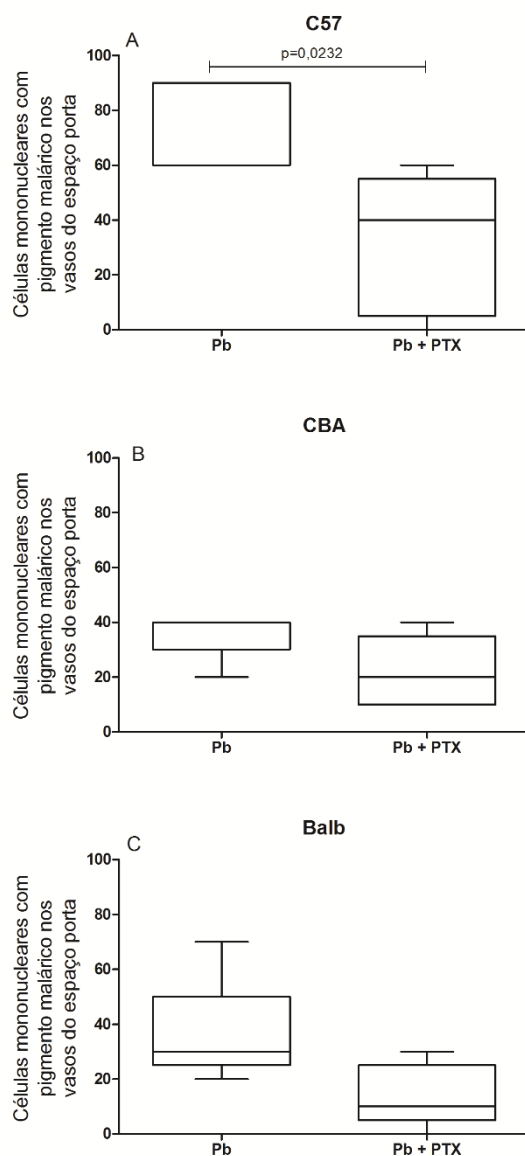


Figura 56: Número de células mononucleares com pigmento malárico nos vasos do espaço porta quantificados em 10 campos no fígado de camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c nos grupos infectados (Pb) e infectados e tratados (Pb + PTX). C57BL/6: Apresentou menor número de células com pigmento ao comparar os grupos Pb e Pb + PTX ( $p=0,0232$  teste de Mann Whitney). CBA e BALB/c: Não houve relevância estatística ( $p>0,05$  teste de Mann Whitney). Os dados estão representados por medianas, quartis inferiores e superiores, limites mínimos e máximos.

Ao comparar os grupos, nós observamos que os animais C57BL/6 apresentaram um maior número de células mononucleares com pigmento malárico do que o BALB/c ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 57A), entretanto, não houve diferença ao comparar todos os grupos infectados e sob influência da droga ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 57B).

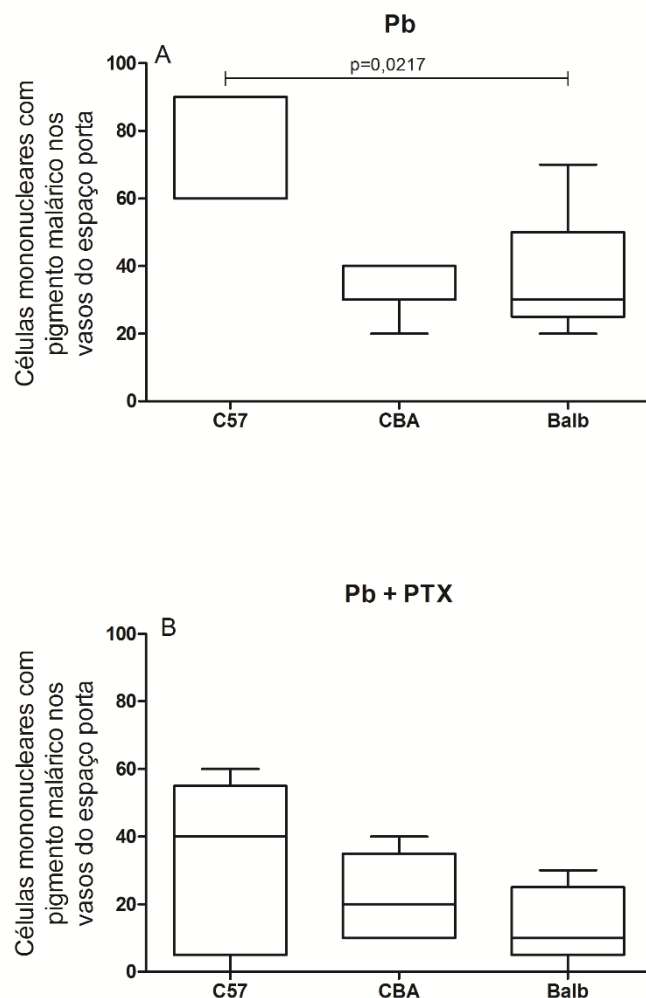


Figura 57: Número de células mononucleares com pigmento malárico nos vasos do espaço porta quantificados em 10 campos no fígado de camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c nos grupos infectados (Pb) e infectados e tratados (Pb + PTX). Comparação entre grupos. Pb: os animais C57BL/6 apresentaram maior número de células mononucleares com pigmento malárico que o BALB/c ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Pb + PTX: Não houve diferenças estatísticas ( $p > 0,05$  Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados por medianas, quartis inferiores e superiores, limites mínimos e máximos.

Concluimos que os animais C57BL/6 são os que apresentam maior número de células mononucleares com pigmento malárico comparado com os modelos BALB/c, e que após administração da droga, o número total destas

células no C57BL/6 foi menor e não foi estatisticamente significativa nos outros dois modelos.

Observamos que nem a infecção pelo plasmódio tampouco o tratamento com a PTX, influenciaram a aderência de hemácias parasitadas ou não entre si ou ao endotélio dos vasos do espaço porta, e adesão de células mononucleares a hemácias parasitadas ou não (Tabela 3).

**Tabela 3: Aspectos histopatológicos nos modelos e grupos nos vasos do espaço porta.**

Vasos do espaço porta					
Aspectos Histopatológicos		C57BL/6 Mediana (quartis)	CBA Mediana (quartis)	BALB/c mediana (Quartis)	Test (p) C57BL/6 vs CBA vs BALB/c
Hemácias não parasitadas aderidas entre si	Controle	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	-
	PTX	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	-
	Pb	20 (0-30)	40 (30-45)	10 (5-60)	p>0,05**
	Pb + PTX	0 (0-45)	0 (0-20)	10 (0-25)	p>0,05**
Hemácias parasitadas aderidas entre si	Controle	-	-	-	-
	PTX	-	-	-	-
	Pb	20 (0-30)	40 (30-40)	20 (5-60)	p>0,05**
	Pb + PTX	0 (0-45)	10 (0-20)	10 (0-20)	p>0,05**
Hemácias não parasitadas aderidas ao endotélio	Controle	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	-
	PTX	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	-
	Pb	0 (0-0)	20 (20-65)	50 (20-80)	p=0,5522*
	Pb + PTX	0 (0-20)	20 (10-45)	10 (0-20)	p>0,05**
Hemácias parasitadas aderidas ao endotélio	Controle	-	-	-	-
	PTX	-	-	-	-
	Pb	0 (0-0)	30 (0-60)	50 (10-80)	p=0,5012*
	Pb + PTX	0 (0-45)	10 (5-45)	10 (0-10)	p>0,05**
CMN aderidas ao endotélio	Controle	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	-
	PTX	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	-
	Pb	70 (65-90)	20 (10-40)	40 (20-50)	p<0,05**
	Pb + PTX	40 (15-75)	30 (15-35)	60 (45-75)	p>0,05**
CMN aderidas entre si	Controle	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	-
	PTX	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	-
	Pb	60 (60-80)	10 (5-20)	50 (45-55)	p<0,05**
	Pb + PTX	40 (15-50)	10 (0-15)	30 (22,5-37,5)	p<0,05**
CMN aderidas a hemácias não parasitadas	Controle	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	-
	PTX	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	-
	Pb	0 (0-0)	20 (20-30)	30 (10-40)	p=0,5851*
	Pb + PTX	0 (0-0)	10 (0-30)	0 (0-10)	p=0,5947*
CMN aderidas a hemácias parasitadas	Controle	-	-	-	-
	PTX	-	-	-	-
	Pb	0 (0-0)	20 (20-25)	30 (10-40)	p=0,4339*
	Pb + PTX	0 (0-0)	10 (0-10)	10 (0-10)	p=1*
CMN com pigmento malárico	Controle	-	-	-	-
	PTX	-	-	-	-
	Pb	60 (60-90)	40 (30-40)	30 (25-50)	p<0,05**
	Pb + PTX	40 (5-45)	20 (10-35)	10 (5-25)	p>0,05**

\*Teste t ou Mann Whitney; \*\*Student-Newman-Keuls ou método de comparação de Dunn; CMN – Células mononucleares

## **5.6. Pulmão**

No pulmão, as alterações (aspectos gerais dos septos e alvéolos, congestão dos vasos, infiltrados celulares) foram analisadas em camundongos das três cepas estudadas (CBA, C57BL/6 e BALB/c) infectados ou não pelo *P. berghei* ANKA. Foram analisados 10 campos por preparação de cada animal (n = 5) em lâminas coradas por hematoxilina-eosina (HE), e os parâmetros quantificados em objetiva de imersão (1000X)

### **5.6.a. Avaliação da influência da pentoxifilina na integridade dos alvéolos**

Ao realizar esta análise, observamos que nem o grupo basal (Controle) tampouco o tratado (PTX) apresentaram lesões nos alvéolos. As lesões nos outros grupos foram apenas focais, não observamos lesão de aspecto difuso.

Nos três modelos estudados, os animais infectados pelo plasmódio (Pb) apresentaram lesão alveolar focal, contudo observamos que nenhum dos animais infectados e tratados com a PTX apresentou lesão alveolar focal (grupo Pb + PTX) em todos os três modelos estudados ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 58).

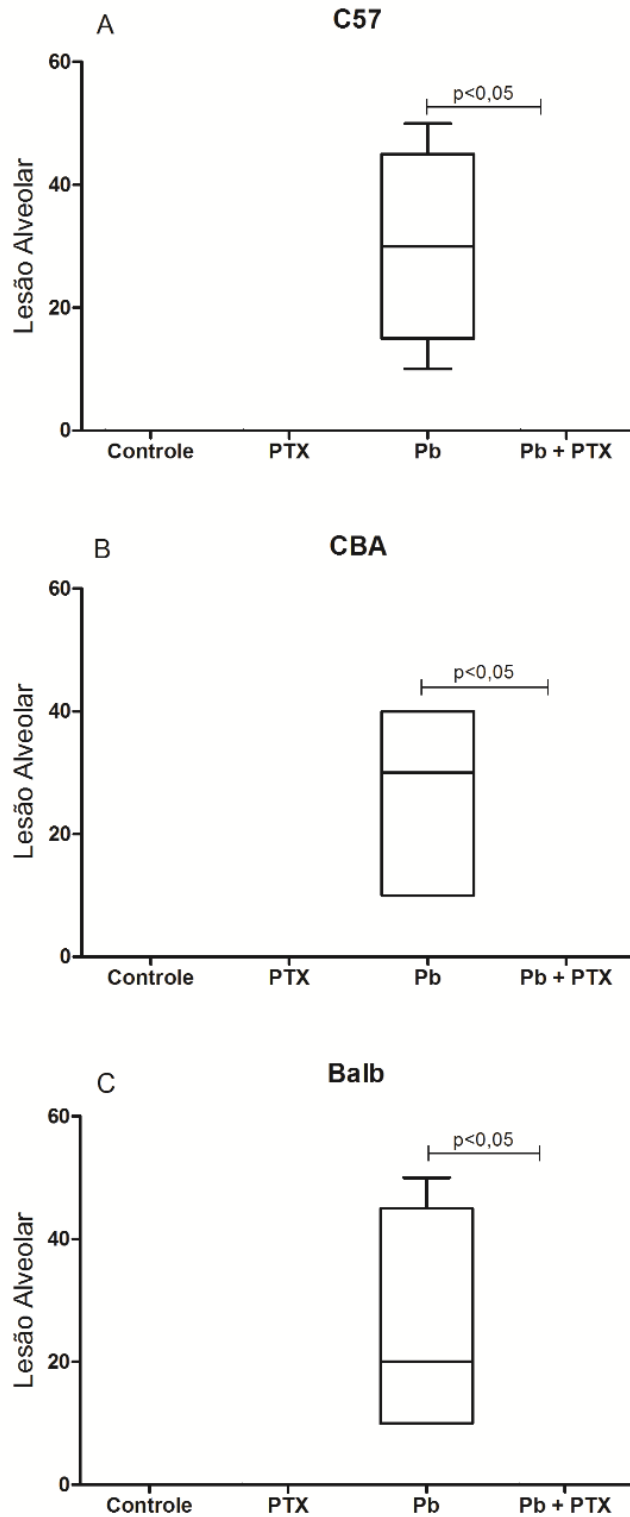


Figura 58: Lesão alveolar focal quantificadas em 10 campos nos pulmões de camundongos C57BL/6, CBA, BALB/c nos grupos Controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados pelo plasmódio (Pb), infectados e tratados (Pb + PTX). C57BL/6, CBA e BALB/c: os animais do grupo Pb+PTX não apresentaram lesões alveolares ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados por medianas, quartis superiores e inferiores, limite mínimos e máximos.

Ao comparar os três modelos, observamos que no grupo Pb não houve diferença no total de lesões causadas pela infecção pelo plasmódio ( $p > 0,05$ ; ANOVA seguido do Student-Newman-Keuls) (Figura 59).

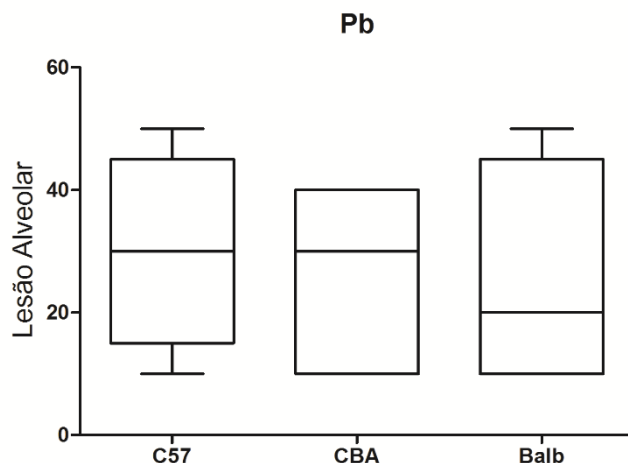


Figura 59: Lesão alveolar focal quantificadas em 10 campos nos pulmões de camundongos C57BL/6, CBA, BALB/c nos grupos infectados pelo plasmódio (Pb). Comparação entre grupos. Pb: A lesão alveolar foi semelhante para todas as linhagens ( $p > 0,05$ ; ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls). Os dados estão representados por medianas, quartis superiores e inferiores, limite mínimos e máximos.

Concluimos este tópico observando que os animais infectados e tratados com a PTX não apresentaram lesão alveolar focal, que estava presente nos animais sem tratamento.

#### 5.6.b. Avaliação da influência da pentoxifilina na congestão vascular

Ao realizar esta análise, observamos que nem o grupo basal (Controle) tampouco o tratado (PTX) apresentaram congestão vascular nos vasos pulmonares.

Observamos que nos três modelos, o grupo infectado pelo plasmódio (Pb) apresentou congestão vascular nos vasos pulmonares, e que o grupo infectado e tratado (Pb + PTX) não apresentou este aspecto, sugerindo um efeito benéfico da PTX na lesão pulmonar ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 60).



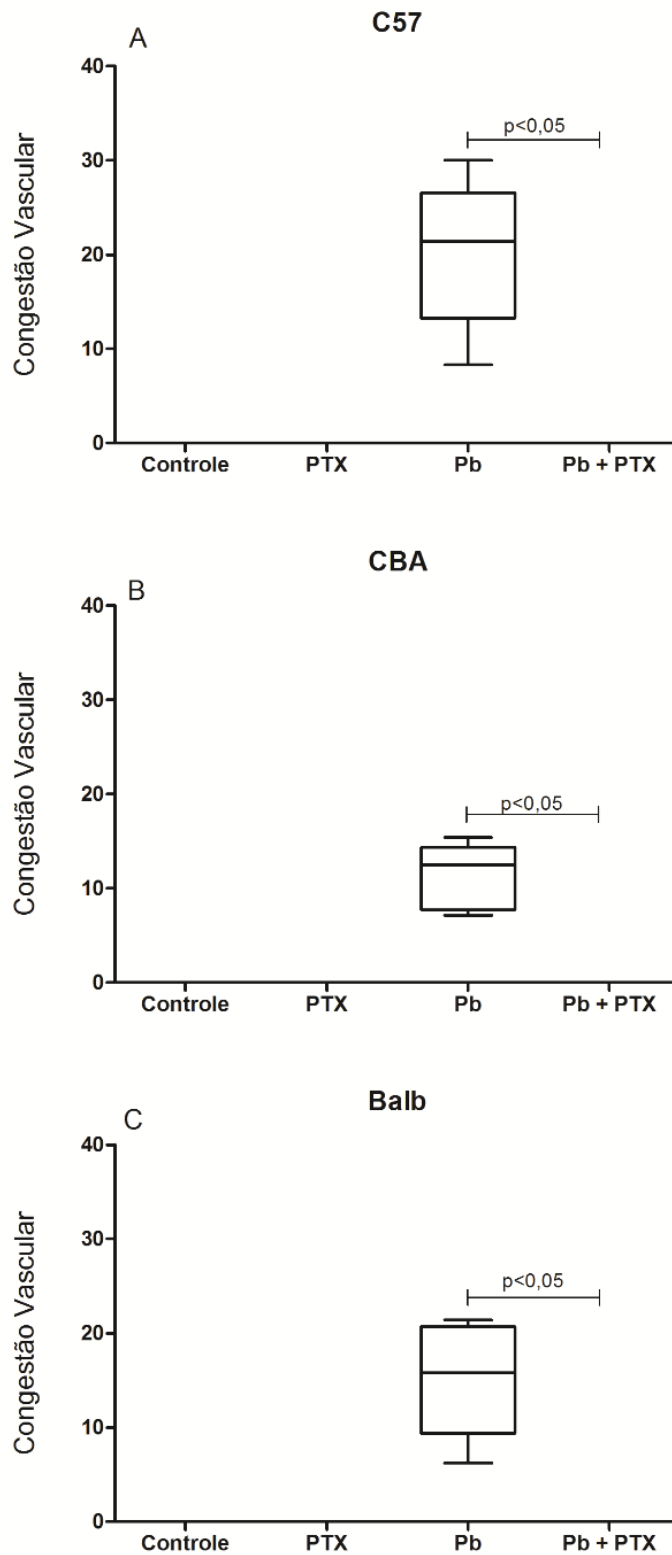


Figura 60: Congestão vascular quantificadas em 10 campos nos pulmões de camundongos C57BL/6, CBA, BALB/c nos grupos Controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados pelo plasmódio (Pb), infectados e tratados (Pb + PTX). C57BL/6, CBA e BALB/c: O número de vasos congestionados foi menor no grupo tratado com PTX ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados por medianas, quartis superiores e inferiores, limite mínimos e máximos.

Quando comparamos os três modelos no grupo infectado pelo plasmódio (Pb), observamos que a congestão vascular pulmonar estava distribuída de forma semelhante entre as linhagens, não havendo diferença estatística entre eles ( $p>0,05$ ; ANOVA seguido do Student-Newman-Keuls) (Figura 61).

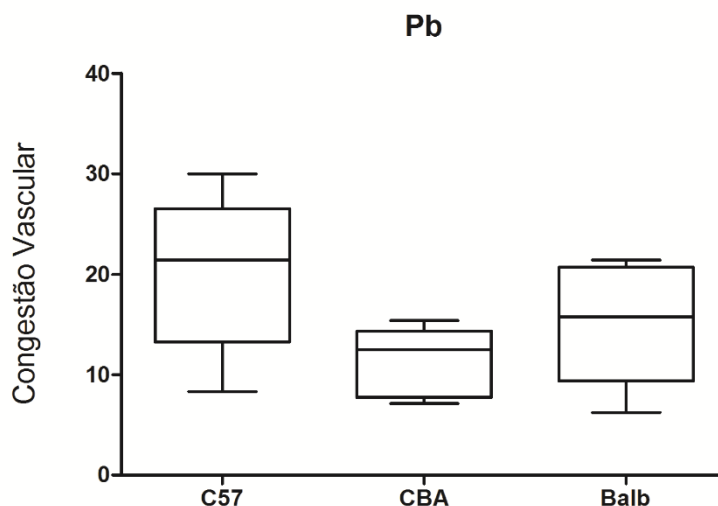


Figura 61: Congestão vascular quantificadas em 10 campos nos pulmões de camundongos C57BL/6, CBA, BALB/c nos grupos Controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados pelo plasmódio (Pb), infectados e tratados (Pb + PTX). Comparação entre grupos. Pb: Os três modelos apresentaram semelhanças no total de congestão vascular, não havendo diferenças estatísticas ( $p>0,05$ ; ANOVA seguido do Student-Newman-Keuls). Os dados estão representados por medianas, quartis superiores e inferiores, limite mínimos e máximos.

Concluimos que o grupo infectado e tratado (Pb + PTX) apresentou menor congestão vascular em todos os três modelos. Contudo, ao analisar as três linhagens observamos semelhanças na expressão de congestão vascular.

### 5.6.c. Avaliação da influência da pentoxifilina no edema intra-septal

Ao realizar esta análise, observamos que nem o grupo basal (Controle) tampouco o tratado (PTX) apresentaram edema intra-septal.

Observamos que os camundongos do grupo C57BL/6 apresentaram maior número de septos com edema intra-septal que os outros dois modelos (Figura 62A), também notamos que nos outros dois modelos a presença de edema intra-septal foi elevada (Figura 62B e 62C). Entretanto, observamos que nos animais infectados e tratados com a PTX não houve modificação neste parâmetro ( $p>0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn).

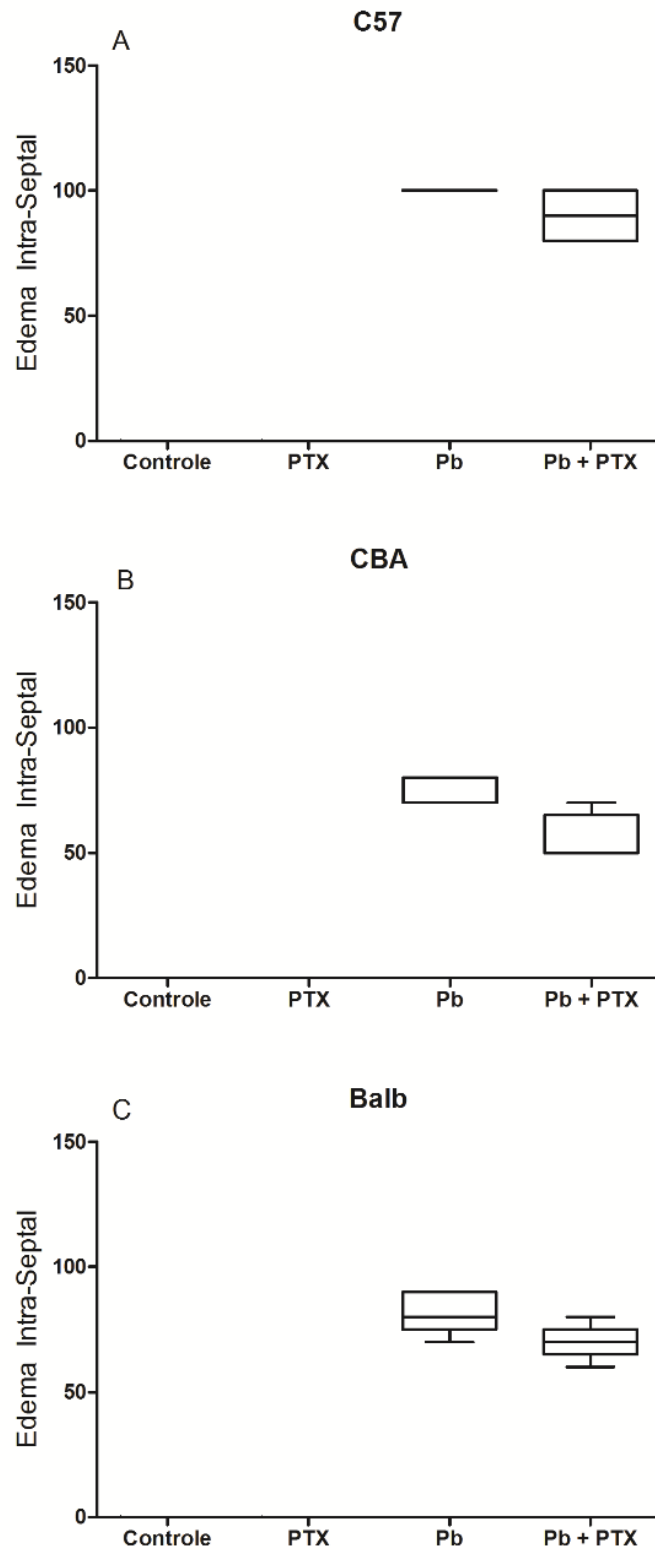


Figura 62: Número de septos apresentando edema intra-septal, analisados em septos com 0,1-1  $\mu$ m, quantificadas em 10 campos, nos pulmões de camundongos C57BL/6, CBA, BALB/c nos grupos Controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados pelo plasmódio (Pb), infectados e tratados (Pb + PTX). C57BL/6, CBA e BALB/c: Os três modelos apresentaram edemas no septo, e a pentoxifilina não modificou este parâmetro ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados por medianas, quartis superiores e inferiores, limite mínimos e máximos.

Ao realizarmos a comparação entre os grupos, observamos que no grupo infectado pelo plasmódio (Pb), o modelo C57BL/6 apresentou maior número de septos com edema intra-septal do que o CBA ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 63A), e este mesmo resultado foi observado no grupo infectado e tratado (Pb + PTX) ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 63B).

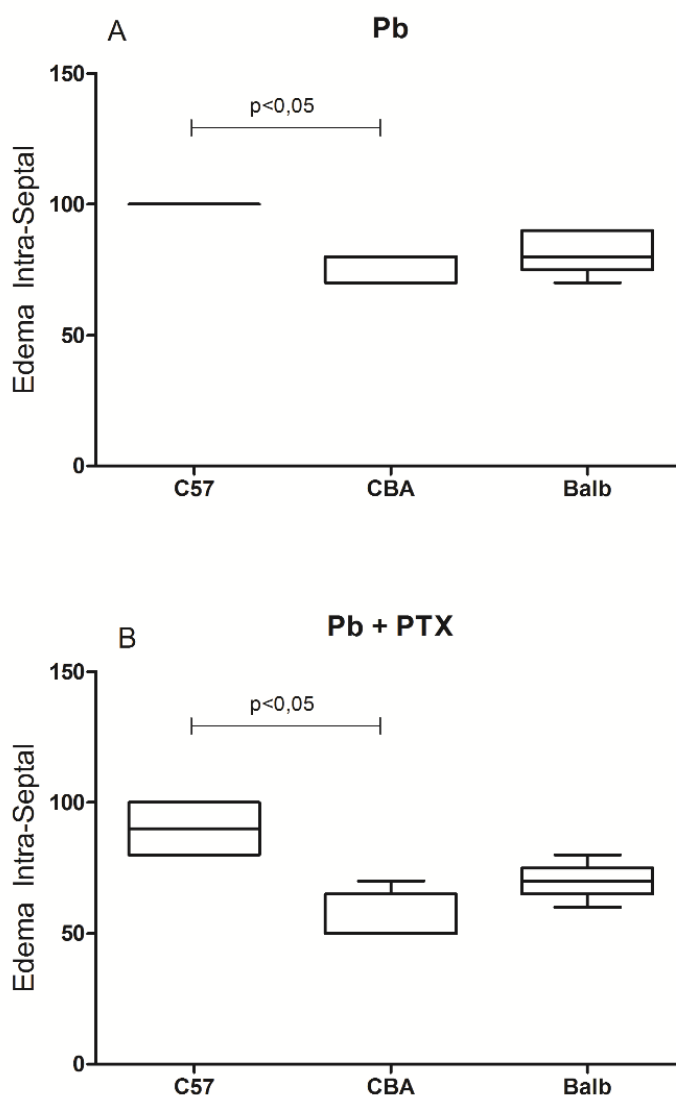


Figura 63: Número de septos apresentando edema intra-septal, quantificadas em 10 campos nos pulmões de camundongos C57BL/6, CBA, BALB/c nos grupos Controle, tratados com pentoxifilina (PTX), infectados pelo plasmódio (Pb), infectados e tratados (Pb + PTX). Comparação entre grupos. Pb: Diferença significativa entre o total de edemas no C57BL/6 para o CBA ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Pb + PTX: a mesma diferença observada no grupo Pb foi mantida ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados por medianas, quartis superiores e inferiores, limite mínimos e máximos.

Em conclusão, observamos que a PTX não foi capaz de influenciar o edema intra-septal nos três modelos, e que o C57BL/6 foi o modelo mais acometido por esta característica histológica.

Nas tabelas a seguir encontram-se resumidos os dados avaliados nos três modelos estudados.

**Tabela 4: Ação da PTX nos aspectos histopatológicos do córtex cerebral nos animais infectados**

Córtex cerebral			
Aspecto histopatológico	C57BL/6	CBA	BALB/c
	Infectados após tratamento com a PTX		
Nº total de neurônios	N	↑	N
Neurônios com necrose	N	↓	N
Congestão vascular	↑	↓	A
Leucócitos aderidos ao endotélio	↑	N	↓
Eritrócitos aderidos ao endotélio	↓	N	A

N = Não modificou; A = Ausente; ↑ = Aumentou; ↓ = Diminuiu

**Tabela 5: Ação da PTX nos aspectos histopatológicos do hipocampo nos animais infectados**

Hipocampo			
Aspecto histopatológico	C57BL/6	CBA	BALB/c
	Infectados após tratamento com a PTX		
Nº total de neurônios	N	N	N
Neurônios com necrose	N	N	N
Congestão vascular	A	N	A
Leucócitos aderidos ao endotélio	N	N	↓
Eritrócitos aderidos ao endotélio	A	N	↓

N = Não modificou; A = Ausente; ↑ = Aumentou; ↓ = Diminuiu

**Tabela 6: Ação da PTX nos aspectos histopatológicos dos núcleos da base nos animais infectados**

Núcleos da Base			
Aspecto histopatológico	C57BL/6	CBA	BALB/c
	Infectados após tratamento com a PTX		
Nº total de neurônios	N	↑	↑
Neurônios com necrose	N	↓	↓
Congestão vascular	A	N	↓
Leucócitos aderidos ao endotélio	↓	N	A
Eritrócitos aderidos ao endotélio	A	N	↓

N = Não modificou; A = Ausente; ↑ = Aumentou; ↓ = Diminuiu

**Tabela 7: Ação da PTX nos aspectos histopatológicos do cerebelo nos animais infectados**

Cerebelo			
Aspecto histopatológico	C57BL/6	CBA	BALB/c
	Infectados após tratamento com a PTX		
Nº total de neurônios	↑	N	N
Neurônios com necrose	N	N	A
Congestão vascular	N	N	↑
Leucócitos aderidos ao endotélio	N	N	A
Eritrócitos aderidos ao endotélio	↑	N	↑

N = Não modificou; A = Ausente; ↑ = Aumentou; ↓ = Diminuiu

**Tabela 8: Ação da PTX nos aspectos histopatológicos dos sinusóides hepáticos nos animais infectados**

Sinusóides hepáticos			
Aspecto histopatológico	C57BL/6	CBA	BALB/c
	Infectados após tratamento com a PTX		
Nº de células de Kupffer	N	N	N
Célula de Kupffer com pigmento malárico	↓	N	↓
Sinusóides com pigmento malárico	N	N	N
Hemácias não parasitadas aderidas ao endotélio	A	N	N
Hemácias parasitadas aderidas ao endotélio	A	N	N
CMN aderidas ao endotélio	N	N	N
CMN aderidas entre si	A	N	N
CMN com pigmento malárico	N	N	N

N = Não modificou; A = Ausente; ↑ = Aumentou; ↓ = Diminuiu

**Tabela 9: Ação da PTX nos aspectos histopatológicos dos vasos do espaço porta nos animais infectados**

Vasos do espaço porta			
Aspecto histopatológico	C57BL/6	CBA	BALB/c
	Infectados após tratamento com a PTX		
CMN aderidos ao endotélio	↓	N	N
CMN aderidos entre si	N	N	N
CMN com pigmento malárico	↓	N	N
Hemácias não parasitadas aderidas ao endotélio	N	N	N
Hemácias parasitadas aderidas ao endotélio	N	N	N
CMN aderidas ao endotélio	N	N	N
CMN aderidas entre si	N	N	N
CMN aderidas a hemácias parasitadas	A	N	N
CMN aderidas a hemácias não parasitadas	A	N	N
Hemácias parasitadas aderidas entre si	N	N	N
Hemácias não parasitadas aderidas entre si	N	N	N

N = Não modificou; A = Ausente; ↑ = Aumentou; ↓ = Diminuiu



**Tabela 10: Ação da PTX nos aspectos histopatológicos do pulmão nos animais infectados**

Pulmão			
Aspecto histopatológico	C57BL/6	CBA	BALB/c
	Infectados após tratamento com a PTX		
Lesão Alveolar	↓	↓	↓
Congestão Vascular	↓	↓	↓
Edema intra-septal	N	N	N

N = Não modificou; A = Ausente; ↑ = Aumentou; ↓ = Diminuiu

## **DISCUSSÃO**

Mesmo com constantes e profundas investigações científicas sobre a patogenia das formas graves da malária, a doença apresenta mecanismos fisiopatogênicos complexos e que ainda não estão bem esclarecidos. Muito do que se sabe sobre os aspectos histopatológicos da malária grave é derivado de estudos em animais ou *post mortem* em seres humanos.

O modelo experimental murino é o mais estudado. Existem muitas variações nas respostas imunitárias e nas manifestações clínicas que dependem da interação entre a linhagem do camundongo e do tipo de plasmódio usado. Estas várias expressões facilitam sua utilização como modelo e auxiliam no entendimento da resposta em seres humanos, pois algumas destas respostas assemelham-se às observadas em pacientes com malária.

A malária humana apresenta uma grande heterogeneidade de apresentação clínica, o que dificulta o seu estudo em modelos experimentais. É frequentemente observado no acometimento grave da malária, que alguns indivíduos, mesmo com o tratamento e acompanhamento clínico adequado, vão ao óbito.

Neste trabalho, foram utilizados três modelos de camundongos, da linhagem C57BL/6, da linhagem CBA e da linhagem BALB/c, infectados ou não pelo *Plasmodium berghei* ANKA, e o efeito da pentoxifilina sobre as alterações histopatológicas no fígado, pulmão e cérebro foi avaliado em animais que apresentam ou não formas graves da malária.

No modelo C57BL/6, após a infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA, observamos congestão vascular, adesão de células e lesão tecidual nos três órgãos estudados: pulmão, fígado e cérebro. Observamos que no córtex cerebral, após a infecção pelo *P. berghei* ANKA, esses animais apresentaram menor número de neurônios, que também foi observado no hipocampo, núcleos da base e cerebelo e adesão de eritrócitos ao endotélio nesse local. Já no cerebelo, observamos também congestão vascular. Esses resultados são semelhantes aos observados por outros autores (Baptista et al 2010; Grau et al. 1989; Craig et al. 2012). Contudo, observamos que esse modelo não apresentou intensa adesão leucocitária ao endotélio dos vasos cerebrais, o que foi contrário ao observado na literatura (Borges 2013; Craig et al. 2012; Grau et al 1989). Provavelmente o nível sérico de citocinas inflamatórias no dia do sacrifício não

estavam altos, levando a pouca expressão de moléculas de adesão e em consequência menor adesão leucocitária.

Ao analisar o fígado do modelo C57BL/6 do grupo infectado, observamos deposição de hemozoína nos sinusóides e muitas internalizadas por células de Kupffer. Também foi observado adesão de células mononucleares ao endotélio dos vasos do espaço porta. Essas observações são semelhantes ao descrito na literatura, sendo que este modelo sofre injúria no fígado após a infecção por este plasmódio (Dockrell, De Souza & Playfair 1980; Zuzarte-Luís, Mota & Vigário 2014).

Quando analisamos o pulmão dos camundongos C57BL/6 do grupo infectado, observamos lesão na membrana alvéolo-capilar, congestão vascular e edema intra-septal. Características como estas foram observadas em estudos em linhagem C3H/z de camundongo (Weiss & Kubat 1983). Nossos dados são semelhantes ao descrito por Zuzarte-Luís, Mota & Vigário (2014), e corroboram este modelo como susceptível a injúria pulmonar e desenvolvimento da síndrome da angústia respiratória.

Ao avaliar o modelo CBA, que desenvolve malária cerebral, observamos que no grupo infectado, todas as regiões do cérebro estudadas (córtex, hipocampo, núcleos da base e cerebelo) apresentaram as mesmas alterações histopatológicas com necrose neuronal, congestão vascular, adesão de hemácias e leucócitos ao endotélio vascular. Esses dados foram semelhantes aos observados por outros autores (Borges 2013; Craig et al. 2012; Grau et al 1989; Paula Jr 2003)

No fígado do modelo CBA, observamos adesão de leucócitos ao endotélio dos vasos do espaço porta, e deposição de hemozoína nos sinusóides e interiorização pelas células de Kupffer, aspectos histopatológicos observados em outros estudos (Dockrell, De Souza & Playfair 1980).

Já ao analisar o pulmão dos camundongos CBA do grupo infectado, observamos presença de lesão alvéolo-capilar, edema intra-septal e congestão vascular. Os aspectos histopatológicos por nós observados foram semelhantes ao descritos nos estudos realizados por Carvalho et al (2000), onde os autores observaram esses mesmos aspectos nessa mesma linhagem de camundongo.

No modelo BALB/c que é resistente a malária cerebral (Grau et al. 1989), interessantemente, observamos algumas alterações (necrose neuronal,

congestão vascular e adesão de eritrócitos e leucócitos ao endotélio vascular) não esperadas nas regiões do cérebro (córtex, hipocampo e núcleos da base), o que é diferente do observado em outros estudos (Baptista et al 2010; Borges 2013; Grau et al 1989). A adesão de eritrócitos e leucócitos ao endotélio vascular não foi intensa, tampouco a necrose neuronal significativamente alta. Isso sugere que estas alterações histopatológicas podem acontecer em quantidades não significantes, sem desencadear a síndrome cerebral neste modelo. O que reforça esta teoria é a ausência destas características (necrose neuronal, congestão vascular e adesão de eritrócitos e leucócitos ao endotélio vascular) no cerebelo destes camundongos.

Ao analisar os fígados dos camundongos BALB/c, observamos adesão de leucócitos ao endotélio dos vasos do espaço porta, e deposição de hemozoína nos sinusóides e sua interiorização pelas células de Kupffer, alterações histopatológicas que também foram observadas por Dockrell, De Souza & Playfair (1980). Interessantemente, Baratta et al (2009) após caracterização das células e estrutura do fígado de camundongos ICR e BALB/c normais, observou que suas estruturas são semelhantes a de outros modelos mamíferos, como de humanos.

No pulmão dos camundongos BALB/c, observamos lesão da membrana alvéolo-capilar, edema intra-septal e congestão vascular, o que caracteriza a lesão pulmonar que é observada nesse modelo (Lovegrove et al. 2008).

Outro aspecto importante que foi caracterizado em nosso estudo nos três modelos após a infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA, foram as diferenças ou semelhanças entre os três modelos de malária após a infecção pelo *Plasmodium berghei* Anka e o tratamento com a PTX.

Nossos estudos mostraram a perda de neurônios quando os camundongos que desenvolvem malária cerebral (CBA e C57BL/6) foram infectados pelo plasmódio. De fato, tem sido sugerido perda de neurônios por isquemia e processos degenerativos no tecido cerebral, impedindo a correta troca de nutrientes para manter a célula viável (Turner,1997). Nossos dados estão de acordo com estas informações, pois apenas os camundongos que desenvolveram malária cerebral apresentaram perda neuronal significativa. O camundongo BALB/c, que não desenvolve a forma cerebral, não apresentou diminuição significativa no número de neurônios totais. Porém, mesmo estes

animais (BALB/c) apresentaram necrose neuronal, embora em pequena quantidade, o que não era esperado por nós, já que este modelo é resistente a malária cerebral (Grau et al. 1989). É possível que o que tenha contribuído para a presença de necrose neste modelo é o fato de que pode também ocorrer elevação da concentração sérica do FNT- $\alpha$ , como foi observado por Borges (2013). Essa citocina é capaz de induzir a necrose celular pela modificação da relação entre o Receptor de Interação de Proteínas 1 (RIP1) e a Cinase -1 Ativada pelo TGF- $\beta$  (TAK1), onde a TAK1 impede a formação do complexo de indução de necrose mediado pelo FNT- $\alpha$  (RIP1, RIP3, FADD, caspase-8) (Arslan & Scheiderei 2011). A RIP1 também foi observada estar expressa em células do tecido cerebral, após dano (Degterev et al. 2005). Uma possibilidade é que o desequilíbrio nas concentrações dessas moléculas, geradas localmente, no curso da infecção pelo plasmódio, possa ter desequilibrado esta interação a favor da indução da necrose. De fato, De Miranda et al. (2015) mostraram que a ativação do sistema imunitário, seja por estresse ou doença, leva a alteração e redução de neurotrofinas, que são responsáveis por fenômenos como a neurogênese, e que essa redução pode levar a morte de neurônios no hipocampo.

Interessantemente, a PTX não foi capaz de proteger os neurônios no camundongo C57BL/6, inclusive, aumentando a necrose neuronal neste modelo, contudo, foi capaz de abolir a necrose neuronal no córtex cerebral e núcleos da base do camundongo CBA. Entre as possibilidades para explicar estas diferenças podemos sugerir que no modelo C57BL/6, que apresenta a forma mais grave da doença, a presença de congestão vascular, pode ter contribuído para agravar o quadro. Tem sido mostrado que a congestão vascular é um dos fatores que podem desencadear a morte de neurônios (Turner, 1997). Outros fatores devem também ser considerados para esta diferença de ação da PTX nesses dois modelos, como o fato de que nos camundongos C57BL/6 os níveis do FNT- $\alpha$  são mais elevados e a PTX pode não ter sido capaz de diminuir suficientemente a biodisponibilidade dessa citocina de modo a reverter o fenômeno da necrose celular. A ausência de efeito da droga sobre o FNT- $\alpha$  já foi observado em alguns estudos conduzidos em seres humanos (Hemmer et al 1997; Looareesuwan et al 1998). Já a proteção conferida pela PTX no modelo CBA, abolindo a necrose neuronal, pode ter contribuído para a maior sobrevivência

que foi observada por Borges (2006) neste modelo, com um aumento na sobrevivência de até 13 dias nos camundongos CBA que foram tratados com a PTX.

Congestão vascular cerebral foi observada nos três modelos estudados, sendo em menor proporção nos camundongos BALB/c. A congestão vascular no cérebro é um fenômeno que ocorre com o agravamento da doença, e coincidindo com as manifestações neurológicas, como ataxia, convulsão, etc (Grau & Kossodo 1993; Lou, Lucas & Grau 2001).

Observamos congestão vascular nos camundongos C57BL/6, mesmo após o tratamento com a PTX. Como uma possibilidade, podemos sugerir que a PTX não foi capaz de modular suficientemente a expressão de adesinas e/ou integrinas, ou outras moléculas que induzem a expressão das moléculas de adesão no endotélio cerebral. O mesmo foi observado no modelo CBA, que apesar de ter apresentado congestão vascular no córtex cerebral, esta congestão foi menor no animal tratado do que no grupo infectado que não recebeu o tratamento. Isso não foi observado em outras áreas do cérebro. Paula Jr (2003) observou que nesse modelo, após o tratamento com a PTX, não houve grande diferença nos aspectos histopatológicos entre os grupos tratados ou não. Contudo, no modelo BALB/c, a ação da PTX foi mais evidente, e a droga foi capaz de abolir a congestão vascular em todas as regiões cerebrais estudadas, com exceção do cerebelo. É provável que neste modelo, a ação da PTX, reduzindo a viscosidade sanguínea e promovendo vasodilatação, tenha sido mais efetiva nestas regiões do cérebro.

Adesão de hemácias tanto parasitadas, quanto não parasitadas, ao endotélio vascular cerebral foi observada nos três modelos. A exacerbação dessa aderência pode contribuir para as alterações fisiopatogênicas observadas na malária grave, e tem sido sugerido que ela é ocasionada pelo aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície dos endotélios em decorrência da produção exacerbada de citocinas inflamatórias (Nacer et al. 2012). Em nosso trabalho, o modelo C57BL/6 apresentou adesão de hemácias tanto parasitadas, quanto não parasitadas, que foi diferente do observado por Borges (2013), que não observou adesão de hemácias de forma significativa ao endotélio vascular cerebral neste mesmo modelo. Entretanto, nossos dados foram semelhantes ao observado por Belnoue et al. (2002), que mostraram a presença de hemácias infectadas aderidas ao endotélio cerebral no modelo C57BL/6.

Nosso estudo mostrou adesão de eritrócitos tanto parasitados, quanto não parasitados, em poucas regiões do cérebro dos camundongos C57BL/6. Sendo observada no córtex e no cerebelo. Os motivos desse fenômeno precisam ainda ser esclarecidos, pois nessa linhagem C57BL/6, a produção das citocinas inflamatórias são mais exacerbadas e isso pode contribuir para a maior expressão de moléculas de adesão (ICAM-1 e CD36) no endotélio vascular e em consequência a adesão de eritrócitos ao endotélio dos vasos no cérebro (Souza & Riley 2002) Portanto, é algo contrário ao achado em nossos estudos.

Maior expressão dessas moléculas foi observada em seres humanos (Chen, Schlichtherle & Wahlgren 2000). Contudo, no modelo C57BL/6, o tratamento com a PTX foi capaz de abolir a adesão de hemácias ao endotélio dos vasos no córtex cerebral. Porém, sua ação foi oposta no cerebelo, onde observamos um aumento da adesão dos eritrócitos tanto parasitados quanto não parasitados ao endotélio vascular nos animais infectados e tratados com a PTX. Aderência de eritrócitos nesta localização do cérebro não estava presente nos animais do grupo infectado pelo plasmódio que não receberam o tratamento com a PTX. Isso sugere uma resposta diferenciada segundo a localização no cérebro. De fato, tem sido mostrado expressão diferenciada de moléculas de adesão no tecido cerebral (Fabry et al. 1992). Provavelmente os animais estudados estavam apresentando uma forma grave da malária cerebral, pela exacerbação dos sintomas clínicos, com sinais neurológicos, como ataxia, convulsões. Além disso, foi observado por Baptista et al. (2010) que a forma cerebral neste modelo está relacionada com o acúmulo de hemácias cérebro.

Entretanto, no modelo CBA, encontramos hemácias parasitadas e não parasitadas aderidas ao endotélio vascular em todas as regiões do cérebro analisadas (córtex, hipocampo, núcleos da base) e cerebelo no grupo infectado pelo plasmódio. Nossos dados são semelhantes ao que foi descrito por Grau et al. (1989), que mostrou que o modelo CBA apresenta adesão de hemácias no endotélio dos vasos cerebrais. No entanto, a PTX não modificou a adesão de hemácias ao endotélio neste modelo. Entre as possibilidades para explicar a ineficácia da ação da PTX seria que o tempo de ação da droga em nosso protocolo experimental pode não ter sido suficiente para reduzir a adesão eritrocitária nos vasos cerebrais. O modelo BALB/c apresentou este mesmo fenômeno de adesão eritrocitária em locais isolados (hipocampo), porém, a



intensidade da adesão dos eritrócitos foi menor do que a observada no modelo CBA. Esses nossos resultados foram semelhantes ao observada por Borges (2013), que mostrou que os camundongos BALB/c foram os que apresentaram menor adesão eritrocitária nos vasos cerebrais (córtex, hipocampo). Contudo, ao administrar a PTX nos camundongos BALB/c infectados pelo plasmódio, observamos que a droga aboliu a adesão de hemácias nos vasos do hipocampo, entretanto, os animais BALB/c passaram a apresentar adesão de eritrócitos parasitados ou não no cerebelo, fenômeno que não apresentavam antes do tratamento, embora em baixa intensidade. Esta característica foi observada também no modelo C57BL/6, portanto, reforça a possibilidade de resposta diferenciada conforme a localização do tecido cerebral.

Quando analisamos a adesão dos leucócitos ao endotélio vascular cerebral, observamos a presença de adesão dos leucócitos após a infecção pelo plasmódio nos três modelos estudados. A fato desses animais apresentarem aderência de leucócitos, um fenômeno diferente do observado em vasos cerebrais de seres humanos, que mostra aderência de eritrócitos parasitados ou não ao endotélio vascular cerebral, com pouca aderência de leucócitos, conforme observado em casos de necropsia de pacientes que morreram com a forma grave da malária cerebral (Turner,1997), tem sido motivo de ceticismo entre alguns pesquisadores quanto à utilidade destes animais para avaliar os mecanismos fisiopatogênicos das formas graves da malária humana, como também para o desenvolvimento de novos tratamentos para seres humanos (Craig et al. 2012). Contudo, nossos resultados mostraram que a adesão de leucócitos pode não ser tão intensa. O modelo C57BL/6 não apresentou adesão leucocitária no endotélio dos vasos do córtex cerebral quando infectado pelo plasmódio. Entretanto, o tratamento com a PTX dos animais infectados com o plasmódio induziu o aparecimento de adesão dos leucócitos nos vasos do córtex, o que não existia previamente. Porém, a mesma droga aboliu a adesão de leucócitos no hipocampo. Sugerindo que a ação da PTX tenha tido um papel protetor no hipocampo, mas aparentemente pode ter agravado as lesões na região do córtex cerebral. De fato, Wenisch et al. (1998) demonstraram que em seres humanos infectados com o *P. falciparum* a PTX reduziu os níveis séricos do FNT- $\alpha$  e essa citocina está diretamente associada com a expressão de moléculas de adesão (CD36 e ICAM-1) (Mohanty et al. 2006; Ockenhouse et al.

1992). Portanto, a PTX pode ter reduzido o FNT- $\alpha$  no hipocampo, mas provavelmente não foi suficiente para reduzir esta citocina no córtex dos camundongos C57BL/6. O camundongo CBA apresentou adesão leucocitária em todas as regiões do cérebro (córtex, hipocampo e núcleos da base) e no cerebelo. Nossos resultados foram semelhantes ao que foi observado por Borges (2013), e isto é um fator interessante, já que no mesmo estudo, esta linhagem apresentou FNT- $\alpha$  diminuído após a infecção pelo *P. berghei* ANKA, mostrando que há outros mecanismos além da expressão de moléculas de adesão por esta citocina que podem ser responsáveis pela adesão de leucócitos ao endotélio vascular cerebral. Os camundongos BALB/c foram os que apresentaram adesão leucocitária mais discreta no grupo infectado pelo plasmódio, entre os três modelos estudados, mostrando aderência de leucócitos somente no córtex cerebral e hipocampo. Menor expressão de aderência de leucócitos aos vasos cerebrais era um fenômeno esperado, pelo fato de que os camundongos BALB/c não desenvolvem a malária cerebral (Grau et al. 1989; Zuzarte-Luís, Mota & Vigário 2014) É possível que a ação protetora da PTX, abolindo a adesão leucocitária no córtex cerebral e hipocampo, tenha ocorrido pelo fato dessa adesão ter sido menos intensa do que nos outros modelos estudados. Outra explicação provável seria a menor produção do FNT- $\alpha$  pelos camundongos BALB/c. Borges (2013) e Souza & Riley (2002) mostraram que mesmo após a infecção pelo *P. berghei* ANKA, os níveis da citocina estavam baixos no camundongo BALB/c. Como a PTX diminui a produção do FNT- $\alpha$  (Borges 2006), deve ter diminuído a expressão de moléculas de adesão, diminuindo as chances de ocorrer a adesão leucocitária no endotélio dos vasos cerebrais.

Segundo um estudo realizado por Manning et al. (2012) de casos pediátricos fatais devido a infecção mista por *P. falciparum* e *P. vivax*, as alterações histopatológicas foram semelhantes as observadas no modelo CBA, com adesão de hemácias e leucócitos nos vasos e congestão vascular.

Em conclusão, observamos que as três linhagens utilizadas apresentaram diferenças histopatológicas no tecido cerebral. A adesão celular (tanto hemácias quanto leucócitos) foi mais presente nos modelos CBA, reduzida no modelo BALB/c, e apenas em alguns locais no C57BL/6 (córtex cerebral, cerebelo).

Congestão vascular no hipocampo, foi mais presente no CBA, e não observada nos modelos BALB/c e C57BL/6 infectados com o plasmódio. Enquanto que a PTX agiu também de forma diferente (reduzindo adesão de leucócitos nos vasos do córtex cerebral no BALB/c, porém, aumentando este aspecto no modelo experimental C57BL/6), mostrando a heterogeneidade da resposta entre as linhagens.

Nossas observações mostraram um maior número de células de Kupffer no fígado dos grupos infectados do que dos grupos não infectados.

No camundongo C57BL/6 foi observado maior número de células de Kupffer nos animais do grupo PTX do que nos infectados e tratados com PTX. Esses dados sugerem um aumento do número de células de Kupffer após a perturbação da homeostase hepática pela infecção com o plasmódio (Dockrell, De Souza & Playfair 1980). Esse maior número de células de Kupffer também foi observado para os outros dois modelos estudados (CBA e BALB/c). Observamos também maior número de células de Kupffer com pigmento malárico (hemozoína), que é o produto do metabolismo do parasito liberado na circulação após a lise do eritrócito e internalizado pelos fagócitos (Boura 2012). Nos camundongos C57BL/6 do grupo infectado e tratado com PTX observamos que o número de células de Kupffer com hemozoína foi menor do que o observado no grupo infectado. O mesmo foi observado para os camundongos BALB/c. Sun et al. (1999) mostraram que a PTX pode reduzir o influxo de  $Ca^{2+}$  em macrófagos alveolares, e o cálcio é um importante mediador nas vias de sinalização de fagócitos e essencial no processo de fagocitose. Como consequência desse mecanismo de ação da PTX, as células de Kupffer podem ter tido sua capacidade fagocitária reduzida e em consequência menor secreção de mediadores inflamatórios. É possível que esse efeito possa ter ocorrido nos dois modelos de camundongos em que observamos menor número de células de Kupffer com pigmento malárico, o C57BL/6 e o BALB/c. Contudo, este efeito não foi significativo no modelo CBA. Os motivos para estas diferentes repostas não estão ainda esclarecidos. A presença de pigmento malárico no fígado é uma característica histopatológica compartilhada entre modelos experimentais e humanos. Nosso estudo mostrou a presença de hemozoína nos sinusóides hepáticos e células de Kupffer nos três modelos estudados e o mesmo tem sido

observado em seres humanos (Baheti, Laddha & Gehlot 2003; Viriyavejakul, Khachonsaksumet & Punsawad 2014).

A adesão de células mononucleares (linfócitos e monócitos) ao endotélio dos vasos do espaço porta também foi um aspecto observado, e esteve presente nos três modelos. Nos camundongos C57BL/6, a adesão de células mononucleares foi observada, e em alguns casos acompanhada de infiltrado celular, esta característica e também a inflamação do espaço porta foi observada também em seres humanos (Baheti, Laddha & Gehlot 2003; Viriyavejakul, Khachonsaksumet & Punsawad 2014). A PTX reduziu a adesão dessas células nos vasos do espaço porta. Porém é questionável se o efeito de redução da adesão destas células neste órgão é benéfico ou não para a evolução da doença. Haque et al. (2011) mostraram nesse mesmo modelo, que células TCD8+ estariam associadas com a patologia no cérebro e com a proteção no fígado. Uma possibilidade seria que, com a redução na adesão de células mononucleares, poderia contribuir para a patologia observada no fígado. A diferença nos mecanismos de resposta à infecção e à ação da PTX entre os modelos é novamente vista neste aspecto, os camundongos CBA e BALB/c apresentaram aderência de células mononucleares nos vasos do espaço porta, porém, não houve diferença após administração da PTX. Mostrando a diferença destes modelos quando comparados com o C57BL/6, o que coincide com nossos achados no tecido cerebral (córtex, cerebelo e núcleos da base), onde a PTX aumentou a adesão de leucócitos ao endotélio do córtex cerebral de camundongos C57BL/6, enquanto que reduziu este aspecto no BALB/c.

Concluimos que, a adesão de células mononucleares ao endotélio dos vasos do espaço porta é compartilhada entre modelos experimentais e humanos, e que houve efeito imunomodulador da PTX nas células de Kupffer, pois observamos redução de células de Kupffer com pigmento malárico após administração da PTX. Também observamos diferença na resposta entre as linhagens, com diferentes gradações de respostas entre os grupos estudados, como observado nos camundongos C57BL/6, que mostraram menor adesão de células mononucleares aos vasos do espaço porta após administração da PTX, enquanto nos camundongos BALB/c e CBA, não houve modificação neste aspecto após administração da droga.

Lesões nos alvéolos pulmonares, características do aumento da permeabilidade da membrana alvéolo-capilar, foram observadas nos três modelos infectados com o plasmódio. Nossos dados estão de acordo com o descrito por Boulos et al. (1993). A PTX aboliu a lesão alveolar focal nos três modelos por nós estudados. Esse efeito também foi observado por Lovegrove et al. (2008) que utilizaram camundongos C57BL/6 desprovidos da molécula de aderência CD36 (CD36<sup>-/-</sup>). Eles mostraram que com a ausência desta molécula, os camundongos foram protegidos da lesão pulmonar aguda. É possível que ação da PTX possa ter sido semelhante, pois como a PTX reduz os níveis de FNT- $\alpha$ , conseqüentemente diminuem a expressão de moléculas de adesão, como a CD36, diminuindo a sintomatologia pulmonar.

Congestão vascular também foi observada no pulmão dos três camundongos. Nossos dados são semelhantes às observações de Maguire et al. (2005) em seres humanos. Esses autores mostraram que independente da gravidade da forma clínica da malária, a oclusão vascular pulmonar estava presente, estudando tanto pacientes com malária não complicada quanto pacientes com malária grave. Observamos que a PTX foi capaz de reduzir a congestão nos camundongos C57BL/6 e de aboli-la nos outros dois modelos. Lovegrove et al. (2008) observou que a baixa ou ausência de expressão da molécula de aderência CD36 ocasionou menor desenvolvimento da forma grave pulmonar. Provavelmente a PTX, diminuindo a expressão de moléculas de aderência, como o CD36, tenha contribuído para diminuir o comprometimento pulmonar nos três modelos por nós estudados. Ademais, a PTX também promoveu a vasodilatação.

Quando avaliamos a presença de edema intra-septal observamos que os camundongos dos três modelos estudados apresentaram essa alteração. Nossos dados foram semelhantes aos de Carvalho et al. (2000), que mostraram que 10 de 12 animais infectados pelo plasmódio apresentaram edema intra-septal devido a infiltrados monocitários. De fato, Deroost et al. (2013) demonstraram que em camundongos C57BL/6 infectados por cepas diferentes de plasmódio (*P. chabaudi* AS, *P. berghei* ANKA e NK65) a presença de hemozoína foi um fator agravante no desenvolvimento da injúria pulmonar, já que esse produto do metabolismo do plasmódio está associado com a inflamação, como também demonstraram a presença desse produto no interior

de monócitos ou macrófagos no pulmão. Esses autores sugeriram que esse poderia ser o mecanismo responsável pela desestruturação dos septos alveolares. Esta observação foi semelhante a que observamos em nosso estudo no fígado, onde a deposição de hemozoína foi bem mais visível. Entretanto, a PTX não modificou o edema intra-septal em nenhum dos três modelos estudados.

Nossos dados mostraram que as ações da PTX sobre os aspectos histológicos por nós avaliados foi bastante heterogênea. As ações da PTX foram heterogêneas, tanto em relação a cepa de camundongo avaliada, como em relação ao órgão, e o parâmetro histológico avaliado. Essa grande diferença de respostas pode explicar a heterogeneidade das respostas dos pacientes com malária que foram tratados com a PTX (Hemmer et al. 1997; Lell et al. 2010; Looareesuwan et al. 1998). Esses estudos mostraram que a droga não teve efeito sobre a produção de citocinas inflamatórias, como o FNT, nem melhorou a evolução do quadro grave da malária, mesmo em associação com drogas antimaláricas. Por outro lado, resultado oposto foi encontrado por Das et al (2003) e Di Perri et al. (1995), que mostraram que a droga melhorou a sobrevivência e reduziu o coma dos pacientes com malária. Essa heterogeneidade de respostas foi mostrada em nosso estudo, onde a PTX mostrou ter um papel protetor pela diminuição da necrose neuronal nos modelos CBA e BALB/c, porém aumentou a necrose neuronal nos camundongos C57BL/6. Isso sugere que a PTX apresenta diferentes mecanismos de ação na dependência da base genética dos camundongos avaliados e que podem repercutir diferentemente sobre as alterações histológicas que foram avaliadas.

Em conclusão, observamos que cada cepa de camundongo apresentou respostas únicas, tanto à infecção quanto ao tratamento com a PTX. Em relação ao tipo de célula que adere ao endotélio dos vasos cerebrais predominaram os leucócitos sobre as hemácias nos camundongos C57BL/6; houve aderência tanto de hemácias como de leucócitos no CBA; e também houve aderência tanto de hemácias como de leucócitos no BALB/c, porém em menor quantidade. Outras alterações foram semelhantes nos três modelos experimentais, como a congestão vascular no pulmão, que estava presente nos camundongos C57BL/6 assim como nos outros dois modelos, CBA e BALB/c.

Analisando a resposta ao tratamento com a PTX nos animais infectados, observamos aumento da congestão vascular nos vasos do córtex cerebral após administração da droga nos camundongos C57BL/6; a PTX não produziu nenhuma alteração na congestão vascular nos vasos do córtex cerebral nos camundongos CBA; e a PTX aboliu a congestão vascular nos vasos do córtex cerebral nos camundongos BALB/c. Esses dados mostram que os mecanismos de ação da PTX dependem da cepa de camundongo avaliada, sugerindo que as respostas observadas possam ser uma consequência de ativação de mecanismos fisiopatogênicos diferentes segundo a base genética do hospedeiro.

Resposta diferentes entre os três modelos já foi descrita por Borges (2013), que mostrou que cada modelo expressa diferentemente as citocinas inflamatórias, que os camundongos C57BL/6 tem uma tendência a respostas mais inflamatórias que os outros dois modelos.

Nossos dados foram capazes de mostrar diferenças nas alterações patológicas entre os três modelos, como também em resposta ao tratamento com a PTX.

Outro fator que merece consideração é o fato de que no mesmo modelo animal, observamos que a PTX pode induzir respostas que poderiam ser potencialmente benéficas, pelo fato de diminuir os processos de lesão tecidual. Entretanto, a PTX pode determinar um efeito oposto em outro local ou mesmo em outro órgão, no mesmo modelo animal, produzindo alterações que poderiam ser potencialmente maléficas por aumentar os processos de lesão. Esses dados sugerem as potenciais dificuldades para utilização da PTX em seres humanos, desde que cada indivíduo apresenta aspectos genéticos particulares e únicos e que, atualmente, não temos capacidade para prever se a resposta à PTX tenderia seus efeitos para a melhora ou para a piora da doença. Entretanto, as alterações histopatológicas pulmonares e hepáticas ocasionadas pela infecção com o *P. berghei* ANKA nos três modelos estudados foram consistentemente diminuídas pelo tratamento dos animais com a PTX, o que sugere que esta droga poderia potencialmente ter algum efeito benéfico para os pacientes apresentando a forma grave pulmonar da malária.

Algumas alterações observadas nos camundongos são compartilhadas com os seres humanos (lesões nos alvéolos, efeitos inflamatórios no fígado,

adesão de células mononucleares aos vasos do espaço porta, adesão de leucócitos e hemácias nos vasos do cérebro). Porém os mecanismos que levam a essas alterações ainda não estão esclarecidos. Há portanto a necessidade de investigar estes mecanismos ou vias que influenciam as respostas em cada linhagem.

Nosso estudo contribuiu para aumentar a compreensão das alterações histopatológicas observadas nos modelos experimentais susceptíveis (C57BL/6 e CBA) ou resistentes (BALB/c) após a infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA, como também para melhor compreender a influência da PTX sobre as alterações histopatológicas cerebrais, hepáticas e pulmonares.



## **CONCLUSÃO**

## **1. Alterações histopatológicas nos camundongos C57BL/6**

### **A) Camundongos infectados pelo *P. berghei* ANKA**

#### **a) Cérebro**

**Córtex cerebral:** Menor número total de neurônios do que os animais não infectados e aderência de eritrócitos ao endotélio vascular.

**Hipocampo e núcleos da base:** Menor número total de neurônios do que os animais não infectados e necrose neuronal.

**Cerebelo:** Menor número total de neurônios do que os animais não infectados e necrose neuronal, congestão vascular e aderência de eritrócitos ao endotélio vascular.

#### **b) Fígado**

Adesão de células mononucleares ao endotélio dos vasos do espaço porta.

#### **c) Pulmão**

Lesão focal nos alvéolos, congestão vascular e edema intra-septal.

### **B) Camundongos infectados pelo *P. berghei* ANKA e tratados com PTX**

#### **a) Cérebro**

**Córtex cerebral:** Maior necrose neuronal que o grupo infectado, congestão vascular e aderência de leucócitos mas não de eritrócitos ao endotélio vascular.

**Hipocampo:** Maior necrose neuronal que o grupo infectado.

**Núcleos da base:** Menor número total de neurônios e menor adesão de leucócitos ao endotélio vascular do que o grupo infectado.

**Cerebelo:** Maior adesão de eritrócitos ao endotélio vascular do que o grupo infectado. Menor número total de neurônios que animais normais. Presença necrose neuronal, congestão vascular e adesão de leucócitos ao endotélio vascular.

#### **b) Fígado**

Maior número de células de Kupffer que os animais não infectados, e menor número de células de Kupffer com o pigmento malárico e menor adesão e número de células mononucleares com pigmento malárico nos vasos do espaço porta do que nos camundongos infectados

#### **c) Pulmão**

Ausência de lesão focal. Menor congestão vascular.

## **2. Alterações histopatológicas nos camundongos CBA**

### **A) Camundongos infectados pelo *P. berghei* ANKA**

#### **a) Cérebro**

**Córtex cerebral, hipocampo, núcleos da base e cerebelo:** Menor número total de neurônios do que os animais não infectados, necrose neuronal, congestão vascular e aderência de leucócitos e eritrócitos ao endotélio vascular.

#### **b) Fígado**

Células de Kupffer com pigmento malárico. Adesão de leucócitos ao endotélio e presença de células mononucleares com pigmento malárico nos vasos do espaço porta.

#### **c) Pulmão**

Lesão alveolar focal, congestão vascular e edema intra-septal.

### **B) Camundongos infectados pelo *P. berghei* ANKA e tratados com PTX**

#### **a) Cérebro**

**Córtex cerebral:** Maior número total de neurônios do que os animais infectados. Aboliu a necrose neuronal, e foi menor a congestão vascular.

**Hipocampo:** Tendência para menor adesão leucocitária.

**Núcleos da base:** Aboliu a necrose neuronal. Presença de congestão vascular.

**Cerebelo:** Não modificou em relação aos infectados.

#### **b) Fígado**

Não modificou em relação aos infectados.

#### **c) Pulmão**

Aboliu a lesão alveolar e a congestão vascular.

## **3. Alterações histopatológicas nos camundongos BALB/c**

### **A) Camundongos infectados pelo *P. berghei* ANKA**

#### **a) Cérebro**

**Córtex cerebral:** Necrose neuronal e adesão de leucócitos ao endotélio vascular.

**Hipocampo:** Necrose neuronal e adesão de leucócitos e eritrócitos ao endotélio vascular.

**Núcleos da base:** Necrose neuronal, congestão vascular e adesão de eritrócitos ao endotélio vascular.

**Cerebelo:** Não houve alterações.

**b) Fígado**

Adesão de leucócitos e células mononucleares com pigmento malárico em vasos do espaço porta.

**c) Pulmão**

Lesão alveolar focal, congestão vascular e edema intra-septal.

**B) Camundongos infectados pelo *P. berghei* ANKA e tratados com PTX**

**a) Cérebro**

**Córtex cerebral:** Necrose neuronal. Aboliu a adesão leucocitária.

**Hipocampo:** Aboliu a adesão leucocitária e a eritrocitária.

**Núcleos da base:** Aboliu a necrose neuronal, congestão vascular e adesão de eritrócitos ao endotélio.

**Cerebelo:** congestão vascular e a adesão eritrocitária.

**b) Fígado**

Menor número de células de Kupffer com pigmento malárico, mas maior adesão leucocitária nos vasos do espaço porta.

**c) Pulmão**

Aboliu a lesão alveolar focal e a congestão vascular.

Em conjunto, nossos dados sugerem que as três linhagens de camundongos apresentam algumas alterações histopatológicas diferentes e algumas semelhantes, após a infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA.

A PTX teve influências positivas ou negativas sobre os aspectos histopatológicos analisados nos diferentes modelos estudados.

Contudo, um achado comum entre os três modelos evidenciou a capacidade da PTX diminuir o número total de células de Kupffer e de células mononucleares com pigmento malárico. A PTX também foi capaz de diminuir as alterações histopatológicas pulmonares ocasionadas pela infecção pelo *P. berghei* Anka nos três modelos estudados.

Nossos estudos sugerem que as alterações histopatológicas foram diferentes em cada linhagem de camundongo estudada e que a pentoxifilina influenciou diferentemente algumas alterações avaliadas nos diferentes modelos da malária estudados.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Ângulo I, Fresno M. Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2002;9:1145-1152.

Arslan SÇ, Scheidereit C. The prevalence of TNF $\alpha$  - induced necrosis over apoptosis is determined by TAK1-RIP1 interplay. *PLoS ONE* 2011;6:1-10.

Baratta JL, Ngo A, Lopez B, Kasabwalla N, Longmuir KJ, Robertson RT. Cellular Organization of Normal Mouse Liver: A histological, quantitative immunocytochemical, and fine structural analysis. *Histochemistry Cell Biology* 2009;131:713-726.

Baheti R, Laddha P, Gehlot RS. Liver involvement in *Falciparum* malaria – A histo-pathological analysis. *Journal of Indian Academy of Clinical Medicine* 2003;4:34-38.

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. *Infectious Immunology* 2010;78:4033-4039

Belnoue E, Kayibanda M, Vigario AM, Deschemin JC, van Rooijen N, Viguier M. On the pathogenic role of brain-sequestered CD8 T cells in experimental cerebral malaria. *The Journal of Immunology* 2002;169:6369-6375.

Bhalla A, Suri V, Singh V. Malarial hepatopathy. *Journal of Post grade Medicine* 2006;52:315-320.

Boulos M, Costa JM, Tosta CE. Comprometimento pulmonar na malária. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1993;35:93-102.

Borges, TKS. *Influência da pentoxifilina sobre a infecção murina por Plasmodium berghei ANKA em modelos susceptíveis ou não à malária cerebral*. 176f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular). Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal – 2006.

Borges, TKS. *Mecanismos de resposta inflamatória em modelos murinos susceptíveis ou não a malária cerebral, infectados pelo Plasmodium berghei* ANKA. Tese (Doutorado em Patologia Molecular). Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal – 2013.

Boura, MCR. A imunomodulação do pigmento malárico (hemozoína) aumenta a susceptibilidade para infecções bacterianas disseminadas? Tese de mestrado, Doenças Infecciosas Emergentes, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa – 2012.

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

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

Chen Q, Schlichtherle M, Wahlgren M. Molecular aspects of severe malaria. *Clinical microbiology* 2000;13:439-450

Chitnis CE. Molecular insights into receptors used by malaria parasites for erythrocyte invasion. *Current Opinion in Hematology* 2001;8:85–91.

Craig AG, Grau GE, Janse C, Kazura JW, Milner D, Barnwell JW. Animal models for research on severe malaria: the role of animals models for research on severe malaria. *PLoS Pathogen* 2012;8:1-9.

Das BK, Mishra S, Padhi PK, Manish R, Tripathy R, Sahoo PK et al. Pentoxifylline adjunct improves prognosis of human cerebral malaria in adults. *Tropical Medicine & International Health* 2003;8:680-684.

Deroost K, Tyberghein A, Lays N, Noppen S, Schwarzer E, Vanstreels E, Komuta M, et al. Hemozoin induces lung inflammation and correlates with malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2013;48:589-600.

De Miranda AS, Brant F, Campos AC, Vieira LB, Rocha NP, Cisalpino D, et al. Evidence for the contribution of adult neurogenesis and hippocampal cell death in experimental cerebral malaria cognitive outcome. *Neuroscience* 2015; 284:920-933.

Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology* 2005;1:112-119.

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

Dockrell HM, De Souza JB, Playfair JHL. The role of the liver in immunity to bloodstage murine malaria. *Immunology* 1980;41:421-430.

Dodoo D, Omer FM, Todd J, Akanmori BD, Koram KA, Riley EM. Absolute levels and ratios of proinflammatory and antiinflammatory cytokine production in vitro predict clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. *Journal of Infectious Diseases* 2002;185:971-979.

Dvorak JA, Miller LH, Whitehouse WC, Shiroishi T. Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. *Science* 1975;187:748-750.

Fabry Z, Waldschmidt MM, Hendrickson D, Keiner J, Love-Homan L, Takei F, et al. Adhesion molecules on murine brain microvascular endothelial cells: expression and regulation of ICAM-1 and Lgp 55. *Journal of Neuroimmunology* 1992;36:1-11.

Fernandes JL, de Oliveira RTD, Mamoni RL, Coelho OT, Nicolau JC, Blotta MHSL, et al. Pentoxifylline reduces pro-inflammatory and increases anti-inflammatory activity in patients with coronary artery disease: A randomized placebo-controlled study. *Atherosclerosis* 2008;196:434-442.



Gazzinelli RT, Kalantari P, Fitzgerald KA, Douglas T, Golenbock DT. Innate sensing of malaria parasites. *Nature Reviews Immunology* 2014;14:744-757.

Gomes AP, Vitorino RR, Costa AP, Mendonça EG, Oliveira MGA, Siqueira-Batista R. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva* 2011;23:358-369.

González-Espinoza L, Rojas-Campos E, Medina-Pérez M, Peña-Quintero P, Gómez-Navarro B, Cueto-Manzano, AM. Pentoxifylline decreases serum levels of tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 and C-reactive protein in hemodialysis patients: results of a randomized double-blind, controlled clinical trial. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2012;27:2023-2028.

Grau GE, Piguet PF, Pierre Vassalli P, Lambert PH. Tumor-necrosis factor and other cytokines in cerebral malaria: experimental and clinical data. *Immunological Reviews* 1989;112:49-70.

Haque A, Best SE, Amante FH, Ammerdorffer A, de Labastida F, Pereira T, et al. High parasite burdens cause liver damage in mice following *Plasmodium berghei* ANKA infection independently of CD8<sub>T</sub> cell-mediated immune pathology. *Infection and Immunity* 2011;79:1882-1888.

Hemmer CJ, Hort G, Chiwakata CB, Seitz R, Egbring R, Gaus W, et al. Supportive pentoxifylline in *falciparum* malaria: no effect on tumor necrosis factor alpha levels or clinical outcome: a prospective, randomized, placebo-controlled study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1997;56:397-403.

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

Lell B, Köhler C, Wamola B, Olola CHO, Kivaya E, Kokwaro G, et al. Pentoxifylline as an adjunct therapy in children with cerebral malaria. *Malaria Journal* 2010 9:368-374.

Looareesuwan S, Wilairatana P, Vannaphan S, Wanaratana V, Wenisch C, Aikawa M, et al. Pentoxifylline as an ancillary treatment for severe *falciparum* malaria in Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1998;58:348-353.

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

Lovegrove FE, Gharib SA, Peña-Castillo L, Patel SN, Ruzinski JT, Hughes TR, et al. Parasite burden and CD36-mediated sequestration are determinants of acute lung injury in an experimental malaria model. *PLoS Pathogen* 2008;4:1-11.

Mackintosh CL, Beeson JG, Marsh K. Clinical features and pathogenesis of severe malaria. *Trends in Parasitology* 2004;20:597-603.

Maguire GP, Handojo T, Pain MCF, Kenangalem E, Price RN, Tjitra E, et al. Lung injury in uncomplicated and severe *falciparum* malaria: A longitudinal study in Papua, Indonesia. *Journal of Infectious Diseases* 2005;192:1966-1974.

Manning L, Rosanas-Urgell A, Laman M, Edoni H, McLean C, Mueller I et al.: A histopathologic study of fatal paediatric cerebral malaria caused by mixed *Plasmodium falciparum/Plasmodium vivax* infections. *Malaria Journal* 2012 11:107-111.

MBL. The Mouse Brain Library (Homepage na internet). Mouse Brain Atlases [Acesso em 21/04/2014]. Disponível em: [www.mbl.org](http://www.mbl.org)

Medana IM, Day NP, Hien TT, Mai NT, Bethell D, Phu NH, et al. Axonal injury in cerebral malaria. *American Journal of Pathology* 2002;160:655-666.

Miller JL, Sack BK, Baldwin M, Vaughan AM, Kappe SH. Interferon-mediated innate immune responses against malaria parasite liver stages. *Cell Reports* 2014;7:436-447.

Miller, LH. Hypothesis on the mechanism of erythrocyte invasion by malaria merozoites. *Bulletin of the World Health Organization* 1977;55:157-162.

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

Mitchell AJ, Hansen AM, Hee L, Ball HJ, Potter SM, Walker JC et al. Early cytokine production is associated with protection from murine cerebral malaria. *Infection and Immunity* 2005;73:5645-5653.

Mohanty S, Patel DK, Pati SS, Mishra SK. Adjuvant therapy in cerebral malaria. *Indian Journal of Medical Research*. 2006;124:245-260.

Muniz-Junqueira MI. Immunomodulatory therapy associated to anti-parasite drugs as a way to prevent severe forms of malaria. *Current Clinical Pharmacology* 2007;1:59-73.

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

Nacer A, Movila A, Baer K, Mikolajczak SA, Kappe SH, Frevort, U. Neuroimmunological blood brain barrier opening in experimental cerebral malaria. *PLoS Pathogen* 2012;8:1-24.

Ockenhouse CF, Tegoshi T, Maeno Y, Benjamin C, Ho SM, Kan KE. Human vascular endothelial cell adhesion receptors for *Plasmodium* erythrocytes: roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1. *The Journal of Experimental Medicine* 1992;176:1183-1189.

O'dea E, Hoffmann A. NF- $\kappa$ B signaling. *Wiley Interdisciplinary Reviews Systems Biology and Medicine* 2010;1:107-115.

Okwan-Duodu D, Umpierrez GE, Brawley OW, Diaz R. Obesity-driven inflammation and cancer risk: role of myeloid derived suppressor cells and alternately activated macrophages. *American Journal of Cancer Research* 2013; 3:21-33.

Paula-Jr MR. Influência do tratamento de camundongos CBA infectados com *Plasmodium berghei* ANKA com pentoxifilina sobre a capacidade

fagocitária, produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico por macrófagos peritoneais, *in vitro*. Tese de Mestrado. Brasília (DF). Universidade de Brasília 2003.

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

Queiroz NL, Teixeira MM, Teixeira AL. Imunopatogênese da malária cerebral. *Revista Brasileira de Neurologia* 2008;44:13-19.

Qian X, Gu L, Ning H, Zhang Y, Hsueh EC, Fu M, et al. Increased Th17 cells in the tumor microenvironment is mediated by IL-23 via tumor-secreted prostaglandin E2. *The Journal of Immunology* 2013;190:5894-5902.

Randall LM, Engwerda CR. TNF family members and malaria: old observations, new insights and future directions. *Experimental Parasitology*, 2010;126:326-331.

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

Sun X, Martinez JR, Zhang GH. Inhibition of Ca<sup>2+</sup> influx by pentoxifylline in NR8383 alveolar macrophages. *Immunopharmacology* 1999;43:47-58.

Sunil VR, Vayas KN, Cervelli JA, Malaviya R, Hall L, Massa CB. Pentoxifylline attenuates nitrogen mustard-induced acute lung injury, oxidative stress and inflammation. *Experimental and Molecular Pathology* 2014;97:89-98.

Tauil P, Deane L, Sabroza P, Ribeiro C. A malária no Brasil. *Caderno de Saúde Pública* [online] 1985;1:71-111.

Togbe D, Sousa PL, Fauconnier M, Boissay V, Fick L, Scheu S, et al. Both functional LT $\beta$  receptor 2 and TNF receptor are required for the development of experimental cerebral malaria. *PLoS ONE* 2008;3:1-12.

Torre D, Speranza F, Martegani R. Role of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in the immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. *The Lancet Infectious Diseases* 2002;2:719-720.

Turner G. Cerebral malaria. *Brain Pathology* 1997;7:569-582.

Viriyavejakul P, Khachonsaksumet V, Punsawad C. Liver changes in severe *Plasmodium falciparum* malaria: histopathology, apoptosis and nuclear factor kappa B expression. *Malaria Journal* 2014;13:106-115.

Yao Z, Xing L, Boyce BF. NF- $\kappa$ B p100 limits TNF-induced bone resorption in mice by a TRAF3-dependent mechanism. *The Journal of Clinical Investigation* 2009;119:3024-3034.

Zingarelli B, Sheehan M, Wong HR. Nuclear factor- $\kappa$ B as a therapeutic target in critical care medicine. *Critical Care Medicine* 2003;31:105-111.

Zuzarte-Luis V, Mota MM, Vigário AM. Malaria infections: What and how can mice teach us. *Journal of Immunological Methods* 2014;410:113-122.

Watters & O'Connor. A role for tumor necrosis factor- $\alpha$  in ischemia and ischemic preconditioning. *Journal of Neuroinflammation* 2011;8:87-95.

Wasay M, Taqi A, Aziz H, Azam I, Beg MA. Neurological involvement in patients with falciparum malaria; frequency and prognostic value. *Clinical Neurology Neurosurgery*. 2010;113:104-106.

Weiss ML, Kubat K. *Plasmodium berghei*: a mouse model for the "sudden death" and "malarial lung" syndromes. *Experimental Parasitology* 1983;56:143-151.

Wenisch C, Looareesuwan S, Wilairatana P, Parschalk B, Vannapann S, Wanaratana V, et al. Effect of pentoxifylline on cytokine patterns in the therapy

of complicated Plasmodium falciparum malaria. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1998;58:343-347.

WHO, World Health Organization. 'Division of Control of Tropical Disease'. *Severe P. falciparum malaria*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene 2000;94:1-90.

WHO, World Health Organization. *World Malaria Report 2010*. Disponível em: <[http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2010/worldmalariareport2010.pdf](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/worldmalariareport2010.pdf)>. Acesso em: 10 abr 2011.

WHO. World Health Organization. *Drug resistance in malaria*. Peter B. Bloland. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/malaria.pdf>>. Acesso em 20 de maio de 2012.

WHO. World Health Organization. *World Malaria Report 2012*. Disponível em: <[http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2012/wmr2012\\_full\\_report.pdf](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/wmr2012_full_report.pdf)>. Acesso em: 10 de maio de 2013.

WHO. World Health Organization. *World Malaria Report 2014*. Disponível em: <[http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2014/wmr-2014-no-profiles.pdf?ua=1](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/wmr-2014-no-profiles.pdf?ua=1)>. Acesso em: 09 de dezembro de 2014

## **APÊNDICE DE REAGENTES**

## 1) Reagentes Sigma

Sigma-Aldrich®INC – St. Louis – Missouri – EUA

- **Glutaraldeído** – cat no: G-6257

## 2) Reagentes Vetec

Vetec química fina Ltda – Duque de Caxias – Rio de Janeiro – Brasil

- **Etanol** – Álcool etílico absoluto P.A. (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O) – cat no: 107
- **Metanol** – Álcool metílico (CH<sub>4</sub>O) – cat no: 102
- **Eosina amarela** – CI 45380 – cat no: 205
- **Hematoxilina** – CI 75290 – cat no: 630
- **Paraformaldeído** – (CH<sub>2</sub>O) x – cat no: 694
- **Parafina purificada** – cat no: 1227
- **Xilol** – Xileno (C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>) – cat no: 142





**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 FLOSSEPTINA 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